

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



**MODULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE  
QUERATINOCITOS HUMANOS POR ESPECIES  
REACTIVAS DE OXÍGENO GENERADAS  
MEDIANTE TRATAMIENTO FOTODINÁMICO**

Tesis Doctoral

**Alfonso Blázquez Castro**

Madrid, 2010



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



**MODULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE  
QUERATINOCITOS HUMANOS POR ESPECIES REACTIVAS  
DE OXÍGENO GENERADAS MEDIANTE TRATAMIENTO  
FOTODINÁMICO**

Memoria presentada por **D. Alfonso Blázquez Castro**  
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Madrid, 2010

Vº Bº de los Directores de Tesis

Firma manuscrita en azul de Dra. Ángeles Juarranz de la Fuente.

Dra. Ángeles Juarranz de la Fuente

Firma manuscrita en azul de Dr. Francisco Sanz Rodríguez.

Dr. Francisco Sanz Rodríguez



**ABREVIATURAS**

<b>ALA</b>	Ácido 5-aminolevulínico ( <i>5-AminoLevulinic Acid</i> )
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>CDK</b>	Quinasa dependiente de ciclina ( <i>Cycline Dependent Kinase</i> )
<b>CFSE</b>	5(6) carboxifluoresceína diacetato N-succinimidil ester
<b>D<sub>2</sub>O</b>	Óxido de deuterio
<b>DABCO</b>	1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano
<b>DHF-DA</b>	2,7-dicloro-dihidrofluoresceína diacetato
<b>DF</b>	2,7-dicloro-fluoresceína
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMSO</b>	Dimetil-sulfóxido
<b>DPI</b>	Difenilenoiodonio (cloruro) ( <i>DiPhenileneIodonium</i> )
<b>E<sub>c</sub></b>	Potencial redox celular
<b>EDTA</b>	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
<b>EF</b>	Efecto fotodinámico
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )
<b>ERK</b>	Quinasa regulada externamente ( <i>Externally Regulated Kinase</i> )
<b>FAD</b>	Dinucleótido de flavina-adenina ( <i>Flavin-Adenine Dinucleotide</i> )
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FS</b>	Fotosensibilizador
<b>Fura-2 AM</b>	Fura-2 pentakis(acetoximetil) ester
<b>GDP</b>	Guanosina difosfato
<b>GSH</b>	Glutation
<b>GSSG</b>	Di-glutation disulfuro
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HaCaT</b>	Queratinocitos humanos inmortalizados
<b>Ho</b>	Höchst 33258
<b>IM</b>	Índice Mitótico
<b>IR</b>	Radiación infrarroja
<b>LED</b>	Diodo emisor de luz ( <i>Light Emitting Diode</i> )
<b>MAL</b>	Metil-δ-aminolevulinato (hidrocloruro)
<b>MAPK</b>	Proteín quinasa activada por mitógenos ( <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> )
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (bromuro)

## Abreviaturas

<b>NADP<sup>+</sup></b>	Dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato oxidado
<b>NADPH</b>	Dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato reducido
<b>NOX</b>	NADPH oxidasa
<b>PBS</b>	Salino tamponado por fosfato ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>PI</b>	Yoduro de propidio ( <i>Propidium Iodide</i> )
<b>PI3K</b>	Fosfatidil-inositol 3 quinasa ( <i>Phosphatidy-Inositol 3 Kinase</i> )
<b>PKC</b>	Proteín-quinasa C ( <i>Protein Kinase C</i> )
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C ( <i>Phospholipase C</i> )
<b>PP2</b>	4-amino-5-(4-clorofenil)-7-(t-butil) pirazolo [3,4-d] pirimidina
<b>Pp IX</b>	Protoporfirina IX
<b>PTP</b>	Proteín-tirosín-fosfatasa ( <i>Protein Tyrosine Phosphatase</i> )
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno singlete
<b>•O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>•OH</b>	Radical hidroxilo
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>RTK</b>	Receptor-tirosín-quinasa ( <i>Receptor Tyrosine Kinase</i> )
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SOD</b>	Superoxido dismutasa
<b>TFD</b>	Tratamiento fotodinámico
<b>TFE</b>	Tratamiento fotoestimulante
<b>TGF-β</b>	Factor de crecimiento transformante-β ( <i>Transforming Growth Factor-β</i> )
<b>TK</b>	Tirosín-quinasa ( <i>Tyrosine Kinase</i> )
<b>TRITC</b>	Isotiocianato de tetra-metil-rodamina
<b>UV</b>	Radiación ultravioleta
<b>UVA</b>	Ultravioleta A
<b>UVB</b>	Ultravioleta B
<b>UVC</b>	Ultravioleta C
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento vascular endotelial ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
<b>VIS</b>	Radiación visible
<b>WH</b>	Cicatrización ( <i>Wound Healing</i> )

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	I
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. Las especies reactivas de oxígeno</b> .....	1
<b>2. NADPH Oxidasas</b> .....	7
<b>3. Señalización celular por ROS</b> .....	13
<b>4. Regulación redox de las Proteín-Tirosín-Fosfatasas</b> .....	18
<b>5. Ciclo celular y su modulación por ROS</b> .....	22
<b>6. Regulación de la cicatrización por ROS</b> .....	24
<b>7. Efecto fotodinámico y oxígeno singlete</b> .....	26
<b>8. Efecto fotodinámico mediante el uso del ácido</b> <b>5-aminolevulínico y derivados</b> .....	29
<b>OBJETIVOS</b> .....	33
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	35
<b>1. Materiales</b> .....	35
1.1 Línea celular .....	35
1.2 Materiales de cultivo .....	35
1.3 Condiciones de cultivo .....	36
1.4 Fuente de irradiación .....	36
1.5 Productos químicos .....	37
1.6 Anticuerpos .....	37
<b>2. Metodología principal</b> .....	38
2.1 Estudio espectroscópico de la Pp IX .....	38
2.2 Protocolo experimental de irradiación .....	38
2.3 Detección de la Pp IX en cultivos celulares .....	40
2.4 Detección de ROS en cultivos celulares .....	40
2.5 Ensayo de viabilidad celular del MTT .....	41
2.6 Medida del índice mitótico .....	42
2.7 Evaluación de los cuerpos de Flemming .....	43

2.8 Recuento de células Ki-67 positivas .....	43
2.9 Medida de la proliferación celular mediante marcaje con CFSE .....	43
2.10 Evaluación del ciclo celular .....	44
2.11 Análisis de la expresión de la ciclina D1 .....	45
2.12 Análisis de la expresión intracelular de VEGF .....	46
2.13 Caracterización del citoesqueleto de actina .....	46
2.14 Medida de los cambios en la concentración de Ca <sup>2+</sup> intracelular .....	47
2.15 Doble tratamiento fotodinámico .....	47
2.16 Efecto de la privación de suero .....	47
2.17 Comparación entre el tratamiento fotosensibilizante y la exposición a peróxido de hidrógeno .....	48
2.18 Evaluación del oxígeno singlete como fuente de ROS durante el tratamiento fotosensibilizante .....	48
2.19 Inhibidores de rutas de señalización celulares .....	49
2.20 Recuento de micronúcleos .....	49
<b>3. Tratamiento de los datos</b> .....	50
3.1 Observación microscópica.....	50
3.2 Tratamiento de imágenes .....	50
3.3 Análisis estadístico .....	50
<b>RESULTADOS</b> .....	51
<b>1. Características espectrales de la Pp IX</b> .....	51
<b>2. Medida de la producción de Pp IX y ROS en cultivos celulares</b> .....	52
2.1 Medida de la producción endógena de Pp IX .....	52
2.2 Cuantificación de la producción intracelular de ROS .....	54
<b>3. Evaluación del tratamiento fotodinámico sobre la proliferación celular</b> .....	57
3.1 Medida de la proliferación celular mediante el ensayo del MTT .....	57
3.2 Medida del índice mitótico .....	58
3.3 Evaluación del ciclo celular .....	61
3.4 Medida de la proliferación celular mediante marcaje con CFSE .....	64



3.5 Recuento de las células positivas para Ki-67 .....	65
3.6 Recuento de los cuerpos de Flemming .....	66
3.7 Medida de la expresión de ciclina D1 .....	68
<b>4. Efecto de un doble TFE en la proliferación celular .....</b>	<b>69</b>
<b>5. Efecto de la concentración de suero en el TFE .....</b>	<b>74</b>
<b>6. Modulación de la actividad del <math>^1\text{O}_2</math> durante el TFE .....</b>	<b>76</b>
<b>7. Efecto de la incubación con DPI y PP2 sobre el TFE .....</b>	<b>82</b>
7.1 Resultados tras la incubación con DPI .....	82
7.2 Resultados tras la incubación con PP2 .....	85
<b>8. Efecto del TFE sobre la concentración intracelular de <math>\text{Ca}^{2+}</math> ...</b>	<b>88</b>
<b>9. Evaluación de la incubación con peróxido de hidrógeno</b>	
<b>sobre la proliferación celular.....</b>	<b>90</b>
<b>10. Efecto del TFE sobre el citoesqueleto.....</b>	<b>93</b>
10.1 Efecto del TFE sobre los microtúbulos.....	93
10.2 Modificaciones en el citoesqueleto de actina.....	95
<b>11. Generación de micronúcleos tras el TFE.....</b>	<b>97</b>
<b>12. Producción intracelular de VEGF .....</b>	<b>100</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>103</b>
<b>1. Antecedentes del estudio .....</b>	<b>103</b>
<b>2. El efecto fotodinámico y la producción intracelular</b>	
<b>de ROS .....</b>	<b>104</b>
<b>3. El TFE modula la proliferación de las células</b>	
<b>HaCaT en cultivo .....</b>	<b>106</b>
<b>4. El TFE incrementa los niveles de ciclina D1.....</b>	<b>111</b>
<b>5. El TFE amplifica la acción proliferativa del suero .....</b>	<b>112</b>
<b>6. El efecto proliferativo del TFE depende de la</b>	
<b>producción de <math>^1\text{O}_2</math> .....</b>	<b>113</b>
<b>7. El efecto proliferativo del TFE depende de la</b>	
<b>actividad del complejo NOX y de la ruta de la quinasa Src .....</b>	<b>115</b>
<b>8. El TFE incrementa la concentración de <math>\text{Ca}^{2+}</math> intracelular .....</b>	<b>117</b>
<b>9. El peróxido de hidrógeno a bajas concentraciones produce</b>	
<b>efectos similares a los del TFE .....</b>	<b>118</b>

*Índice*

<b>10. El TFE modifica el citoesqueleto .....</b>	<b>119</b>
<b>11. El TFE no produce daño clastogénico.....</b>	<b>121</b>
<b>12. El TFE aumenta los niveles intracelulares de VEGF.....</b>	<b>122</b>
<b>13. Modelo propuesto para explicar el mecanismo de acción del TFE a nivel celular .....</b>	<b>124</b>
 <b>CONCLUSIONES .....</b>	 <b>131</b>
 <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	 <b>133</b>

## **RESUMEN**

---



## Resumen

Es conocida la acción citotóxica de las especies reactivas de oxígeno (ROS), que desemboca en numerosos trastornos y enfermedades. Sin embargo, recientemente se está demostrando la capacidad de algunas ROS para actuar como moléculas señaladoras en la fisiología celular normal. En concreto, las ROS se están vinculando en procesos tales como la proliferación celular y la regeneración tisular. Parece, por tanto, interesante definir metodologías que permitan, mediante la manipulación de la concentración celular de ROS, modular la tasa proliferativa celular con objeto de emplearlas, eventualmente, en la regeneración de un tejido dañado. En este sentido, la aplicación de un tratamiento fotodinámico moderado puede ofrecer la posibilidad de incrementar la tasa de proliferación celular en un tejido susceptible de ser iluminado, como la piel.

En este trabajo se han estudiado los efectos de un tratamiento fotodinámico moderado sobre la proliferación celular en la línea celular establecida HaCaT de queratinocitos humanos. Como fotosensibilizador de la acción fotodinámica se ha utilizado la Protoporfirina IX, un metabolito endógeno que forma parte de la ruta de síntesis de citocromos celulares. Para elevar los niveles de Protoporfirina IX las células se incubaron con metil-amino-levulinato (MAL), un precursor del ácido 5-amino-levulínico, que es el primer intermediario en la ruta de síntesis de la Protoporfirina IX. Como fuente de irradiación se utilizó un iluminador de diodos emisores de luz que emitía en el rango rojo del espectro visible.

Los resultados obtenidos indican que la aplicación de un tratamiento fotodinámico moderado modula la proliferación celular en las células HaCaT. La incubación durante 5 h con MAL 0,1 mM, para promover la producción endógena de Protoporfirina IX, y la posterior iluminación con luz roja durante 10 minutos (dosis de 3,72 J/cm<sup>2</sup>) provocaron un incremento puntual del número de células HaCaT que entraron en ciclo celular y realizaron la mitosis en las 24 h posteriores al tratamiento.

El incremento de la proliferación celular fue estudiado mediante diversas técnicas complementarias, tales como el ensayo de viabilidad celular del MTT, el recuento del porcentaje de células en mitosis dentro de una población celular determinada (índice mitótico), la medida de la distribución de ciclo celular mediante citometría de flujo, el marcaje con 5(6) carboxifluoresceína diacetato N-succinimidil ester (CFSE), la tinción para el antígeno nuclear Ki-67 o el recuento del porcentaje de células que presentaron cuerpos de Flemming.

En paralelo se han realizado otros estudios para comprender el mecanismo de acción por el cual el tratamiento fotodinámico modula la proliferación en las células HaCaT. Estos estudios han demostrado un aumento en la acumulación de Protoporfirina IX conforme mayor fue la concentración de MAL a la que estuvieron expuestas las células. El tratamiento fotodinámico elevó los niveles intracelulares de ROS a través de la producción de oxígeno singlete. También se ha demostrado que el tratamiento eleva significativamente

## *Resumen*

los niveles de ciclina D1 en las células tratadas. Se ha comprobado que, para que tenga lugar la estimulación celular descrita, deben de funcionar correctamente tanto la ruta de la quinasa Src como el complejo formador de ROS denominado NOX (*NADPH Oxidase*), y que el tratamiento provocó variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, fenómeno que se ha vinculado con la estimulación de proliferación celular.

También se han observado modificaciones en la disposición de los microtúbulos y de los microfilamentos de actina tras el tratamiento. Estas modificaciones alteraron temporalmente la morfología celular de forma similar a la observada cuando los queratinocitos reciben la señalización para iniciar un proceso de regeneración tisular. El tratamiento provocó un aumento significativo en la producción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), que es el factor angiogénico más potente.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto la posibilidad de utilizar tratamientos fotodinámicos moderados para modular la tasa proliferativa en queratinocitos humanos, con su posible aplicación como metodología para optimizar procesos de regeneración tisular.

## **INTRODUCCIÓN**





## 1. Las especies reactivas de oxígeno

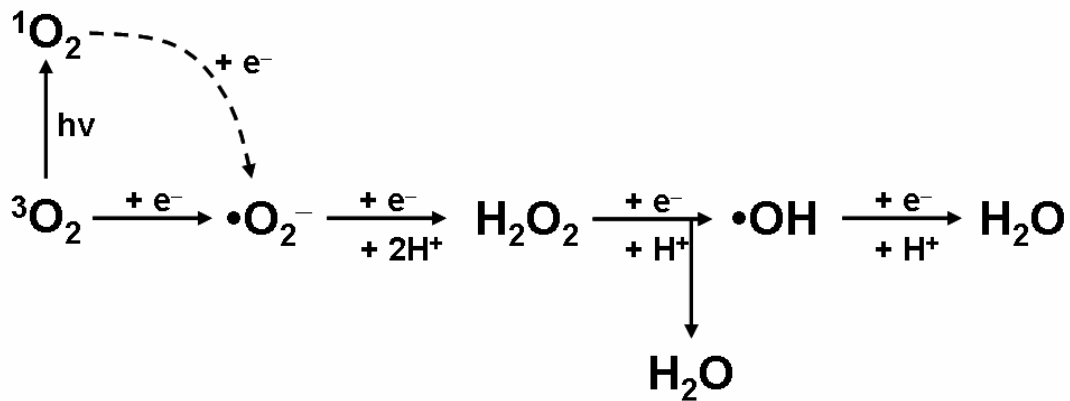
Durante décadas se han estudiado una serie de moléculas químicamente reactivas, cuya presencia en los organismos provoca daños en las células e interfieren con muchos procesos fisiológicos. Este grupo de moléculas reactivas comparten, en general, la propiedad de presentar un carácter radical, es decir, poseen un electrón aislado que incrementa la tendencia de la molécula a reaccionar rápida y descontroladamente con otros compuestos de su entorno. Estas moléculas reciben diversas denominaciones, de las cuales las más empleadas son las de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (cuando el oxígeno forma parte de la molécula).

Debido a sus propiedades químicas, estos radicales libres fueron estudiados como posibles causantes de toda una serie de trastornos y enfermedades. En la actualidad se sabe que, efectivamente, un elevado número de trastornos que afectan a la salud humana tienen su origen en una excesiva producción de radicales libres, que conduce a una situación de estrés oxidativo (Circu y Aw, 2010; Salmon *et al.*, 2010). Muchas dolencias en las que se produce una muerte acelerada de las células (p.e., enfermedades neurodegenerativas, etc.) están provocadas por procesos apoptóticos descontrolados en los tejidos afectados (Circu y Aw, 2010). También se ha propuesto que los radicales libres son la causa principal del envejecimiento. El progresivo deterioro asociado a la edad parece estar ligado de una forma indiscutible a un aumento en la producción de radicales oxidantes y a la acumulación de productos oxidados en las células y los tejidos (Salmon *et al.*, 2010). Por todas estas razones, los radicales libres han estado asociados desde hace más de 40 años con procesos patológicos, y no con los procesos fisiológicos normales. En la última década, sin embargo, esta visión negativa de los radicales está cambiando y se está comprobando que su presencia es necesaria para el correcto funcionamiento celular. Para comprender el modo de acción de estos compuestos a nivel celular y fisiológico, primero es necesario comprender su comportamiento químico.

## Introducción

La presencia de especies radicales se debe, básicamente, a la participación del oxígeno en el metabolismo celular. El oxígeno molecular ( $O_2$ ) es una especie química de enorme importancia en biología. Su capacidad de aceptar electrones, liberando una gran cantidad de energía en el proceso, es la base de la respiración aerobia. Esta propiedad de tomar electrones es debida a que el  $O_2$  es un potente oxidante. El oxígeno elemental presenta la segunda electronegatividad más alta de todos los elementos químicos después del flúor (Petrucci y Hardwood, 1997). Cuando aparece en forma molecular ( $O_2$ ), sin embargo, presenta una peculiar estructura electrónica de triplete en el estado fundamental ( $^3O_2$ ) (Schweitzer y Schmidt, 2003). Este hecho hace que el  $O_2$  sea relativamente estable en condiciones normales de presión y temperatura, siendo necesario vencer una inercia química inicial para que el  $O_2$  reaccione. El  $O_2$  presenta un comportamiento oxidante cuando reacciona con otras especies químicas. Es decir, tiende a sustraer electrones de otros elementos o compuestos químicos para completar sus orbitales electrónicos. Cada uno de los átomos de oxígeno que componen la molécula tiende a incorporar dos electrones para rellenar totalmente su última capa electrónica (capa 2p) (Petrucci y Hardwood, 1997). Es decir, que una molécula de oxígeno tomará un total de 4 electrones para alcanzar su estabilidad electrónica.

Teniendo en consideración lo expuesto, es posible establecer distintos estadios o etapas en la reducción de la molécula de oxígeno hasta óxido, que presenta átomos de oxígeno totalmente reducidos. Estos compuestos intermedios presentan una reactividad química superior a la del propio  $O_2$ . Son precisamente estos compuestos las denominadas Especies Reactivas del Oxígeno o ROS (*Reactive Oxygen Species*). En sistemas biológicos, el reductor último del  $O_2$  en la mayoría de las reacciones es el hidrógeno molecular ( $H_2$ ) (Mathews *et al.*, 2000). Por lo tanto, en estos sistemas las ROS son compuestos intermedios entre el  $O_2$  y el agua ( $H_2O$ ) (Davies, 1999; Rodríguez y Redman, 2005). La secuencia de reducción escalonada del  $O_2$  que da lugar a las ROS se representa en la Figura 1.



**Figura 1:** Esquema de la reducción secuencial del  $\text{O}_2$  para dar lugar a las ROS. En las ROS los átomos de oxígeno presentan estados de oxidación intermedios entre el del  $\text{O}_2$  (0) y los óxidos (-2).  $e^-$ : electrón;  $\text{H}^+$ : protón;  $h\nu$ : fotón;  ${}^3\text{O}_2$ : oxígeno molecular triplete;  ${}^1\text{O}_2$ : oxígeno singlete;  $\bullet\text{O}_2^-$ : anión superóxido;  $\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrógeno;  $\bullet\text{OH}$ : radical hidroxilo;  $\text{H}_2\text{O}$ : agua.

Una de las ROS mostrada en la Figura 1, el denominado oxígeno singlete ( ${}^1\text{O}_2$ ), no presenta un estado de reducción mayor que el del  $\text{O}_2$ , sino que se corresponde con un estado electrónico excitado del propio  $\text{O}_2$ . Sus características, formación y reactividad se explicarán más adelante (ver apartado 7 de la Introducción). Es cierto, por otra parte, que también son reconocidas como ROS algunas especies químicas formadas por oxígeno y nitrógeno, tales como el óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) o el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), oxígeno y carbono, como el monóxido de carbono ( $\bullet\text{CO}$ ), o el alótropo del  $\text{O}_2$ , el ozono ( $\text{O}_3$ ) (Pryor *et al.*, 2006). Incluso algunos ácidos hipohalosos, tales como el hipoclorito ( $\bullet\text{OCl}^-$ ) o el hipobromito ( $\bullet\text{OBr}^-$ ), también pueden considerarse como ROS (Davies, 1999; Bartosz, 2009). Sin embargo, en el presente trabajo sólo nos centraremos en aquellas especies químicas señaladas en la Figura 1, que son las más estudiadas en procesos de señalización celular (Thannickal y Fanburg, 2000; Dröge, 2001; Sauer *et al.*, 2001; Bartosz, 2009).

La reactividad química de las distintas ROS determina la posibilidad de que puedan actuar como moléculas señalizadoras. El radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), con una electronegatividad sólo inferior a la del flúor, es la más reactiva de las ROS y no presenta selectividad en la oxidación de otras moléculas. Su velocidad de reacción con muchas moléculas orgánicas es muy elevada (Pryor *et al.*, 2006; Bartosz, 2009). El radical hidroxilo es uno de los causantes del

estrés oxidativo. En la Tabla 1 se presentan algunos argumentos para evaluar el posible potencial de las ROS como moléculas señalizadoras a nivel celular.

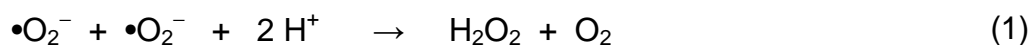
De las ROS mostradas en la Tabla 1, destacan dos como posibles especies señalizadoras: el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno. El superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) se produce por varios mecanismos, tanto regulados fisiológicamente como no regulados. Por una parte, existe una cesión de electrones al  $\text{O}_2$  en la cadena transportadora electrónica de la mitocondria, donde se estima que entre el 1% y el 5% de los electrones terminan formando superóxido en la matriz mitocondrial (Mathews *et al.*, 2000; Sauer *et al.*, 2001). También se genera superóxido por la activación de diversas oxidasas celulares, tales como las ciclooxigenasas-1/2, el citocromo P450, la xantina oxidasa o las lipoxigenasas (Kamata y Hirata, 1999; Chiarugi y Cirri, 2003). La producción principal del superóxido a nivel celular, sin embargo, depende de la activación de un conjunto de oxidasas dependientes de NADPH. A esta familia de oxidasas se la denomina NOX (NADPH OXidasa) (Kamata y Hirata, 1999; Dröge, 2001; Finkel, 2003; Lee y Choi, 2003). Las NOX son las principales responsables de la señalización celular por ROS y se tratarán en profundidad en el siguiente apartado.

El superóxido presenta carga negativa a pH fisiológico. Este hecho hace que su difusión a través de las membranas biológicas sea muy lento (Thannickal y Fanburg, 2000; Bartosz, 2009). Es un radical con una elevada reactividad, aunque muy por debajo de la del radical hidroxilo (Buetler *et al.*, 2004). En sistemas biológicos existen dos vías principales para la desactivación del superóxido: la reacción con el óxido nítrico para generar peroxinitrito, y su dismutación en  $\text{O}_2$  y peróxido de hidrógeno. La primera reacción tiene una velocidad muy elevada y da lugar al radical peroxinitrito ( $\bullet\text{ONOO}^-$ ), que es a su vez muy reactivo y genera importantes daños oxidativos a las biomoléculas (Thannickal y Fanburg, 2000).

Especie reactiva	Argumentos a favor de la señalización	Argumentos en contra de la señalización
<b>Superóxido</b> ( $\bullet\text{O}_2^-$ )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producción regulada enzimáticamente (NOX)</li> <li>• Eliminación enzimática (superóxido dismutasa)</li> <li>• Baja reactividad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formación no regulada (mitocondria)</li> <li>• Lenta difusión a través de membranas</li> </ul>
<b>Peróxido de hidrógeno</b> ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producción enzimática (superóxido dismutasa)</li> <li>• Eliminación enzimática (Catalasa/Peroxirredoxinas /Tiorredoxinas)</li> <li>• Muy baja reactividad</li> <li>• Rápida difusión a través de membranas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formación no regulada (mitocondria-oxidases)</li> </ul>
<b>Hidroxilo</b> ( $\bullet\text{OH}$ )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ninguno</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formación no regulada</li> <li>• Reactividad extrema</li> <li>• Sin eliminación enzimática</li> </ul>
<b>Oxígeno singlete</b> ( $^1\text{O}_2$ )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producción regulada enzimáticamente, (anticuerpos, mieloperoxidasa)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formación no regulada (radiación óptica, dismutación del <math>\bullet\text{O}_2^-</math>)</li> <li>• Elevada reactividad</li> <li>• Sin eliminación enzimática</li> </ul>

**Tabla 1:** Algunas de las propiedades fisico-químicas y bioquímicas de las ROS en relación con su potencial para actuar como moléculas reguladoras de la señalización celular (Modificado de Bartosz, 2009).

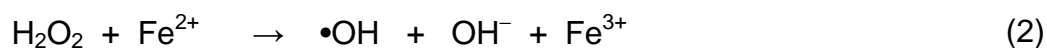
La segunda reacción, la de dismutación, se entiende como la oxidorreducción mutua de dos moléculas de superóxido. Se representa por:



Esta reacción es muy importante, porque genera peróxido de hidrógeno como producto. La velocidad de la reacción espontánea es relativamente alta a pH fisiológico. El enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza esta reacción,

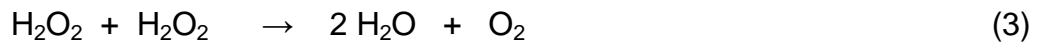
elevando la velocidad con la que se produce la dismutación. La SOD presenta una especificidad muy elevada, por lo que la reacción (1) se produce sin que el superóxido tenga la oportunidad de reaccionar de forma generalizada con otros componentes celulares (Thannickal y Fanburg, 2000).

El peróxido de hidrógeno tiene algunas características que hacen de él, probablemente, la ROS más importante en señalización celular. Se genera por el mencionado proceso de dismutación del anión superóxido en peróxido y oxígeno molecular. De todas las ROS es la que presenta una reactividad más baja después del propio O<sub>2</sub>. Además, es una molécula sin carga, no es un radical y presenta un cierto carácter apolar (Bienert *et al.* 2006; Bartosz, 2009). Debido a estas características el peróxido de hidrógeno es una molécula que tiene una vida media moderadamente larga (≈ 1 ms) y que es capaz de difundir a través de las membranas biológicas (Antunes y Cadenas, 2000; Bienert *et al.*, 2006). Como se adelantó en la Tabla 1, todas estas propiedades hacen del peróxido de hidrógeno un candidato prometedor para una función señalizadora por parte de las ROS a nivel celular. El peróxido, sin embargo, no está exento de inconvenientes para cumplir con este papel. El principal de ellos radica en su propia naturaleza de ROS, es decir, es un compuesto en el que el oxígeno tiene un estado de valencia intermedio (-1); todavía no ha alcanzado su estado de máxima reducción (-2). Por ello, en presencia de metales de transición, en particular con el hierro, se favorece el proceso de Fenton (Thannickal y Fanburg, 2000; Pryor *et al.*, 2006):



El resultado de la reacción de Fenton es la producción del reactivo radical hidroxilo, muy oxidante. Además, el metal de transición oxidado tiende a reducirse de nuevo a costa del potencial reductor de la célula. Para evitar esta reacción, las células mantienen muy bajas las concentraciones de hierro y otros metales de transición (p.e., cobre o manganeso) y, sobre todo, desactivan rápidamente el peróxido de hidrógeno mediante un enzima denominado catalasa.

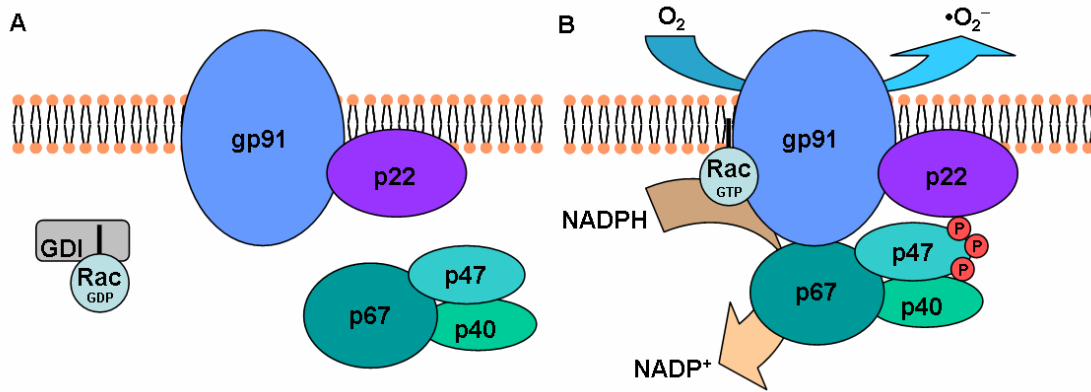
La catalasa cataliza la reacción de dismutación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bienert *et al.*, 2006):



Otros enzimas, como tioredoxinas y peroxirredoxinas, también eliminan el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o el resultado de la oxidación de biomoléculas por parte del peróxido de hidrógeno (Kamata y Hirata, 1999; Wood *et al.*, 2003; Janssen-Heininger *et al.*, 2008).

## 2. NADPH Oxidasas

Como se ha comentado en el apartado 1, la familia de las NADPH Oxidasas o NOX agrupa a un conjunto de enzimas que catalizan la reducción del O<sub>2</sub> a superóxido. La NOX mejor estudiada es la NOX2 presente en células del sistema inmune y, como todas las NOX, es un complejo enzimático compuesto de varias subunidades (Figura 2). La subunidad catalítica se denomina gp91 y su función es la de reducir dos moléculas de oxígeno a anión superóxido. La subunidad p22 es una proteína transmembrana cuya función es la de evitar la degradación proteosómica de gp91 por una parte, y facilitar la unión con las subunidades citoplasmáticas de NOX2 por otra. La subunidad p47 es citoplasmática, y cuando está fosforilada recluta a las demás subunidades citoplasmáticas y las ensambla con las subunidades de la membrana plasmática (gp91 y p22). La proteína p67 también es citoplasmática. Interactúa con p47 y, cuando ésta se fosforila, ambas se translocan a la membrana. Allí, p67 interacciona con gp91 y con Rac, activando la actividad catalítica de gp91. p40 es una subunidad moduladora de la actividad del complejo NOX2, aunque no parece esencial para el correcto funcionamiento de éste. La proteína Rac es necesaria para la activación de NOX2. En sentido estricto no es una subunidad de NOX2, dado que regula otros procesos celulares como la organización del citoesqueleto. Sin embargo, diversos estudios han puesto de manifiesto el papel esencial de Rac para el correcto funcionamiento de NOX2 (Bedard y Krause, 2007).



**Figura 2:** Estructura del complejo NOX2. (A) Las subunidades gp91 (catalítica) y p22 (reguladora) se encuentran localizadas en la membrana. El resto de subunidades tiene localización citoplasmática. (B) Tras la fosforilación de p47 (organizadora) se produce la translocación de p47, p67 (reguladora) y p40 (moduladora) hasta gp91. Al mismo tiempo Rac intercambia GDP por GTP y activa todo el complejo (Bokoch y Diebold, 2002; Bedard y Krause, 2007).

La subunidad catalítica (gp91) es una proteína transmembrana que se localiza en la membrana citoplasmática o en la membrana de algunos orgánulos de células especializadas (Bartosz, 2009; Brown y Griedling, 2009). Durante el proceso catalítico, oxidan una molécula de dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato reducido (NADPH) a NADP<sup>+</sup> (dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato oxidado):

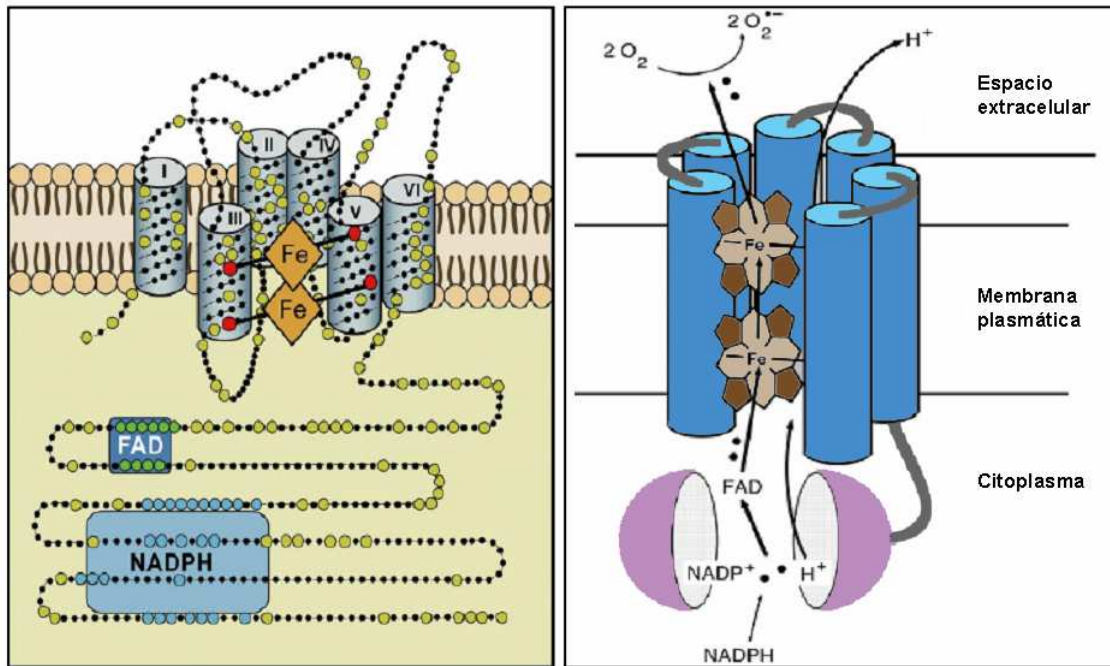


La oxidación del NADPH tiene lugar en la cara citoplasmática de la membrana celular, mientras que la reducción del O<sub>2</sub> ocurre en la cara externa de la membrana citoplasmática o en la luz del orgánulo correspondiente (Cross y Segal, 2004; Bedard y Krause, 2007). En la Figura 3 se esquematiza la estructura típica de la subunidad catalítica de la NOX2, que fue la primera NOX descrita en células fagocíticas, y del transporte de electrones que lleva a cabo.

La proteína consta de 6 dominios transmembrana (I-VI), un sitio de unión al dinucleótido de flavina-adenina (FAD) y otro de unión al NADPH. Estos dos sitios de unión se encuentran en la región citoplasmática de la proteína. Los dominios transmembrana III y V unen dos grupos hemo a través de histidinas. Estos citocromos transfieren los electrones desde la región citoplasmática (par



NADPH-FAD) hasta el  $O_2$  en el exterior de la célula. El grupo hemo más cercano a la cara externa de la membrana se encarga también de ligar por coordinación a las moléculas de  $O_2$ . La función del FAD es la de recibir dos electrones del NADPH y transferirlos, de uno en uno, a dos moléculas de oxígeno ligadas por el citocromo de forma secuencial (Cross y Segal, 2004; Bedard y Krause, 2007; Bartosz, 2009; Chan *et al.*, 2009).



**FIGURA 3:** Esquema de la estructura de gp91 (izquierda), el enzima que cataliza la reducción del  $O_2$  a superóxido; gp91 es la subunidad catalítica del complejo NADPH Oxidasa (NOX). Se observan los seis dominios transmembrana, la localización de los dos citocromos, el sitio de unión a FAD y el de unión a NADPH. A la derecha se esquematiza la cadena transportadora de electrones, que transfiere potencial reductor desde el NADPH hasta el  $O_2$  a través del FAD y los dos citocromos situados en los dominios transmembrana (modificado de Bedard y Krause, 2007).

Una vez generadas las dos moléculas de superóxido es necesario que éstas difundan a través de la membrana plasmática para que se produzca la señalización correspondiente. Existen rutas de señalización que dependen de la oxidación de biomoléculas externas a la célula (glicocálix, matriz extracelular, etc.) pero no se tratarán en este estudio. Como ya se ha comentado, el superóxido presenta una escasa difusión a través de la membrana. Se asume que, dado que las dos moléculas de superóxido se generan en la misma región, se produzca su dismutación (reacción 1), dando lugar a una molécula

## Introducción

de peróxido de hidrógeno y O<sub>2</sub>. La molécula de peróxido difunde con mayor velocidad a través de la membrana y tiene una vida media más larga que el superóxido. De hecho, se ha comprobado que dos miembros de la familia NOX, DUOX1 y 2, tienen un séptimo dominio transmembrana que termina en un dominio externo con actividad peroxidasa. Por lo tanto, parece que DUOX1 y 2 catalizan la producción de una molécula de peróxido mediante la oxidación de una molécula de NADPH (Berdard y Krause, 2007; Chan *et al.*, 2009).

La familia NOX se compone hasta el momento de 7 miembros (ver Tabla 2): NOX1-5 y DUOX1-2 (Brown y Griedling, 2009; Chan *et al.*, 2009).

Denominación	Localización cromosómica	Expresión elevada	Expresión moderada o baja
NOX1	Xq22	Colon	Músculo liso, endotelio, útero
NOX2	Xp21.1	Fagocitos	Linfocitos B, neuronas, músculo esquelético y cardíaco, hepatocitos, células troncales hematopoiéticas
NOX3	6q25.1-26	Oído interno	Tejidos fetales, cerebro
NOX4	11q14.2-q21	Riñón, vasos sanguíneos	Osteoclastos, endotelio, fibroblastos, queratinocitos
NOX5	15q22.31	Tejido linfoide, testículos	Endotelio, músculo liso, páncreas, ovario, estómago
DUOX1	15q21	Tiroides	Epitelio respiratorio, cerebelo
DUOX2	15q15.3-q21	Tiroides	Glándulas salivares, epitelio gastrointestinal

**Tabla 2:** Componentes de la familia NOX. Se detalla el nombre de cada uno de los componentes conocidos de la familia NOX, su localización cromosómica y aquellos tejidos en los que se conoce su expresión (modificada de Bedard y Krause, 2007).

El complejo más estudiado, y prototipo de este grupo, es NOX2, también conocido como *phox* (*phagocyte respiratory burst oxidase*). La función de NOX2 se descubrió a raíz del estudio de una enfermedad del sistema inmune, la enfermedad granulomatosa crónica. Los afectados presentan un complejo NOX2 no funcional que limita la producción de ROS, necesarias para combatir infecciones. Las especies oxidantes degradan las estructuras celulares de la gran mayoría de los patógenos. Durante el proceso de incremento explosivo de la respiración en fagocitos (*phagocyte respiratory burst*), que forma parte de la respuesta inmune, se generan grandes cantidades de ROS que lesionan y limitan el crecimiento de organismos invasores. Esta fue la primera función estudiada de las ROS a nivel inmunológico. Sin embargo, las ROS también han resultado ser necesarias como moléculas señalizadoras intra- e intercelulares durante la organización de la respuesta inmune (Cross y Segal, 2004). Como consecuencia, las personas que padecen este trastorno presentan grados más o menos severos de inmunodeficiencia.

Las proteínas Rac son elementos organizadores/activadores imprescindibles para el correcto funcionamiento del complejo NOX (Werner, 2004). Al contrario que los demás elementos que conforman el complejo NOX, que tienen una función conocida únicamente en relación a dicho complejo, las proteínas Rac son esenciales, no sólo para el ensamblaje y la activación de NOX, sino también para el correcto funcionamiento del citoesqueleto de actina y la migración celular (Hall, 1998). Este grupo de proteínas pertenecen a la familia de proteínas Rho y tienen función GTPasa.

Existen tres variantes de Rac: Rac1, que se expresa de forma ubicua; Rac2, que es característica de células fagocíticas; y Rac3, que se expresa en el sistema nervioso central (Bedard y Krause, 2007). Sin la participación de Rac unido a GTP el complejo NOX no es funcional. Rac unida a GDP (inactiva) se encuentra en el citoplasma unida a una proteína inhibitoria (GDI). Cuando intercambia GDP por GTP y se activa, se libera de GDI y se transloca a la membrana celular. Esto es debido a que posee un grupo geranil-geraniol isoprenol que se intercala entre los fosfolípidos de la membrana plasmática. Una vez se ha situado en la membrana, interactúa con p67 y gp91, activando al

complejo NOX. Se cree que su papel es el de regular la tasa de transferencia de electrones desde el NADPH hasta el O<sub>2</sub> (Bokoch y Diebold, 2002; Werner, 2004). Rac es esencial en la activación de NOX, pero existen evidencias que apuntan a que Rac también podría regular la producción de ROS por vía mitocondrial. En general, el incremento de producción de ROS por vía mitocondrial parece estar relacionado con la activación del mecanismo de muerte por apoptosis. Por todas estas razones, parece que las proteínas Rac se encuentran en el centro de rutas de señalización de supervivencia-proliferación, de cambios morfológicos y migración celular, y de apoptosis. En todos los casos estas rutas reguladas por Rac parecen estar mediadas en parte por la producción de ROS (Gregg *et al.*, 2003; Fiaschi *et al.*, 2006; Alexandrova *et al.*, 2006; Terada, 2006; Chiarugi y Fiaschi, 2007).

El complejo NOX está involucrado en la regulación de múltiples procesos fisiológicos (Bedard y Krause, 2007; Bartosz, 2009; Brown y Griedling, 2009). El primer proceso en el que se definió su función fue en la producción de ROS como parte del sistema de defensa del cuerpo frente a patógenos (Cross y Segal, 2004). Se ha descrito su participación en la regulación de múltiples procesos: en la transición G<sub>1</sub>/S del ciclo celular mediado a través de la integrina- $\alpha$ 2 $\beta$ 1 (Honoré *et al.*, 2003); en señales de supervivencia/proliferación dependientes de anclaje a la matriz extracelular (Chiarugi, 2008); en la producción constitutiva de ROS por parte de células troncales hematopoiéticas, donde dicha producción de ROS parece esencial para el mantenimiento del fenotipo troncal (Piccoli *et al.*, 2007); como reguladores imprescindibles del tono y la función vascular junto con el óxido nítrico (Wolin, 2009); en la modulación del crecimiento del endotelio vascular coronario (Bayraktutan, 2004); en el proceso angiogénico, donde las ROS participan en la correcta señalización del receptor para el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en células endoteliales (Arbiser *et al.*, 2002; Ushio-Fukai, 2006); o durante el proceso de cicatrización (*Wound Healing*, WH) (Sen, 2003). El complejo NOX se plantea como una de las dianas terapéuticas más relevantes para acelerar el proceso de WH, incrementando la proliferación de las células involucradas en el proceso (Chan *et al.*, 2009). En este sentido es relevante añadir que está descrita la existencia del complejo NOX en líneas celulares de

queratinocitos humanos de diversos orígenes y, concretamente, en la línea celular HaCaT con la cual se han realizado los experimentos del presente estudio (Chamulitrat *et al.*, 2004).

### 3. Señalización celular por ROS

Hasta el momento se han presentado evidencias que, por una parte, relacionan a las ROS con una variedad de rutas de señalización celular y, por otra, que dichas ROS son generadas de forma fisiológica por varios mecanismos, aunque el más importante parece ser a través del complejo NOX. En este apartado se explicarán los procesos moleculares más importantes que permiten a las ROS modular la señalización a nivel celular.

El comportamiento celular frente a las ROS presenta un gradiente muy bien definido (Morré, 2000; Boonstra y Post, 2004; Laurent *et al.*, 2005; Matés *et al.*, 2008). Concentraciones muy bajas de ROS no tienen ningún efecto sobre el metabolismo celular al ser tamponadas por el potencial reductor celular (Morré, 2000). Conforme se incrementa levemente la concentración de ROS, en torno a valores de micromolar, se produce un aumento en la proliferación celular (Davies, 1999; Martindale y Holbrook, 2002). Este incremento en la proliferación a bajas concentraciones de ROS se ha verificado en multitud de líneas celulares, tales como fibroblastos humanos (Murrell *et al.*, 1990), células pancreáticas humanas (Dyrbukt *et al.*, 1994), linfocitos T humanos (Tatla *et al.*, 1999), células de cáncer de próstata humano (Wartenberg *et al.*, 1999), fibroblastos pulmonares de hamster chino (Kim *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2003), células de carcinoma de útero (Liu *et al.*, 2003), mioblastos de rata (Caporossi *et al.*, 2003) o carcinoma de colon/ hepatoma/ fibroblastos murinos (Laurent *et al.*, 2005), por citar sólo algunos ejemplos representativos de una extensa bibliografía (ver revisiones: Pryor *et al.*, 2006; Bartosz, 2009).

Superado un cierto umbral el efecto oxidante de las ROS empieza a interferir con los sistemas de señalización celular, para terminar por generar daño a mayores concentraciones. A partir de este punto la respuesta celular

dependerá, no sólo de la concentración de ROS, sino también del potencial reductor celular disponible. Conforme aumenta el potencial oxidante se producirá la activación de la respuesta a estrés oxidativo, la salida del ciclo celular y la reparación del daño, con una posible entrada en la etapa de diferenciación terminal o senescencia, activación del programa apoptótico o, incluso, necrosis (Davies, 1999; Allen y Tresini, 2000; Martindale y Holbrook, 2002; Liu *et al.*, 2003; Boonstra y Post, 2004).

Los mecanismos moleculares que subyacen a estos fenómenos son variados, ya que, para que una ROS pueda tener un papel señalizador, debe presentar ciertos requisitos básicos: producirse de forma regulada, mostrar un cierto grado de selectividad en sus reacciones redox, y ser eliminada de forma controlada (Sauer *et al.*, 2001; Bartosz, 2009). Estos requisitos los cumplen, al menos, cuatro de las especies reactivas introducidas en el apartado 1: el superóxido, el peróxido de hidrógeno, el óxido nítrico y el monóxido de carbono. Las dos últimas especies presentan una función señalizadora bien conocida (Pryor *et al.*, 2006). El descubrimiento de la función señalizadora del superóxido y del peróxido de hidrógeno es más reciente. En la Tabla 3 se indican algunas proteínas representativas que están moduladas en su actividad por el superóxido y/o el peróxido.

Dado el cada vez mayor número de genes y proteínas regulados en su actividad por las ROS se está investigando cuál puede ser el mecanismo de señalización de estas especies. Es preciso destacar en este punto que, aunque existen ejemplos de regulación independiente por parte del superóxido y del peróxido, ambas especies comparten el mecanismo básico de señalización. A pesar de sus diferencias fisico-químicas esto se comprende fácilmente cuando se tiene en cuenta que el superóxido genera al peróxido espontáneamente por dismutación.

Gen / Proteína	ROS	Efecto
AP-1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Incremento de la unión al DNA
bFGF	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Aumento de la afinidad por el ligando
Cox-2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Aumento del ARN <sub>m</sub>
PLA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Aumento de la fosforilación
Receptor EGF	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Aumento de la actividad TK
ERK-1/2	•O <sub>2</sub> <sup>-</sup> / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Aumento de la fosforilación
c-fos	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Aumento del ARN <sub>m</sub>
Interleuquinas (en general)	•O <sub>2</sub> <sup>-</sup> / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Aumento del ARN <sub>m</sub> y de la síntesis
c-jun	•O <sub>2</sub> <sup>-</sup> / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Aumento del ARN <sub>m</sub>
c-myc	•O <sub>2</sub> <sup>-</sup> / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Aumento del ARN <sub>m</sub>
NF-κB	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Aumento de la actividad
PKC	•O <sub>2</sub> <sup>-</sup> / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Aumento de la actividad
PTP	•O <sub>2</sub> <sup>-</sup> / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inhibición de la actividad
TGF-β	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Aumento del ARN <sub>m</sub>
VEGF	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Aumento del ARN <sub>m</sub>

**Tabla 3:** Proteínas más representativas reguladas por superóxido y/o peróxido de hidrógeno (modificado de Allen y Tresini, 2000).

Tanto el superóxido como el peróxido actúan como señalizadores modulando el estado redox local y general de la célula (Schafer y Buettner, 2001; Conour *et al.*, 2004; Janssen-Heininger *et al.*, 2008). Las células están compuestas mayoritariamente por especies químicas reducidas y se dan toda una serie de reacciones acopladas para mantener la homeostasis reducida del ambiente intracelular. Los dos compuestos principales encargados de mantener dicho ambiente reductor son el NADH/NADPH y el glutatión (GSH). El NADH/NADPH interviene en reacciones anabólicas y catabólicas y, en rigor, no actúa como tampón reductor más que en situaciones en las que existe ya un estrés oxidativo importante. El verdadero sistema de tamponamiento redox celular lo constituye el par GSH – GSSG (di-glutatión disulfuro), acoplado a una serie de enzimas con capacidad oxidorreductora (Schafer y Buettner, 2001). El GSH presenta un grupo sulfhídrico (-SH) funcional que se utiliza para tomar o ceder electrones, o hidrógenos, en reacciones redox (existe una relación causal

entre los grupos sulfuro y el ambiente reductor celular). De hecho, el potencial redox celular es tan importante que su modificación general hacia una mayor reducción u oxidación parece determinar el comportamiento de la propia célula. Se ha calculado, por ejemplo, que las células en proliferación presentan un potencial redox celular ( $E_C$ ) del orden de -240 mV (tomando como referencia un electrodo de  $H_2$  en condiciones normales). Las células en confluencia muestran un  $E_C$  con valores entre -220 mV y -180 mV. Las células diferenciadas un  $E_C$  entre -200 y -160 mV. Finalmente, las células en apoptosis presentan un  $E_C \geq -170$  mV (Schafer y Buettner, 2001).

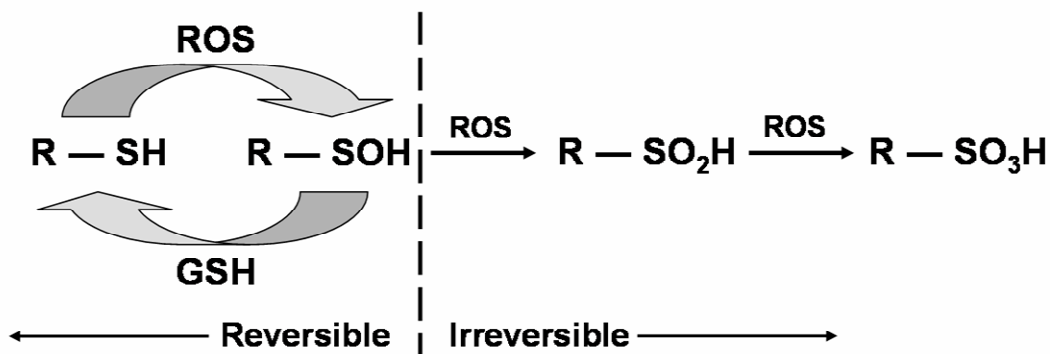
La modulación local del potencial redox es el mecanismo molecular mediante el cual el superóxido y el peróxido actúan como señalizadores celulares. Dentro de las posibles modulaciones de ese potencial local, la más estudiada es la modificación de grupos funcionales con azufre: los aminoácidos cisteína y metionina. Las modificaciones oxidativas de la metionina representan un tipo de señalización que ha sido poco investigado en general (Hoshi y Heinemann, 2001). El grupo funcional de la metionina, un sulfometilo ( $S-CH_3$ ), se oxida a metil-sulfóxido en presencia de ROS. Esta oxidación, reversible y dependiente de GSH, modifica las propiedades de hidrofobicidad y polaridad del aminoácido, lo que altera sus propiedades bioquímicas. El cambio conformacional posterior a esta oxidación modifica las propiedades de ciertos canales de membrana.

Por otra parte, la oxidación del grupo sulfhídrico de la cisteína parece de mayor relevancia fisiológica y se viene estudiando desde hace más de una década, ya que la cisteína forma parte del sitio catalítico/funcional de muchas proteínas (Conour *et al.*, 2004). Las ROS, incluidos el superóxido y peróxido de hidrógeno, son capaces de oxidar el grupo  $-SH$  de la cisteína en varias etapas, como se muestra en la Figura 4 (Finkel, 2000; Winterbourn y Hampton, 2008).

Como se indica en el esquema, la primera oxidación a ácido sulfénico es reversible, dependiente de GSH. Sin embargo, una mayor concentración de ROS conduce a la oxidación a ácidos sulfínico/sulfónico, que es irreversible. Esta oxidación excesiva inactiva de forma permanente el enzima o provoca un



cambio estructural deletéreo. El esquema de la Figura 4 describe, por tanto, un mecanismo bien estudiado, mediante el cual el superóxido y el peróxido provocan cambios reversibles en determinadas proteínas a bajas concentraciones (señalización), mientras que generan un daño irreversible a concentraciones más elevadas (estrés oxidativo) (Winterbourn y Hampton, 2008; Janssen-Heininger *et al.*, 2008). Actualmente se conocen muchos tipos de proteínas que están reguladas funcionalmente por la oxidorreducción de sus cisteínas. Por ejemplo, muchos tipos de canales y bombas iónicos ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ ) se encuentran regulados por este mecanismo (Kourie, 1998). Concretamente, el caso del  $Ca^{2+}$  es muy notable, pues actúa también como segundo mensajero en multitud de rutas de señalización. Por ejemplo, el canal sensible a ryanodina en el retículo sarcoplásmico del músculo esquelético y cardíaco presenta una serie de cisteínas. Cuando estas cisteínas son oxidadas, el canal queda abierto permitiendo la difusión del  $Ca^{2+}$  desde el retículo al citoplasma (Kourie, 1998). Existe una relación sólida entre la señalización por el  $Ca^{2+}$  y las ROS, ya que el aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$  citoplasmático refuerza la señal por ROS y viceversa (Kumar Singh *et al.*, 2005).



**Figura 4:** Esquema de la oxidación del grupo funcional R-SH (R=residuo orgánico). La exposición del grupo SH a las ROS provoca una oxidación a ácido sulfénico (R-SOH). Esta oxidación es reversible, acoplada al consumo de GSH. La exposición prolongada a las ROS provoca la oxidación a ácidos sulfínico y sulfónico (R-SO<sub>2</sub>H y R-SO<sub>3</sub>H), que presenta un carácter irreversible (Finkel, 2000).

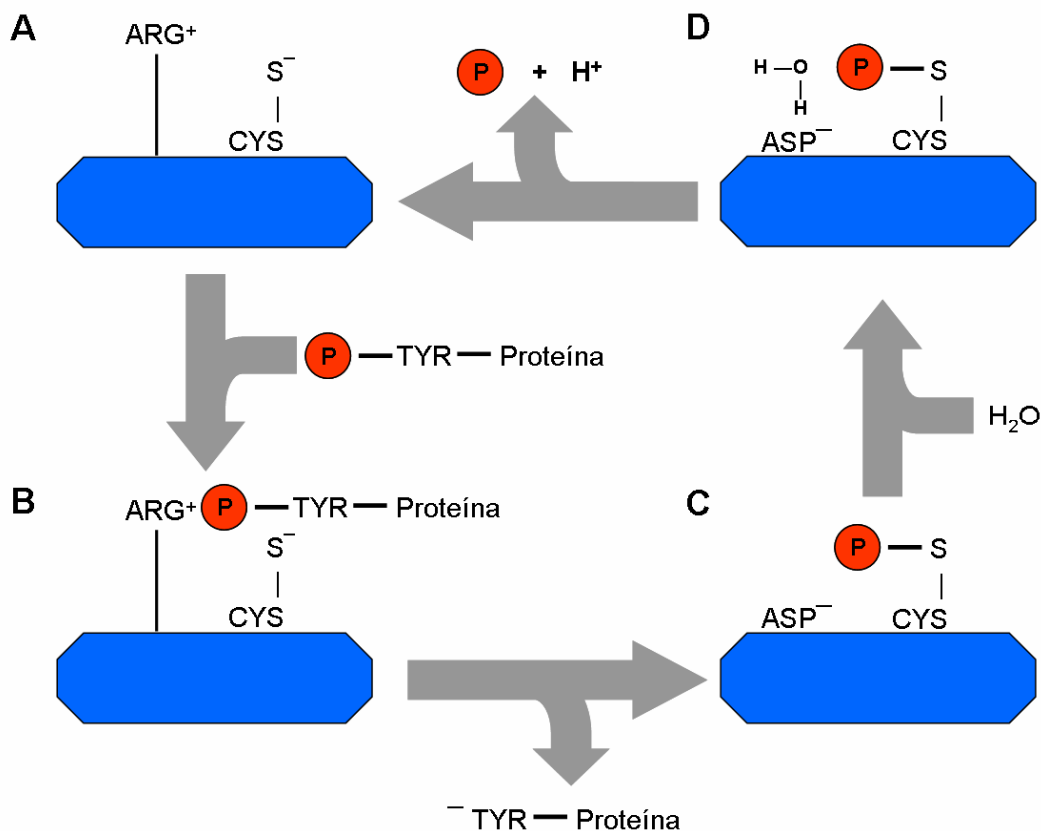
Otro ejemplo de regulación enzimática a través de las ROS se encuentra en la proteína-quinasa C (PKC). Posee varias cisteínas en su secuencia de aminoácidos. La porción amino-terminal tiene una función reguladora, mientras que el dominio catalítico se localiza en la porción carboxilo-terminal. Las cisteínas localizadas en el dominio regulador son más susceptibles de oxidación que las cisteínas catalíticas. Cuando las cisteínas reguladoras son oxidadas a sulfénico, la PKC se activa. Si la concentración de ROS es tal que también se oxidan las cisteínas catalíticas, el enzima se inactiva (Gopalakrishna y Jaken, 2000). Encontramos de nuevo un gradiente en el potencial redox local que actúa como interruptor en la función de un enzima. Este mecanismo de regulación redox también se observa en algunos factores de transcripción (AP-1, NF- $\kappa$ B, Myb, p53, etc.) que presentan cisteínas en sus dominios de unión a la cromatina (p.e., estructuras en dedos de zinc). Es necesario que las cisteínas de estos dominios estén reducidas para poder acceder a las secuencias de lectura (Kamata y Hirata, 1999). Se deduce que, para que tenga lugar una correcta señalización por ROS, se debe dar una variación puntual del  $E_C$  hacia valores más oxidantes en el citoplasma, pero el núcleo debe de mantener en todo momento un ambiente reductor. De hecho, el núcleo presenta siempre un  $E_C$  más negativo que el citoplasma (Schafer y Buettner, 2001; Conour *et al.*, 2004; Janssen-Heininger *et al.*, 2008).

#### 4. Regulación redox de las Proteín-Tirosín-Fosfatasas

Las Proteín-Tirosín-Fosfatasas (PTPs) representan un conjunto de enzimas cuya función es la de eliminar el grupo fosfato unido a un residuo de tirosina de otra proteína (Mathews *et al.*, 2000). Para realizar esta función el sitio catalítico presenta un aminoácido básico (arginina) que ancla el grupo tirosil-fosfato y expone el enlace fósforo-oxígeno. A continuación, una cisteína ataca dicho enlace, une el fosfato y libera la tirosina. Finalmente, una molécula de agua ataca el enlace fósforo-azufre, regenerando la cisteína y liberando un fosfato (Denu y Dixon, 1998).

La Figura 5 muestra un esquema del mecanismo catalítico de las PTPs. La cisteína catalítica presenta un  $pK_a$  más bajo de lo usual (4,5-5,5),

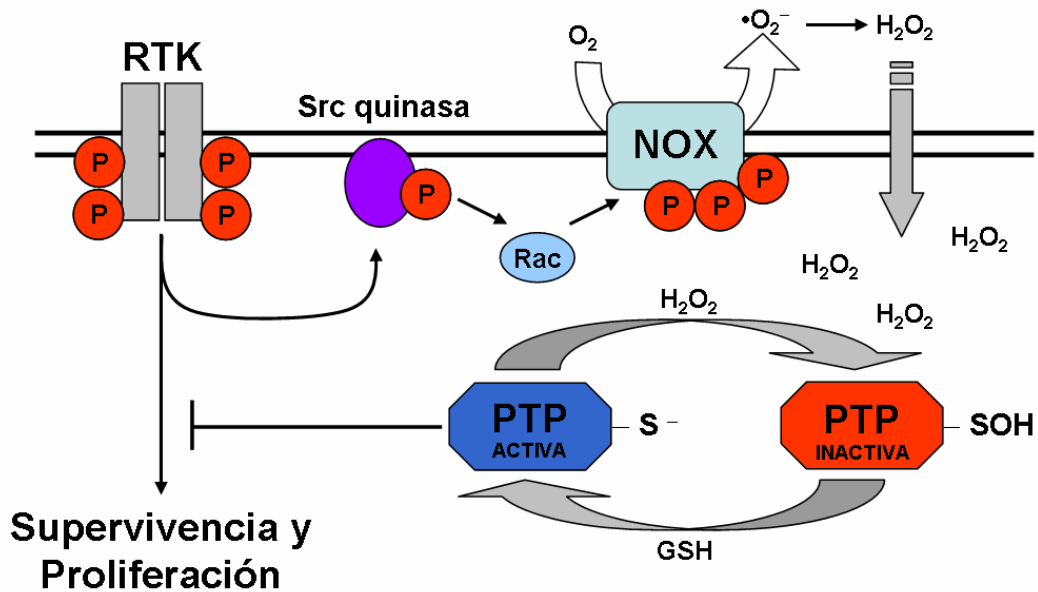
imprescindible para que realice su función. Este  $pK_a$  tan bajo supone que, a pH fisiológico, el grupo sulfhídrico esté ionizado, presentándose como anión  $S^-$ . En estas circunstancias el grupo sulfhídrico es extremadamente sensible a la oxidación por superóxido o por peróxido de hidrógeno (Weiss *et al.*, 1997; Denu y Dixon, 1998). La oxidación parcial produce primero ácido sulfénico (reversible por GSH) y, ante un exceso de ROS, ácidos sulfínico y sulfónico (irreversibles). En conjunto, todos estos procesos han hecho que se proponga la inhibición reversible de las PTPs como uno de los mecanismos más importantes de señalización celular por ROS (Östman y Böhmer, 2001; Sauer *et al.*, 2001; Chiarugi y Cirri, 2003; Winterbourn y Hampton, 2008).



**Figura 5:** Mecanismo catalítico de defosforilación realizado por las PTPs. **(A)** Esquema del sitio funcional de las PTPs, mostrando la cisteína catalítica y la arginina que ancla el fosfato. **(B)** Anclaje de la tirosina fosforilada y exposición del enlace fosfato-tirosina al ataque del grupo sulfhídrico de la cisteína. **(C)** El grupo sulfhídrico se une al fosfato y se produce la liberación de la tirosina libre. Un residuo aspartato modifica el enlace fosfato-cisteína. **(D)** Esta modificación facilita el ataque, por parte de una molécula de agua, al enlace fosfato-cisteína. Se produce la hidrólisis, con liberación del fosfato y un protón, y se regenera el sitio catalítico (modificado de Denu y Dixon, 1998).

A bajas concentraciones, tanto el superóxido (Barret et al., 1999) como el peróxido de hidrógeno (Denu y Tanner, 1998; Chiarugi *et al.*, 2003; Salmeen *et al.*, 2003) inactivan de forma reversible la cisteína catalítica de todas las PTPs estudiadas. De hecho, es muy posible que el verdadero inhibidor de las PTPs sea el peróxido de hidrógeno (Lee y Esselman, 2002; Cho *et al.*, 2004). Recientemente se ha descrito que el enzima SOD es esencial para la correcta inactivación de las PTPs durante la señalización por factores de crecimiento (Juarez *et al.*, 2008). Recordemos que la producción de superóxido tiene lugar fuera de la célula por parte de las NOX y este compuesto no difunde rápidamente a través de la membrana. Sin embargo, el producto de su dismutación (peróxido de hidrógeno), sí difunde de forma adecuada y tiene una vida media más larga.

Dado que las PTPs eliminan los fosfatos unidos a tirosinas, su función es la opuesta a la familia de enzimas denominadas tirosín-quinásas (TKs). En concreto, el grupo de receptores de membrana con actividad TKs (RTKs) es uno de los principales activadores de la supervivencia y proliferación celular (Mathews *et al.*, 2000). Muchas PTPs actúan como antagonistas en las rutas de señalización iniciadas por RTKs. Esta función es necesaria, no sólo para modular adecuadamente la señalización en presencia de ligando, sino también porque las RTKs presentan una cierta tasa de auto-activación en ausencia de su ligando (trans activación). Existe, por tanto, un cierto nivel de “ruido”, el cual eliminan las PTPs (Östman y Böhmer, 2001; Chiarugi y Cirri, 2003). La función fisiológica de las ROS como señalizadores parece ser la de bloquear al inhibidor (PTPs), promoviendo así la señalización (Lee y Esselman, 2002). Está demostrada la capacidad de los RTKs y de las proteínas G unidas a receptor para activar al complejo NOX a través de la quinasa Src y de Rac. De este modo, es posible asociar causalmente la generación de ROS en el complejo NOX con la activación de algunos receptores de membrana. Esta producción de ROS tendría una función reforzadora de las señales que se han iniciado en los receptores (ver Figura 6) (Parsons y Parsons, 2004; Bedard y Krause, 2007; Gianni *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2009).



**Figura 6:** Esquema del papel reforzador de las ROS en la ruta de señalización iniciada por los RTKs. Tras su activación, los RTKs señalizan rutas de supervivencia y proliferación. Una de estas rutas implica la activación de la quinasa Src. Una vez fosforilada, la quinasa Src activa a Rac, la cual se une a la membrana citoplasmática y activa al complejo NOX. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por la NOX difunde al citoplasma y oxida a la cisteína catalítica de muchas PTPs. Esta oxidación inactiva a las PTPs, lo que refuerza las señales desde los RTKs. La actividad catalítica de las PTPs se recupera con la reducción del grupo sulfenilo a sulfhídrico a través del GSH (modificado de Chiarugi y Cirri, 2003).

Como se puede observar en la Figura 6 la función del superóxido y, más probablemente, del peróxido es la de reducir la actividad de las PTPs para permitir que un menor grado de señalización desde los receptores de membrana sea suficiente para activar las distintas rutas de señalización (Rhee *et al.*, 2005). Al disminuir, por efecto indirecto de las ROS, el umbral necesario para activar la señalización, una señal más débil puede dar lugar a una cascada de transducción. Esta cascada, iniciada en los RTKs, culmina con la puesta en marcha de alguna respuesta por parte de la célula. Cuando se producen concentraciones fisiológicas de ROS, la inactivación de las PTPs es reversible. Rápidamente el potencial reductor celular, en forma de GSH y enzimas asociadas, revierte la situación y las PTPs comienzan a defosforilar tirosinas. Lógicamente, existen mecanismos de retroalimentación negativa que desensamblan el complejo NOX tras un cierto periodo después de su activación (Bokoch y Diebold, 2002; Bedard y Krause, 2007).

## 5. Ciclo celular y su modulación por ROS

La señalización que regula el ciclo de división celular es muy compleja. También en este ámbito se ha comprobado que las ROS juegan un papel fundamental en su modulación, ya que existe una sincronización entre la fase del ciclo celular y el  $E_C$  (Takahashi *et al.*, 2004; Boonstra y Post, 2004; Menon y Goswami, 2007; Hoffman, 2009). Muchas de las proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular poseen residuos susceptibles de ser modificados por las ROS. Conour *et al.* (2004) han descrito una serie de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular que son susceptibles de modulación redox. Por lo tanto, las modificaciones de  $E_C$  en las distintas fases del ciclo activan o inhiben determinadas rutas de señalización que permiten la progresión del mismo. Concretamente, se constata un aumento progresivo en la concentración intracelular de GSH conforme el ciclo avanza desde  $G_1$  hasta M. Una de las posibles razones para que sea necesario un ambiente celular más reducido hacia el final del ciclo es que así disminuye la probabilidad de generar un daño oxidativo en el material genético. Ya se comentó anteriormente (apartado 3) que el núcleo posee un potencial reductor mayor que el del citoplasma (Schafer y Buettner, 2001).

Aunque la evidencia apunta a que existe un incremento del potencial reductor conforme avanza el ciclo celular, paradójicamente parece que la señalización inicial para entrar en la fase S desde  $G_1$  tiene lugar a través de un cambio puntual hacia un potencial redox más oxidante en dicha fase  $G_1$  (Conour *et al.*, 2004; Iiyama *et al.*, 2006; Menon y Goswami, 2007). Se ha demostrado en varias líneas celulares, incluyendo células epidérmicas, que es necesario un aumento en la producción de peróxido de hidrógeno, y por tanto un ambiente oxidante, para inducir la entrada en la fase S del ciclo (Bae *et al.*, 1999; Havens *et al.*, 2006; Ram Na *et al.*, 2008). Se han realizado experimentos con células expuestas a elevadas concentraciones de N-acetilcisteína, compuesto que aumenta la concentración de GSH, para favorecer que  $E_C$  tome un valor más negativo. En las células incubadas con este compuesto se observó una importante prolongación de la fase  $G_1$  y la inducción de inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina (CDK), que son las

encargadas de promover el ciclo celular (Liu *et al.*, 1999; Menon *et al.*, 2003). Por lo tanto, un ambiente reductor parece favorecer la permanencia en G<sub>1</sub>. Por otra parte, cuando las células se incubaban con elevadas concentraciones de N-acetil-cisteína (20 mM), se inducía un potente proceso apoptótico en los cultivos. Sin embargo, en estos mismos cultivos, la administración de Trolox, un antioxidante que no aumenta la concentración de tioles intracelulares y no modifica el E<sub>C</sub>, no provocó bloqueo en la fase G<sub>1</sub>. Otros experimentos con células endoteliales de aorta de ratón, la sobreexpresión de catalasa también provocó un bloqueo en la fase G<sub>1</sub> (Onumah *et al.*, 2009). Parece claro, por tanto, que la señal de transición de la fase G<sub>1</sub> a S viene mediada por un cambio puntual pero imprescindible del potencial redox celular a un valor menos negativo (E<sub>C</sub> oxidante). Una vez se ha iniciado la fase de síntesis, el potencial redox celular toma valores cada vez más negativos (E<sub>C</sub> reductor) hasta alcanzar un mínimo durante la fase M. Se puede afirmar que existe un ciclo redox vinculado fisiológicamente al ciclo de división celular.

La transición G<sub>1</sub>/S parece el punto de regulación redox por excelencia durante el ciclo celular (Menon y Goswami, 2007). La familia de ciclinas D es la primera en activarse cuando la célula recibe la señalización adecuada, tanto interna como externa, para dividirse. De todas las ciclinas D la ciclina D1 es la más importante para señalar la entrada en fase S. Por lo tanto, el estudio de la modulación de la actividad de la ciclina D1 por ROS parece esencial para entender la regulación redox del ciclo celular. La ciclina D1 se une a CDK4/6 para hiperfosforilar al factor del retinoblastoma (Rb) de modo que éste se desensamble del factor de transcripción E2F, esencial para que comience la síntesis de DNA (Mathews *et al.*, 2000). La transición de G<sub>1</sub> a S activada por la ciclina D1 depende de la ruta de las quinasas ERK1/2 (*Extracellular Regulated Kinase 1/2*) pertenecientes a la familia de las MAP quinasas (*Mitogen Activated Protein Kinase*) (Villanueva *et al.*, 2007). La activación de otras rutas de MAPKs, como p38<sup>HOG</sup>, inhibe la activación de ciclina D1 (Lavoie *et al.*, 1996).

También se ha vinculado la producción fisiológica de ROS con la activación de la ciclina D1. La incubación de fibroblastos murinos con distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno provocó un aumento significativo en

la expresión de ciclinas D1 y D2 entre 3 y 5 h después del tratamiento (Martínez Muñoz *et al.*, 2001). Por otra parte, la incubación con N-acetilcisteína, como ya se comentó anteriormente, prolongó anormalmente la fase G<sub>1</sub>. Esta prolongación vino acompañada de un bloqueo muy notable de la actividad de la ciclina D1 y la ausencia de Rb en su estado hiperfosforilado (activo) (Menon *et al.*, 2003). Aún más llamativo fue el efecto de la sobreexpresión de NOX1 en células de epitelio pulmonar de ratón. Dicha sobreexpresión provocó un aumento en la proliferación celular, que coincidió con un incremento en los niveles de ciclina D1. La elevación en los niveles de ciclina fue dependiente de la activación del factor de transcripción AP-1 a través de la vía de ERK1/2 (Ranjan *et al.*, 2006). La incubación con catalasa o con DPI (difenilenoyodonio), un potente inhibidor de NOX, anularon totalmente el efecto proliferativo de la sobreexpresión de NOX en estos experimentos. También se ha demostrado que la activación de Rac1 conduce a un aumento de la expresión de la ciclina D1, al mismo tiempo que se produce un incremento en los niveles de ROS intracelulares. La incubación con DPI o con donadores de tioles, que aumentaban la concentración de GSH, anularon los efectos proliferativos de la sobreexpresión de Rac1 (Page *et al.*, 1999).

Todos estos resultados apuntan a que una de las consecuencias más importantes del cambio oxidante del E<sub>C</sub> para señalar la transición G<sub>1</sub>/S es, precisamente, el aumento en la expresión y actividad de la ciclina D1 (Burch y Heintz, 2005). Una vez que se ha señalado la entrada en la fase S, el E<sub>C</sub> vira de nuevo hacia valores reductores por las razones ya expuestas anteriormente. Una vez alcanzada la fase S, la célula es prácticamente independiente de la señalización externa para completar el ciclo de división.

## **6. Regulación de la cicatrización por ROS**

En un organismo adulto la proliferación celular tiene dos importantes funciones: la renovación de los tejidos con una elevada homeostasis y la regeneración de aquellos tejidos dañados. En la piel, concretamente, este último proceso recibe el nombre de cicatrización o “cierre de herida” (WH). Es un proceso complejo, que requiere de un cierto grado de desdiferenciación



celular y la participación de multitud de tipos celulares (fibroblastos, células del sistema inmune, plaquetas, células endoteliales y musculares lisas, etc.). Entre estos destacan las células de la epidermis, los queratinocitos. Habitualmente, cuando se produce una lesión externa, la epidermis es la región más dañada. Son los queratinocitos los encargados de generar muchas de las señales iniciales y de mantenimiento del proceso de WH (Werner *et al.*, 2007; Gurtner *et al.*, 2008). Actualmente, y debido a la importancia de este proceso regenerativo, se están evaluando toda una serie de procedimientos que permitan acelerar o mejorar el resultado del mismo (Ennis *et al.*, 2007; Gurtner *et al.*, 2008). Una de las aproximaciones más fructíferas está siendo la modulación del ambiente redox en la lesión. Se ha constatado que durante el proceso de WH aumenta la producción de ROS en las células encargadas de regenerar la piel, incluidos los queratinocitos (Duval *et al.*, 2003; Sen, 2003; Gordillo y Sen, 2003; Sen y Roy, 2008). El aumento de ROS favorece la secreción de dos de los más importantes factores implicados en el WH: el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y el VEGF (Spiekstra *et al.*, 2007; Werner *et al.*, 2007; Sen y Roy, 2008). El TGF- $\beta$  favorece la proliferación de los fibroblastos, así como su cambio morfológico a mio-fibroblastos y la secreción de matriz extracelular. El VEGF promueve la neovascularización del tejido, proceso esencial para permitir el abastecimiento de nutrientes, oxígeno y células del sistema inmune.

Un incremento de la oxigenación del tejido dañado y el aumento en la producción de ROS parecen ser, por tanto, dos de las opciones más adecuadas para favorecer el WH (Khanna *et al.*, 2002; Kairuz *et al.*, 2007; Eligini *et al.*, 2009). En este sentido las NOX son elementos imprescindibles para el correcto desarrollo del WH (Arbiser *et al.*, 2002; Ushio-Fukai, 2006; Bedard y Krause, 2007; Chan *et al.*, 2009). Tanto es así, que el proceso de WH queda prácticamente anulado en ratones transgénicos cuyos queratinocitos no expresan la proteína Rac1, esencial para el correcto ensamblaje y funcionamiento del complejo NOX (Tschardt *et al.*, 2007). Se comprobó que, tras lesionar la piel de estos ratones, los queratinocitos ni proliferaban (proceso dependiente del ensamblaje de NOX) ni migraban (proceso dependiente del citoesqueleto de actina).

A la vista del papel que tienen las ROS en el proceso de WH, sería de gran interés la búsqueda y aplicación de metodologías que aumenten su producción de forma moderada con el objetivo de incrementar la eficacia del proceso.

## **7. Efecto fotodinámico y oxígeno singlete**

Muchos compuestos químicos son capaces de transferir la energía de excitación tras absorber radiación luminosa. Después de cederla a otro compuesto vuelven a estar disponibles para volver a absorber energía y transferirla, sin que ellos mismos se consuman por acción de la luz. A este proceso se le denomina fotosensibilización, y a los compuestos que lo realizan fotosensibilizadores (FS). Un FS se comporta como un catalizador: absorbe la energía luminosa, la convierte en energía química, la cede a un segundo compuesto y vuelve a su estado original para iniciar un nuevo ciclo. Su función principal en fotoquímica es la de promover fotorreacciones de determinadas especies químicas que no son capaces de absorber radiación en un rango de interés. El FS, que sí absorbe la radiación en ese rango, cede la energía de excitación al compuesto que no presenta absorción, de modo que se consigue una pseudo-absorción. De ahí el nombre de fotosensibilización, ya que se consigue hacer “sensible” un compuesto a una determinada radiación que, en ausencia del FS, no le afectaría (Szacilowski *et al.*, 2005).

Para entender cómo se produce esta fotosensibilización se debe explicar brevemente el proceso de absorción de la energía luminosa. Se puede definir la radiación luminosa como la compuesta por las regiones ultravioleta (UV), visible (VIS) e infrarroja (IR) del espectro electromagnético. En estas regiones la radiación se comporta de acuerdo a la óptica clásica. Cuando un compuesto absorbe radiación en este rango lo hace en forma de paquete de energía o cuanto. Esto es debido a que la materia solamente puede realizar transiciones según determinados niveles de energía, y no de una forma arbitraria. A cada cuanto de energía luminosa absorbido o cedido se le denomina fotón. De forma general podemos decir que las transiciones energéticas que tienen lugar tras la

absorción de un fotón de radiación luminosa son debidas a los electrones más externos del compuesto que ha llevado a cabo la absorción. Así, un electrón en su estado de más baja energía (estado fundamental) pasa, tras absorber un fotón, a un estado de mayor energía (estado excitado). En este paso la energía electromagnética de la radiación se ha convertido en energía electroquímica. Tras un cierto periodo de tiempo el electrón vuelve a su estado fundamental, bien emitiendo otro fotón (fluorescencia), bien transformando la energía en calor. Sin embargo, si el compuesto excitado colisiona con otra especie química, antes de que el electrón se inactive, puede darse la posibilidad de que le transfiera la energía acumulada. Esto es precisamente lo que hace un FS. La especie que ha colisionado queda en estado excitado como si hubiese sido ella la que absorbió en un primer momento la radiación, y el FS retorna a su estado fundamental para volver a iniciar el ciclo.

Un proceso concreto de fotosensibilización es el denominado Efecto Fotodinámico (EF). Supone la activación del  $O_2$  mediante la transferencia de energía desde un colorante que absorbe en el rango UV-IR (DeRosa y Crutchley, 2002). Es un proceso muy utilizado en fotoquímica y síntesis química, aunque sólo se comentará aquí su aplicación en el campo de la biomedicina. En sentido estricto el EF supone la generación de dos estados excitados del  $O_2$ : el oxígeno singlete “delta” ( $^1O_2 \ ^1\Delta_g$ ) y el oxígeno singlete “sigma” ( $^1O_2 \ ^1\Sigma^+_g$ ) (Schweitzer y Schmidt, 2003). En sistemas biológicos se asume que se genera el singlete “delta” de forma exclusiva, dado que, por cuestiones de transferencia de energía vibracional, el singlete “sigma” se convierte rápidamente en singlete “delta” (Macdonald y Dougherty, 2001; DeRosa y Crutchley, 2002; Schweitzer y Schmidt, 2003). Por tanto, a partir de ahora nos referiremos al oxígeno singlete simplemente como  $^1O_2$  y se entenderá que se corresponde a la especie  $^1\Delta_g$ . El  $O_2$  fundamental o triplete no absorbe en el rango del VIS ni del UV cercano (UVA). Por lo tanto, para activarlo, es necesario el uso de FSs. Este es el fundamento del EF: utilizar un compuesto que absorba en el rango UVA-VIS para que ceda su energía electrónica al  $O_2$  fundamental y genere oxígeno singlete. El  $^1O_2$  es varios órdenes de magnitud más reactivo que el  $^3O_2$ , razón por la cual se le considera

una ROS (ver Figura 1). Debido a su carácter tan reactivo, su presencia en un medio biológico supone la rápida oxidación de las biomoléculas, por lo que genera graves daños que pueden provocar apoptosis o necrosis celular (Plaetzer *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 2009).

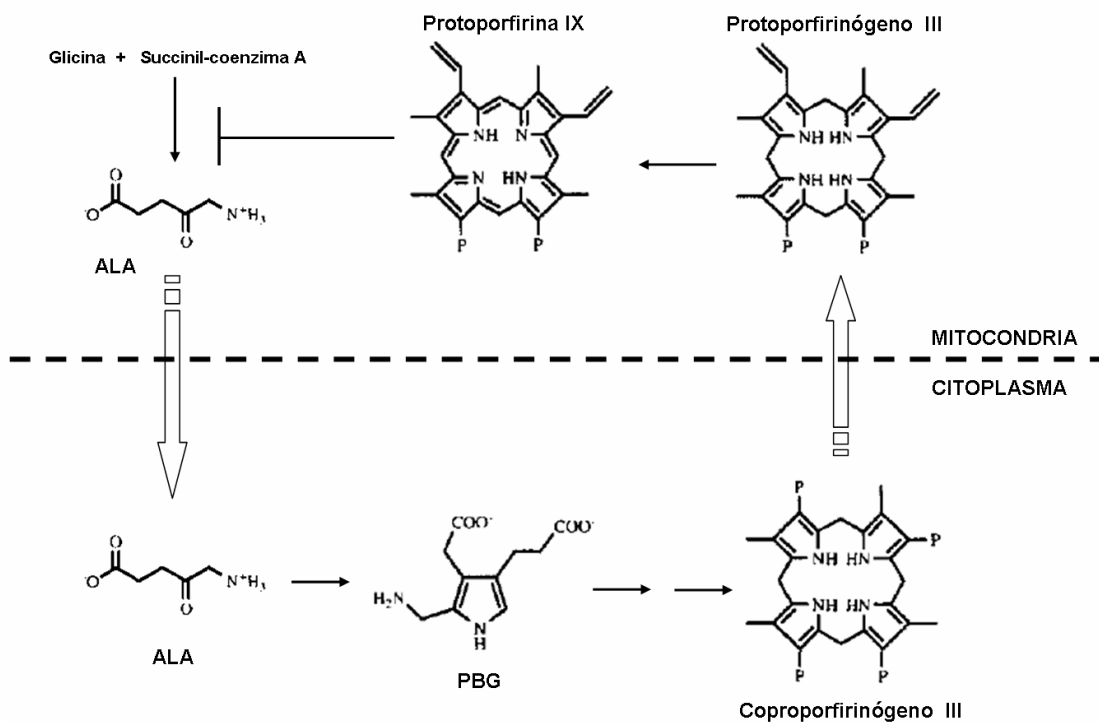
Esta activación del O<sub>2</sub> se empezó a utilizar en el tratamiento formal de distintas afecciones desde principios del siglo XX. El primer estudio lo llevó a cabo Oscar Raab, en 1900, al observar que paramecios expuestos a acridina y luz morían en el lapso de unos pocos minutos. Poco después, von Tappeiner obtuvo una remisión parcial de un tumor de piel utilizando eosina como FS y aplicando luz en 1903. Fue el propio von Tappeiner quien acuñó el término “efecto fotodinámico”. Durante los primeros años del siglo XX se generalizó en cierta medida el uso del EF para el tratamiento de diversas patologías, especialmente el cáncer. Su uso como elemento terapéutico recibió el nombre de Terapia Fotodinámica (Juzeniene *et al.*, 2007). Desde los años 30 hasta finales de los 60 la Terapia Fotodinámica cayó en desuso, sobre todo por la aplicación de otras terapias novedosas como la radioterapia o la quimioterapia. A finales de los 60 comenzó un lento resurgir de esta modalidad hasta que, en 1976, se publicó el primer artículo que identificaba al oxígeno singlete como el agente citotóxico responsable de la fotodestrucción de un tumor (Weishaupt *et al.*, 1976). A partir de ese momento cada vez más grupos de investigación y centros médicos han usado el EF y la Terapia Fotodinámica como herramientas para el tratamiento de distintas patologías, principalmente aplicadas a la eliminación de tumores (Macdonald y Dougherty, 2001; Villanueva *et al.*, 2003; Plaetzer *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 2009).

En los últimos años la Terapia Fotodinámica está teniendo especial éxito en el tratamiento de lesiones cancerosas y precancerosas en piel (Allison *et al.*, 2006; Juarranz *et al.*, 2008). Para estos tratamientos se están utilizando una familia de compuestos químicos relacionados con el ácido 5-aminolevulínico o ALA (Allison *et al.*, 2006; Juzeniene *et al.*, 2007; Platzer *et al.*, 2009).

## 8. Efecto fotodinámico mediante el uso del ácido 5-aminolevulínico y derivados

El uso del ALA en Terapia Fotodinámica se debe a que este compuesto es el precursor metabólico en la ruta de biosíntesis del grupo hemo, que es la unidad funcional de los citocromos celulares. Los citocromos actúan como transportadores de electrones en muchas proteínas y complejos enzimáticos (Mathews *et al.*, 2000). El ALA es el primer metabolito en la ruta de síntesis de las porfirinas celulares, ruta que se esquematiza en la Figura 7. Esta ruta presenta una serie de reacciones que transcurren tanto en la mitocondria como en el citoplasma. El enzima limitante del proceso es el ALA sintetasa, el primer enzima de la ruta, que al unir el grupo hemo bloquea la síntesis de ALA (Fotinos *et al.*, 2006). Si se administra exógenamente un exceso de ALA se elimina el paso limitante de la ruta y se produce un exceso de síntesis porfirínica. Dado que, como ya se comentó con anterioridad, la concentración de hierro intracelular es muy baja, la cantidad de Protoporfirina IX (Pp IX) que llega a quelar hierro para formar hemo también es baja. En consecuencia la célula se satura de Pp IX, que es un potente FS de oxígeno singlete (Uehlinger *et al.*, 2000; Juzeniene *et al.*, 2004; Krammer y Platzter, 2008).

Los primeros ensayos con ALA como precursor de la Pp IX para uso en Terapia Fotodinámica tuvieron lugar a principios de los años 90 del siglo XX (Kennedy *et al.*, 1990; Kennedy y Pottier, 1992). Pronto se convirtió en uno de los compuestos más utilizados en Terapia Fotodinámica, sobre todo para el tratamiento de lesiones cutáneas (Clark *et al.*, 2003; Allison *et al.*, 2006; Krammer y Plaetzer, 2008).



**Figura 7:** Esquema de la síntesis de la Pp IX. La ruta comienza en la mitocondria con la producción de ALA a partir de glicina y succinil-coenzima A. Este paso está regulado negativamente por la propia concentración de Pp IX. A continuación el ALA es exportado al citoplasma, donde da lugar al porfobilinógeno (PBG). La fusión de cuatro moléculas de PBG dan lugar a un anillo porfirínico. Tras varias modificaciones del anillo se obtiene el Coproporfirinógeno III. Este compuesto vuelve a la mitocondria, dando lugar al Protoporfirinógeno III. La reducción de esta última molécula genera la Pp IX (modificado de Fotinos *et al.*, 2006). P representa un grupo propionato.

También se está investigando el uso de derivados alifáticos del ALA para mejorar los rendimientos en la síntesis de Pp IX en células y tejidos. De entre ellos destaca el éster metilado del ALA, metil-ALA o MAL, que posee un mayor carácter apolar y menor hidrofilia que el ALA (Uehlinger *et al.*, 2000; Fotinos *et al.*, 2006). Estas características hacen que penetre más rápidamente en las células incubadas con el compuesto. Una vez que ha penetrado en el citoplasma, el MAL pierde el grupo metilo por acción de las esterasas celulares. Se convierte en ALA y se inicia la síntesis de Pp IX. La concentración final de Pp IX viene a ser muy parecida tras la incubación con ALA o MAL. Sin embargo, dicha concentración se alcanza antes al aplicar MAL (Fotinos *et al.*, 2006). Tanto el ALA como el MAL están aprobados para su uso tópico en el tratamiento de tumores de piel en Estados Unidos y Europa, respectivamente (Juzeniene *et al.*, 2007; Plaetzer *et al.*, 2009).

Además de su aplicación en Terapia Fotodinámica, tanto el ALA como el MAL se utilizan ampliamente en el estudio del EF en biología celular (Theodossiou y MacRobert, 2002; Karrer *et al.*, 2003; Uzdensky *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2006; Sailer *et al.*, 2007). En este sentido el MAL es un compuesto que presenta una citotoxicidad muy baja, es soluble en medio acuoso y no supone la administración de xenobióticos a los cultivos celulares. Existen datos publicados referentes la aplicación del MAL como precursor de la Pp IX para el tratamiento de la piel fotoenvejecida, donde se han obtenido excelentes resultados de regeneración cutánea (Zane *et al.*, 2007). En este trabajo se ofrece también un resumen de los diversos estudios de regeneración cutánea tras la aplicación de Terapia Fotodinámica usando el ALA para el tratamiento de diversas lesiones malignas y premalignas. En todos los casos un elevado porcentaje de las personas tratadas mostraron una mejora en la piel tratada.

Teniendo en cuenta estos resultados, y lo comentado anteriormente acerca del papel de las ROS en el proceso de WH, consideramos que es de gran interés el estudio de procesos dirigidos al aumento de la proliferación celular y optimización de la cicatrización mediante generación de ROS. En este sentido, el desarrollo de un modelo *in vivo*, a partir de los resultados obtenidos en queratinocitos humanos en cultivo a los que se les ha sometido a un tratamiento fotodinámico (TFD) moderado, supondrá una herramienta muy interesante para estudiar en profundidad el proceso de WH.





## **OBJETIVOS**

---



## Objetivos

Las ROS parecen tener un papel relevante en la proliferación celular y el proceso de regeneración. Recientes investigaciones demuestran que las ROS, en concreto el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, forman parte del repertorio de segundos mensajeros celulares. Por otra parte, los tratamientos fotodinámicos proporcionan una metodología adecuada para generar ROS de forma controlada en células en cultivo. Por todo esto, el **objetivo general** del presente trabajo consiste en estudiar los efectos a nivel celular de un tratamiento fotodinámico moderado en células HaCaT, utilizando como FS la propia Pp IX sintetizada en las células mediante la incubación con MAL y excitada posteriormente con luz roja.

Para alcanzar el objetivo general propuesto se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la producción intracelular de Pp IX y de ROS inducidas por la incubación con MAL y el tratamiento fotodinámico, respectivamente.
2. Determinar el efecto del tratamiento fotodinámico sobre la proliferación celular y sobre distintos marcadores de proliferación.
3. Determinar los posibles cambios en el citoesqueleto tras la aplicación del tratamiento fotodinámico.
4. Comparar los efectos del tratamiento fotodinámico con los inducidos por la incubación de las células con peróxido de hidrógeno, agente capaz de estimular la proliferación celular a bajas concentraciones.
5. Estudiar algunas de las rutas de señalización celular, como el complejo NOX y la quinasa Src, involucradas en el efecto modulador del tratamiento fotodinámico sobre la proliferación celular.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. MATERIALES

### 1.1 Línea celular

La línea celular utilizada en este estudio, HaCaT, es una línea celular establecida que procede de queratinocitos humanos que resultaron inmortalizados espontáneamente mediante su incubación a una alta temperatura y una baja concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio de cultivo (Boukamp *et al.*, 1988). Son células que conservan la gran mayoría de las características de queratinocitos humanos primarios y son atumorigénicas tras su inyección en ratones atómicos (Boukamp *et al.*, 1988; Boukamp *et al.*, 1997; Fusenig y Boukamp, 1998). Presentan un aspecto poligonal, crecen en forma de monocapa y poseen una notable estabilidad cromosómica. Esta línea celular mantiene una adecuada síntesis de queratinas, así como un fenotipo epidérmico prácticamente normal, incluso después de más de 300 pases (Boukamp *et al.*, 1997; Fusenig y Boukamp, 1998).

### 1.2 Materiales de cultivo

El medio de cultivo se preparó a partir de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (Penicilina G [10.000 U/ml] y sulfato de estreptomicina [10.000  $\mu\text{g/ml}$ ]), todos ellos obtenidos de Gibco (UK). La tripsina (0.05%)-EDTA, se obtuvo también de Gibco.

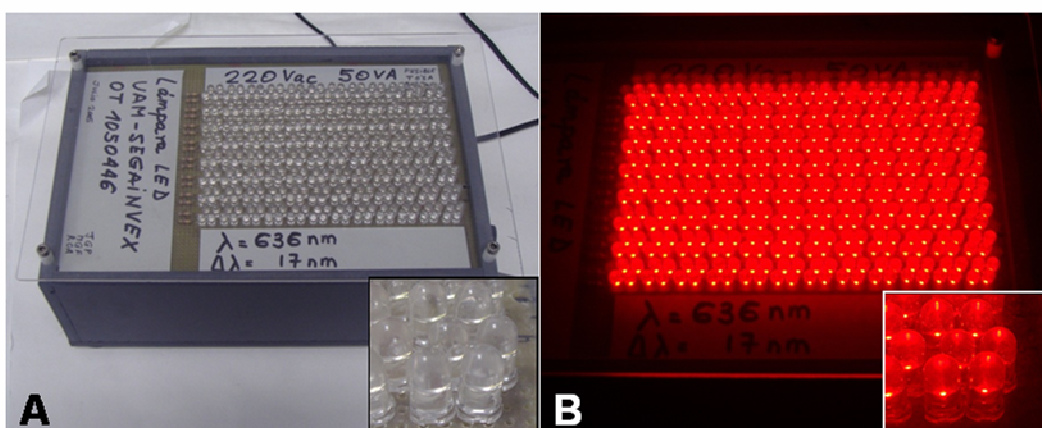
Los cultivos se realizaron en frascos de 25  $\text{cm}^2$  (F25) (Falcon, Becton Dickinson, USA), en placas multipocillo P-6 (Costar, USA), P-12 (Falcon) o P-24 (Falcon), o en placas Petri de 35 mm de diámetro (Corning, USA). Para los ensayos de inmunofluorescencia, los cultivos se realizaron sobre cubreobjetos de vidrio estériles (Menzel-Gläser, Alemania).

### 1.3 Condiciones de cultivo

Las líneas celulares se incubaron con DMEM suplementado con SFB al 10% y antibióticos al 1% (medio completo). Los cultivos se mantuvieron en un incubador HERAcCell (Heraeus, Kendro, Alemania) a 37° C de temperatura, con una concentración de CO<sub>2</sub> del 5% y una humedad relativa del 95%. Las células fueron utilizadas para los experimentos entre el tercer y el séptimo pase tras su descongelación. Las células congeladas se almacenaron a -80° C hasta el momento de su uso.

### 1.4 Fuente de irradiación

La fuente de iluminación utilizada en los experimentos estaba constituida por una matriz rectangular de diodos emisores de luz (LEDs) en número total de 384 (ver Figura 8). Los LEDs (modelo WP7143 SURC/E, Kingbright, USA) presentan su pico de emisión a 636 nm, con un ancho de banda de  $\pm 17$  nm. Las medidas del espectro de emisión se realizaron con un espectrómetro para UV-VIS-IR (Fiberoptic, Avantes, Holanda). La irradiancia de la fuente luminosa a una distancia de 2 cm (distancia de exposición de los cultivos celulares) es de 6,2 mW/cm<sup>2</sup>, medida con una fotocélula (PAR 190 Li-1000, Li-Cor, USA).



**Figura 8:** Fuente de irradiación utilizada en los protocolos experimentales. En (A) se muestra una fotografía de la fuente apagada, donde se puede observar el conjunto total de LEDs que componen el irradiador. En el inserto se muestra un detalle de los LEDs. En (B) se muestra la fuente encendida, junto con un detalle en el inserto.



## 1.5 Productos químicos

El PBS (Phosphate Buffered Saline) fue suministrados por Gibco. El metil- $\delta$ -aminolevulinato hidrocloreuro (MAL), 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro (MTT), Höchst 33258 (Ho), difenilenoyodonio cloruro (DPI), 4-amino-5-(4-clorofenil)-7-(t-butil)pirazolo[3,4-d]pirimidina (PP2), 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO), 5(6) carboxifluoresceína diacetato N-succinimidil ester (CFSE), Fura-2 pentakis (acetoximetil) ester (Fura-2 AM) y óxido de deuterio 99% (D<sub>2</sub>O) fueron suministrados por Sigma (USA). La 2,7-dicloro-dihidrofluoresceína diacetato (DHF-DA) y la protoporfirina IX disodio fueron obtenidas de Fluka (Suiza). El kit para analizar el ciclo celular (PI/Rnase) se obtuvo de Immunostep (España). Los medios de montaje utilizados han sido Vectashield (Vector, USA) para montajes acuosos y DePeX (Serva, USA) para montajes definitivos. El Triton X-100 se obtuvo de Hopkin & Williams (UK). El dimetil-sulfóxido (DMSO), el formaldehído 37% v/v y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30% v/v fueron suministrados por Panreac (España).

## 1.6 Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en los experimentos se detallan en la Tabla 4:

Antígeno	Origen	Casa comercial
$\alpha$ -tubulina	Ratón (monoclonal)	Sigma
Ki-67	Conejo (policlonal)	Abcam
Ciclina D1	Ratón (monoclonal)	Novocastra
VEGF	Conejo (policlonal)	Abcam
IgG de ratón-FITC	Cabra (monoclonal)	Sigma
IgG de ratón-Alexa 488	Cabra (monoclonal)	Molecular Probes
IgG de conejo-FITC	Cabra (monoclonal)	FluoProbes
IgG de conejo-Alexa 488	Cabra (monoclonal)	Molecular Probes

**Tabla 4:** Anticuerpos utilizados en los experimentos. Se especifica el antígeno, el origen del anticuerpo, si es mono- o policlonal y la casa comercial de la que se obtuvo.

Faloidina: Aunque no es propiamente un anticuerpo, la faloidina es un oligopéptido que presenta una afinidad altamente específica por la actina filamentosa. Por tanto, se usó faloidina marcada con isotiocianato de tetrametil-rodamina (TRITC) (Sigma) para la detección por fluorescencia de la actina filamentosa y la evaluación de los microfilamentos.

## **2. Metodología**

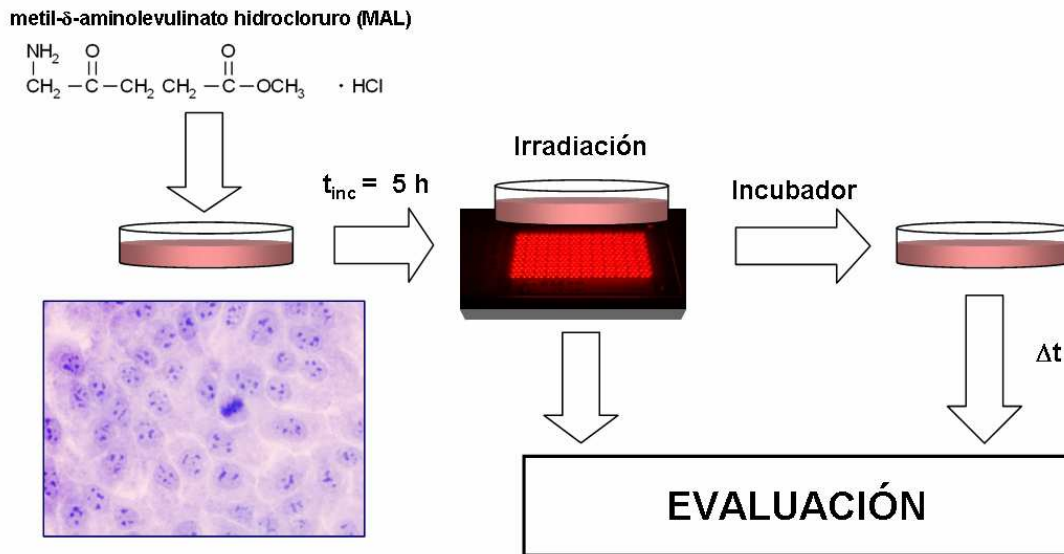
### **2.1 Estudio espectroscópico de la Pp IX**

Se diluyó Pp IX en DMSO a una temperatura de 50° C. Una vez que la disolución se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó aún más con DMSO hasta alcanzar una concentración final de Pp IX de 10 µM. A partir de alícuotas de esta disolución, se midió el espectro de absorción del compuesto en la región situada entre los 300 y los 700 nm. Los datos de absorción se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601 (Shimadzu, Japón). Para medir los espectros de excitación y de emisión del compuesto se utilizó un espectrofluorímetro Perkin-Elmer 650-10S (Perkin-Elmer, USA). Para el registro de la curva de excitación se tomó una longitud de onda de emisión fija de 635 nm y se midió la intensidad de emisión a dicha longitud de onda para una banda de excitación desde 370 hasta 660 nm. El ancho de banda del registro fue de 5 nm. Para obtener el espectro de emisión se excitó la muestra a una longitud de onda de 405 nm y se registró la emisión desde los 600 hasta los 720 nm.

### **2.2 Protocolo experimental de irradiación**

El protocolo experimental de fotosensibilización se realizó, por lo general, en cultivos celulares con una confluencia del 50% - 70%. Las células se sembraron en F25, placas multipocillo (6, 12 o 24 pocillos), o placas Petri individuales en función de la evaluación posterior al tratamiento fotosensibilizante. Cuando fue necesario, las células fueron crecidas sobre cubreobjetos de vidrio estériles.

Las células fueron incubadas con MAL a distintas concentraciones, partiendo de una disolución madre de MAL (10 mM) en agua destilada. La disolución madre se preparaba cada dos semanas y se almacenaba a 4° C en oscuridad. En todos los casos se alcanzó la concentración final de MAL diluyendo la disolución madre en DMEM sin suero. Las células fueron incubadas durante 5 h con DMEM (controles) o con DMEM-MAL (experimentales) (ver Figura 9).



**Figura 9:** Esquema del protocolo de irradiación habitual. Los cultivos celulares fueron incubados con MAL 0,1 mM durante 5 h. Después se irradiaron durante 10 minutos con luz roja. Tras la exposición a la luz los cultivos fueron evaluados directamente, o bien se lavaron, se les añadió medio completo fresco y fueron devueltos al incubador. Pasado un determinado plazo de tiempo ( $\Delta t$ ) se llevó a cabo la evaluación. En la fotografía se muestra un ejemplo del aspecto de las células HaCaT (tinción con azul de toluidina).

Las placas con los cultivos se situaron sobre el irradiador de LEDs. El tiempo de irradiación fue de 10 minutos. Este tiempo de irradiación, teniendo en cuenta la irradiancia de la fuente, equivale a una dosis de 3,72 J/cm<sup>2</sup>. Tras el periodo de irradiación, se eliminó el medio de incubación y se lavó dos veces con DMEM. Finalmente, las células se incubaron con medio completo y se devolvieron al incubador hasta el momento de su evaluación. Tras el tratamiento fotodinámico, las células se mantuvieron en oscuridad para evitar la fotoactivación de la Pp IX. Los controles fueron tratados de igual modo que los grupos experimentales excepto que fueron colocados sobre el irradiador apagado.

### **2.3 Detección de la Pp IX en cultivos celulares**

Las células fueron crecidas en F25 e incubadas con distintas concentraciones de MAL: 0,1, 0,5 y 1 mM. Tras la incubación, las células fueron lavadas con PBS y tripsinizadas. El medio con las células en suspensión se sometió a centrifugación durante 10 minutos a 2000 rpm. Tras la centrifugación se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas y fijadas con una disolución de formaldehído al 3,7% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. La suspensión celular se centrifugó nuevamente (5 minutos, 2000 rpm), se eliminó el fijador y se resuspendió en PBS. Las suspensiones celulares se almacenaron a 4° C en oscuridad, por lo general entre 12 y 24 h, hasta el momento de su evaluación. La medida de la emisión de la Pp IX se llevó a cabo en un citómetro de flujo Cytomics FC500 (Beckman Coulter, USA). Se utilizó la línea de excitación de 620 nm y se evaluó la emisión a 670 nm.

También se determinó la síntesis de Pp IX en cultivos celulares expuestos a distintas concentraciones de MAL mediante microscopía de fluorescencia. Las muestras fueron evaluadas inmediatamente tras la incubación. Los controles fueron incubados sólo con DMEM. Todas las manipulaciones tras la incubación fueron realizadas en ausencia de luz. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus BX-61. Se utilizó la línea de excitación de 546 nm.

### **2.4 Detección de ROS en cultivos celulares**

Se utilizaron concentraciones de MAL de 0,1 y 1 mM. Durante la última hora de incubación con MAL, se añadió una alícuota de DHF-DA en etanol (0,5% v/v) para alcanzar una concentración final de DHF-DA en el medio de incubación de 5 µM. A continuación se irradiaron las células durante 10 minutos. Tras la irradiación, las células fueron lavadas con PBS y tripsinizadas. El medio con las células en suspensión se sometió a centrifugación durante 10 minutos a 2000 rpm. Tras la centrifugación se eliminó el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas y fijadas con una disolución de formaldehído al

3,7% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó nuevamente la suspensión (5 minutos, 2000 rpm), se eliminó el fijador y se resuspendió en PBS. Las suspensiones celulares se almacenaron a 4° C entre 12 y 24 h, hasta el momento de su evaluación. Los controles fueron tratados de la misma manera pero fueron incubados 5 h sólo con DMEM. La evaluación de la emisión de la DF se llevó a cabo en un citómetro de flujo Cytomics FC500. Se utilizó la línea de excitación de 488 nm y se evaluó la emisión a 540 nm.

También se determinó la producción de ROS en cultivos celulares expuestos a distintas concentraciones de MAL mediante microscopía de fluorescencia. Las células fueron sometidas al mismo procedimiento experimental ya detallado para la evaluación de ROS mediante citometría. Tras la incubación, se lavó con PBS y las muestras fueron evaluadas inmediatamente. Todas las manipulaciones tras la incubación e irradiación fueron realizadas en ausencia de luz. Las imágenes fueron obtenidas utilizando el microscopio de fluorescencia. Se utilizó la línea de excitación de 435 nm.

## **2.5 Ensayo de viabilidad celular del MTT**

El ensayo de viabilidad celular por reducción del MTT es una medida de la población celular ampliamente utilizado. Se fundamenta en la reducción intracelular del MTT (hidrosoluble) a formazán (liposoluble) que se acumula en el interior de las células. Tras un cierto periodo de incubación con MTT las células son lisadas por exposición a DMSO, que al mismo tiempo solubiliza el formazan. Como el formazán es un producto coloreado, la densidad óptica del volumen de DMSO utilizado para lisar las células estará en relación directa con el número total de células que redujeron el MTT a formazán. Por lo tanto, el ensayo permite estimar la cantidad de células en un cultivo. Para determinados experimentos, en los que se midió la viabilidad celular hasta 96 h después del tratamiento fotosensibilizante, fue necesario partir de cultivos de células con menor confluencia ( $\approx$  40%) de la habitual para no alcanzar el 100% antes de la finalización de la medida. Tras la irradiación se añadió medio completo a los cultivos. A distintos tiempos post-tratamiento, las células fueron incubadas durante 2 h con MTT (1 mg/ml) a una concentración final de 50  $\mu$ g/ml. Tras este

periodo, se eliminó el medio y se añadió una alícuota de DMSO para lisar las células y solubilizar el formazán formado. La medida colorimétrica del formazán se realizó mediante un lector de placas SpectraFluor (Tecan, Suiza). Se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 542 nm.

## **2.6 Medida del índice mitótico**

El índice mitótico (IM) de una población celular se define como el número de células que se encuentra en cualquiera de las fases del proceso de mitosis dividido por el número total de células (interfases + mitosis) en un campo determinado. La evaluación del IM se realizó mediante determinación por inmunofluorescencia del citoesqueleto de tubulina mediante anticuerpos y contratiñendo la cromatina con Ho, o bien, sólo tiñendo la cromatina con Ho. Después de un periodo variable (24 h – 96 h) tras la aplicación del protocolo de irradiación, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con metanol 95% a -20° C durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS y se incubaron 1 h con el anticuerpo primario anti- $\alpha$ -tubulina (dilución 1:200 en PBS-BSA 0,5%) en una cámara húmeda. Tras la incubación, se lavaron las muestras con PBS y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón-Alexa-488 (dilución 1:100 en PBS-BSA 0,5%), en una cámara húmeda. Después se lavó con PBS y se incubó 5 minutos con Ho (1:200 en PBS) en oscuridad. Posteriormente, las muestras se lavaron nuevamente con PBS y, finalmente, con agua destilada antes de montar. El montaje se realizó con medio Vectashield y las muestras se almacenaron a -20° C en oscuridad durante 24 h. Alternativamente, se procedió a utilizar el mismo protocolo pero tiñendo únicamente la cromatina con Ho. El recuento se llevó a cabo mediante el conteo de las poblaciones celulares en el microscopio de fluorescencia, utilizando la línea de excitación de 435 nm para la tubulina y la línea de 365 nm para la visualización de la cromatina teñida con Ho.

## **2.7 Evaluación de los cuerpos de Flemming**

Los cuerpos de Flemming, o cuerpos residuales, son estructuras compuestas por microtúbulos, que unen a las células hijas resultantes de una mitosis durante un cierto tiempo tras la citocinesis. Estas estructuras permiten estimar el porcentaje de divisiones que tuvieron lugar en las horas previas a la fijación de las células en cultivo. La medida de los cuerpos de Flemming se realizó siguiendo el mismo protocolo que para la medida del IM mediante el marcaje de la tubulina. Se hizo un recuento del número de cuerpos residuales y se dividió por el número total de células del campo.

## **2.8 Recuento de células Ki-67 positivas**

Tras el periodo correspondiente después del tratamiento fotosensibilizante, las muestras se fijaron con formaldehído 3,7% en PBS durante 15 minutos. Después de esto, las muestras se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario anti-Ki-67 durante 1 h en cámara húmeda. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG-FITC de conejo durante 1 h en cámara húmeda. Después las muestras se lavaron con PBS y un último lavado con agua destilada. Por último se realizó el montaje con Vectashield y las muestras se almacenaron a -20° C durante 24 h antes de la evaluación. Ésta se realizó mediante el microscopio de fluorescencia.

## **2.9 Medida de la proliferación celular mediante marcaje con CFSE**

Las células fueron incubadas con medio sin SFB para favorecer la sincronización del ciclo celular 24 h antes de la aplicación del tratamiento fotosensibilizante. Inmediatamente después del tratamiento experimental las células fueron expuestas a un pulso (10 minutos) de CFSE (1 mM en DMSO) a una concentración final de 10  $\mu$ M. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS, tripsinizadas y fijadas siguiendo el mismo protocolo que para la medida de ROS mediante citometría de flujo (sección 2.4). La evaluación de la pérdida de señal del marcador fluorescente se realizó a distintos tiempos tras la

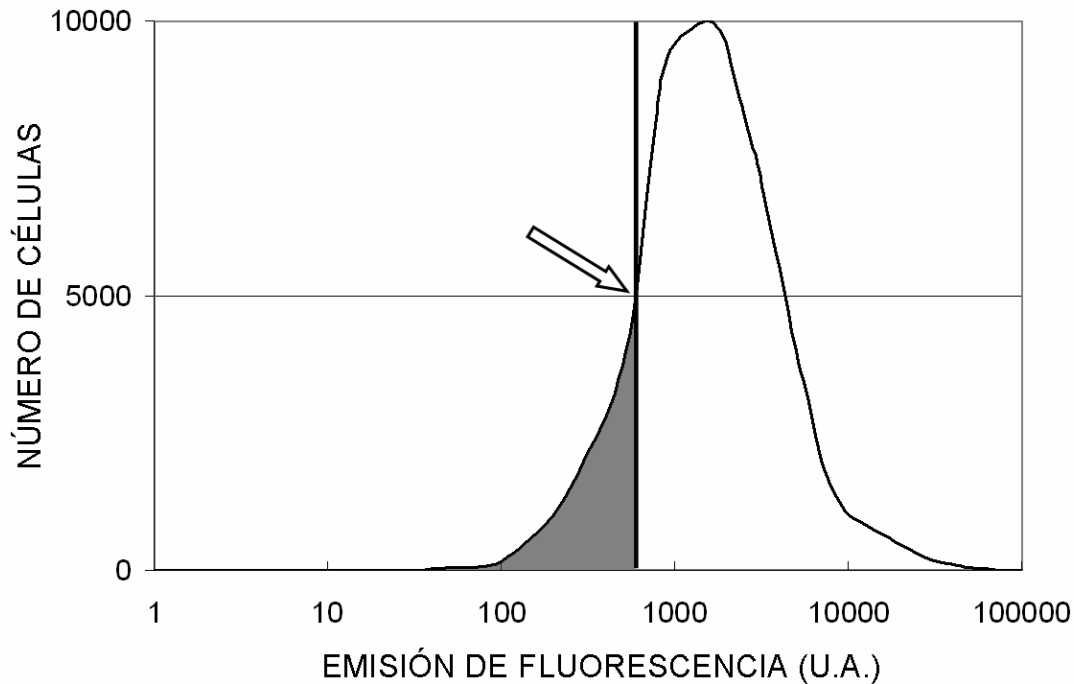
irradiación (24h – 48 h). Dicha evaluación se realizó con un citómetro de flujo Cytomics FC500, usando la línea de excitación de 488 nm.

Además de evaluarse el promedio de la señal fluorescente del CFSE a distintos tiempos tras el protocolo experimental de irradiación, también se estudiaron los cambios en la forma de la curva para los mismos tiempos. Se definió un parámetro relacionado con la velocidad de proliferación denominado “frente de proliferación” (ver Figura 10). La distribución de la emisión fluorescente de la población celular estudiada es aproximadamente como una curva normal. Debido a que la señal fluorescente disminuye con el número de divisiones celulares que han tenido lugar desde el marcaje, las células que menos emiten son aquellas que más rápido han proliferado. Esta subpoblación se localiza en la región de menor emisión de la distribución. Si se toma un valor de emisión determinado en el eje de abscisas, siempre el mismo para todas las muestras, y se mide el porcentaje de células que quedan por debajo de este valor, se pueden medir diferencias en la tasa de proliferación celular. Este porcentaje de menor emisión es el denominado “frente de proliferación”.

## **2.10 Evaluación del ciclo celular**

A determinados intervalos (24 h – 48 h) tras el tratamiento, los cultivos fueron tripsinizados y las células se centrifugaron (2000 rpm, 10 minutos), eliminándose el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento celular en una disolución de etanol 75% en agua a -20° C durante 5 minutos para su fijación y permeabilización. Seguidamente, las células se centrifugaron (2000 rpm, 5 minutos) para eliminar el fijador y, a continuación, se lavaron con PBS. De nuevo se centrifugó el sedimento (2000 rpm, 5 minutos), se eliminó el PBS y se incubó con la disolución del kit de Immunostep para evaluación del ciclo celular. Las muestras se mantuvieron en oscuridad y a 4° C hasta su posterior evaluación. Para evaluar el ciclo celular se usó un citómetro de flujo Cytomics FC500, excitando con la línea de 488 nm.





**Figura 10:** Parámetros utilizados para la determinación del “frente de proliferación” mediante marcaje con CFSE. Se muestra un esquema de la típica distribución obtenida por citometría de flujo para un marcaje con CFSE. Las células con menor emisión (parte izquierda de la distribución) son las que más rápido han perdido la señal y, por tanto, las que más ciclos de división han llevado a cabo. Si se toma el punto de corte entre el número de células correspondientes al 50% del máximo de la distribución con la propia curva (flecha) y se traza una línea vertical que pase por ese punto de corte, la superficie debajo de la curva queda dividida en dos sectores. Midiendo el área de la superficie del sector de la izquierda se puede estimar el porcentaje de células que han proliferado más rápido. A esta superficie, expresada como porcentaje de la superficie total bajo la curva, se la ha denominado “frente de proliferación”.

## 2.11 Análisis de la expresión de ciclina D1

Para sincronizar los niveles de ciclina D1, las células fueron incubadas con medio sin SFB durante las 24 h previas al protocolo experimental de irradiación. La recogida de muestras se realizó entre 0 h y 18 h tras el tratamiento. Las células fueron lavadas con PBS y tripsinizadas. Las muestras fueron centrifugadas 10 minutos a 2000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en formaldehído al 3,7% en PBS durante 5 minutos. Se centrifugó de nuevo (2000 rpm, 5 minutos), se desechó el sobrenadante y las células fueron permeabilizadas incubándolas 30 minutos con una disolución de Tritón X-100 0,1% en PBS. Tras la permeabilización, las muestras fueron

centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos, eliminándose el sobrenadante. A continuación se incubó con el anticuerpo primario anti-ciclina D1 (1:200 en PBS-BSA 0,5%) durante 1 h. Tras la incubación, las muestras se centrifugaron a 2000 rpm (5 minutos), se recuperó el sobrenadante y se lavó con PBS. Se centrifugó nuevamente a 2000 rpm (5 minutos), se desechó el PBS y se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG-FITC de ratón (1:100 en PBS-BSA 0,5%) durante 1 h. Por último, las células fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en PBS hasta el momento de la medida. Las muestras fueron almacenadas en oscuridad a 4° C hasta ese momento. La evaluación se realizó en el citómetro de flujo Cytomics FC500.

## **2.12 Análisis de la expresión intracelular de VEGF**

Antes de realizar el protocolo experimental de irradiación, las células fueron incubadas 24 h en medio sin SFB para reducir al mínimo los niveles intracelulares de VEGF. A distintos tiempos tras el tratamiento (0 h – 8 h) se realizó el mismo protocolo que para medir la expresión de ciclina D1 (sección 2.11), excepto que se usó un anticuerpo primario anti-VEGF (1:200 en PBS-BSA 0,5%) y un secundario anti-IgG-FITC de conejo (1:100 en PBS-BSA 0,5%). La cuantificación se realizó en el citómetro de flujo Cytomics FC500.

## **2.13 Caracterización del citoesqueleto de actina**

Para estudiar los posibles cambios en la distribución de la actina filamentosa tras la aplicación del tratamiento fotosensibilizante, se sembraron células sobre cubreobjetos de vidrio estériles dentro de placas Petri de 35 mm. A distintos tiempos después del tratamiento (0 – 90 minutos) las células fueron lavadas con PBS y fijadas con formaldehído 3,7% en PBS durante 15 minutos. Después se lavó con PBS y se permeabilizó incubando 30 minutos con Tritón X-100 0,1 % en PBS. Las células se lavaron con PBS y se incubaron con faloidina-TRITC (1:200 en PBS) durante 30 minutos en cámara húmeda. A continuación, las células se lavaron con PBS y se incubaron con Ho (1:200 en PBS) durante 5 minutos en oscuridad. Tras este paso, se lavó con PBS y se

realizó un último lavado con agua destilada. Las muestras se montaron con Vectashield y se almacenaron durante 24 h a  $-20^{\circ}$  C antes de su evaluación microscópica en el microscopio de fluorescencia, utilizando una longitud de onda de excitación de 546 nm.

#### **2.14 Medida de los cambios en la concentración de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular**

La siembra se realizó en placas Petri de 35 mm con cubreobjetos de vidrio estériles. En la última hora de incubación con MAL, las células fueron tratadas con Fura-2 AM (1 mM en DMSO) a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ . Antes de la irradiación las células fueron lavadas con PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$ . Todas las medidas de fluorescencia se realizaron en PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  con glucosa 1 mM para mantener las condiciones fisiológicas del tampón durante la evaluación. Las células fueron fotografiadas con el microscopio de fluorescencia, utilizándose una longitud de onda de excitación de 365 nm.

#### **2.15 Doble tratamiento fotodinámico**

Se quiso analizar el efecto de un doble tratamiento fotodinámico sobre los cultivos celulares. Para ello se utilizaron células con una confluencia en torno al 40%. Se aplicó un protocolo de irradiación y se realizaron medidas de viabilidad celular e IM. A las 48 h se repitió el protocolo de irradiación y se evaluaron la viabilidad celular y el IM, hasta 96 h después de la primera irradiación. Los resultados fueron comparados con cultivos que sólo habían recibido un tratamiento fotosensibilizante.

#### **2.16 Efecto de la privación de suero**

Se estudió el efecto de una reducción en la concentración del suero tras la aplicación del tratamiento fotosensibilizante. El protocolo se realizó cuando las células presentaron una confluencia en torno al 40%. Después del tratamiento, el medio completo que se añadió a las células se preparó con distintas concentraciones de suero (0% - 10%). Posteriormente, se midieron la viabilidad celular y el IM hasta 96 h después del tratamiento fotosensibilizante.

## **2.17 Comparación entre el tratamiento fotosensibilizante y la exposición a peróxido de hidrógeno**

Se utilizaron condiciones análogas a las del protocolo experimental de irradiación. Las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no fueron incubadas con MAL ni sometidas a irradiación. Los cultivos fueron expuestos a distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M – 10<sup>-2</sup> M) diluido en DMEM. Para equiparar lo máximo posible ambos protocolos (tratamiento fotosensibilizante y exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), la incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> duró 10 minutos, la misma duración que la exposición a la luz tras la incubación con MAL (periodo de fotogeneración de ROS). Después las células fueron lavadas con PBS, se les añadió medio completo y se incubaron a 37° C hasta el momento de realizar las medidas de viabilidad celular e IM. Ambos tratamientos, fotosensibilización e incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se llevaron a cabo a la vez y en paralelo para minimizar variaciones poblacionales.

## **2.18 Evaluación del oxígeno singlete como fuente de ROS durante el tratamiento fotosensibilizante**

Para investigar si las ROS producidas durante el tratamiento fotosensibilizante procedían del oxígeno singlete, se utilizaron dos compuestos que modifican la actividad del <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Por una parte los cultivos se incubaron con DABCO, un potente inactivador del oxígeno singlete. Durante la última hora de incubación con MAL se añadió una alícuota de DABCO (0,1 mM) en DMEM. La disolución de DABCO se preparó fresca para cada experimento. Terminado el tiempo de incubación se realizó el protocolo experimental sin más modificaciones.

Por otro lado, para aumentar la actividad del <sup>1</sup>O<sub>2</sub> se utilizó óxido de deuterio (D<sub>2</sub>O). El D<sub>2</sub>O inactiva con menor eficiencia al <sup>1</sup>O<sub>2</sub> que el H<sub>2</sub>O. Por lo tanto, aumenta su vida media, la distancia de difusión y su probabilidad de oxidar a los compuestos orgánicos. Durante las 4 primeras horas del protocolo experimental las células se incubaron con DMEM-MAL 0.1 mM. En la última hora de incubación el medio fue sustituido por un medio isotónico compuesto

por D<sub>2</sub>O (90%), PBS 10x (10%), glucosa 1 mM y MAL 0.1 mM. La irradiación se realizó siguiendo el protocolo convencional. Tras la irradiación, las células se lavaron con PBS y se incubaron con medio completo hasta el momento de la evaluación.

## **2.19 Inhibidores de rutas de señalización celulares**

El difenilenoyodonio (DPI) es un inhibidor de las flavoenzimas, incluida la familia de las NOX. Durante las 5 h de incubación con MAL los cultivos fueron expuestos a DPI (1 mM en DMSO) a una concentración final de 1 µM. El resto del protocolo se llevó a cabo sin cambios.

La 4-amino-5-(4-clorofenil)-7-(t-butil) pirazolo [3,4-d] pirimidina (PP2) es un potente inhibidor de la quinasa Src. Al igual que con el DPI, la incubación con PP2 (1 mM en DMSO) a una concentración final de 5 µM se produjo al mismo tiempo que la incubación con MAL. No se realizaron cambios durante el resto del protocolo.

## **2.20 Recuento de micronúcleos**

Con objeto de determinar un posible efecto clastogénico del tratamiento fotosensibilizante, se procedió a realizar un recuento de micronúcleos. Estas estructuras compuestas de cromatina y membrana nuclear surgen de una migración inadecuada de los cromosomas durante la metafase/anafase, por la pérdida de la región centromérica o por la fragmentación de un cromosoma. Los micronúcleos aparecen como estructuras esféricas o elípticas, positivas para la tinción de la cromatina pero separadas físicamente del núcleo celular. Su tamaño suele ser una 100 veces menor que el del núcleo. Su recuento se considera una medida adecuada de daño cromosómico (Fenech, 2000). Para realizar la evaluación se siguió el mismo protocolo que para el recuento del IM (sección 2.6).

### **3. Tratamiento de los datos**

#### **3.1 Observación microscópica**

Las imágenes microscópicas fueron obtenidas utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus BX-61 (Olympus, Japón) con una cámara CCD DP70 (Olympus) acoplada al mismo.

#### **3.2 Tratamiento de imágenes**

Los programas utilizados para el tratamiento de imágenes han sido Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems Inc., USA) e ImageJ 1.32j (NIH, USA).

#### **3.3 Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos se ha realizado con el programa SPSS 15.0.1 (SPSS Inc., USA). Para la comparación estadística de los datos se han utilizado las pruebas t de Student (comparación entre dos variables) o el análisis de varianza –ANOVA- (comparación de 3 o más variables). Como prueba de homocedasticidad se utilizó el estadístico de Levene. Como prueba comparativa *post hoc* se utilizó el estadístico de Bonferroni. La significación estadística se situó en un  $p < 0.05$ . Los datos se han representado como la media  $\pm$  una desviación típica de al menos tres experimentos.

## **RESULTADOS**

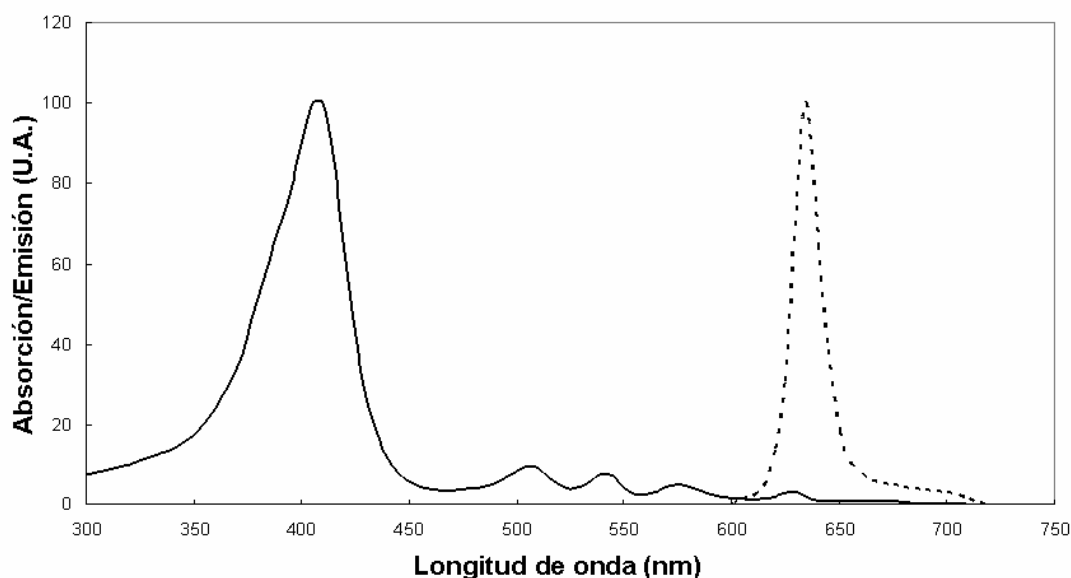
---





## 1. Características espectrales de la Pp IX

La Pp IX presenta un espectro de absorción con varios picos en la región del VIS a las siguientes longitudes de onda: 407, 506, 542, 574 y 630 nm (Figura 11). También se muestra en la figura el espectro de emisión fluorescente excitando a una longitud de onda de 405 nm. La máxima emisión se produce a una longitud de onda de 635 nm, con una cola que alcanza hasta los 720 nm. Comparando los picos de absorción se observa que ésta es mucho más intensa en la región del violeta (banda de Soret), en torno a los 400 nm, en relación a los demás picos en el VIS (bandas Q), como corresponde al espectro de absorción de una porfirina típica (Juzeniene *et al.*, 2004).



**Figura 11:** Espectro de absorción (línea continua) y de emisión fluorescente (línea discontinua) de la Pp IX disuelta en DMSO ( $[Pp IX] = 10 \mu M$ ). El espectro de emisión se obtuvo excitando la disolución de Pp IX con luz de 405 nm.

En la Tabla 5 se muestran los valores de los coeficientes de extinción molar para los cinco picos de absorción de la Pp IX en DMSO, siendo el coeficiente de absorción molar de la banda de Soret un orden de magnitud mayor que los coeficientes del resto de los picos que se encuentran en el VIS.

Longitud de onda (nm)	Coefficiente de extinción molar (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
405	98400
506	10000
542	7900
574	5400
630	3200

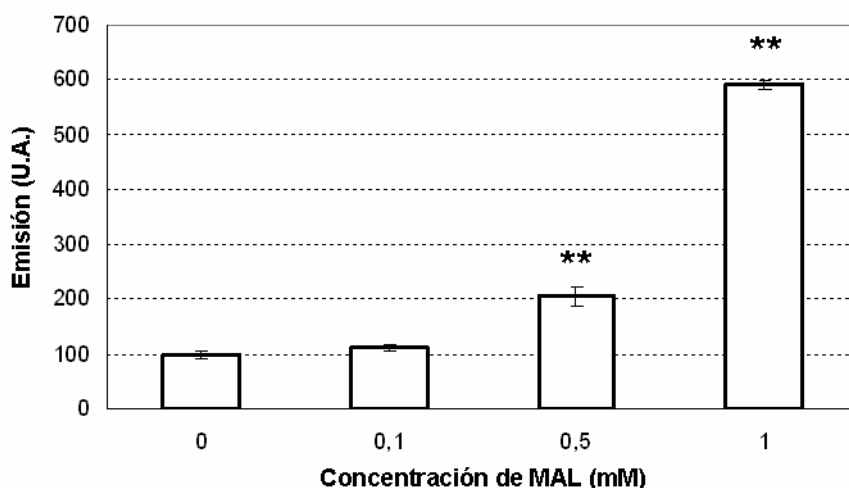
**Tabla 5:** Coeficientes de absorción molar (M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) correspondientes a cada uno de los picos de absorción de la Pp IX mostrados en la Figura 11.

Debido a la intensa absorción de la Pp IX en la región violeta del espectro, sería preferible excitar al compuesto con luz de esa longitud de onda. Sin embargo, debido a la alta absorción de los tejidos en casi todo el rango del VIS, se hace necesario excitar a la Pp IX en la región situada entre los 600 y los 650 nm (Krammer y Plaetzer, 2008; Plaetzer *et al.*, 2009). En estudios *in vitro* no existen impedimentos para excitar con luz azul y violeta, pero es preferible utilizar radiación roja para poder extrapolar los resultados obtenidos a las situaciones en que se irradia un tejido.

## 2. Medida de la producción de Pp IX y ROS en cultivos celulares

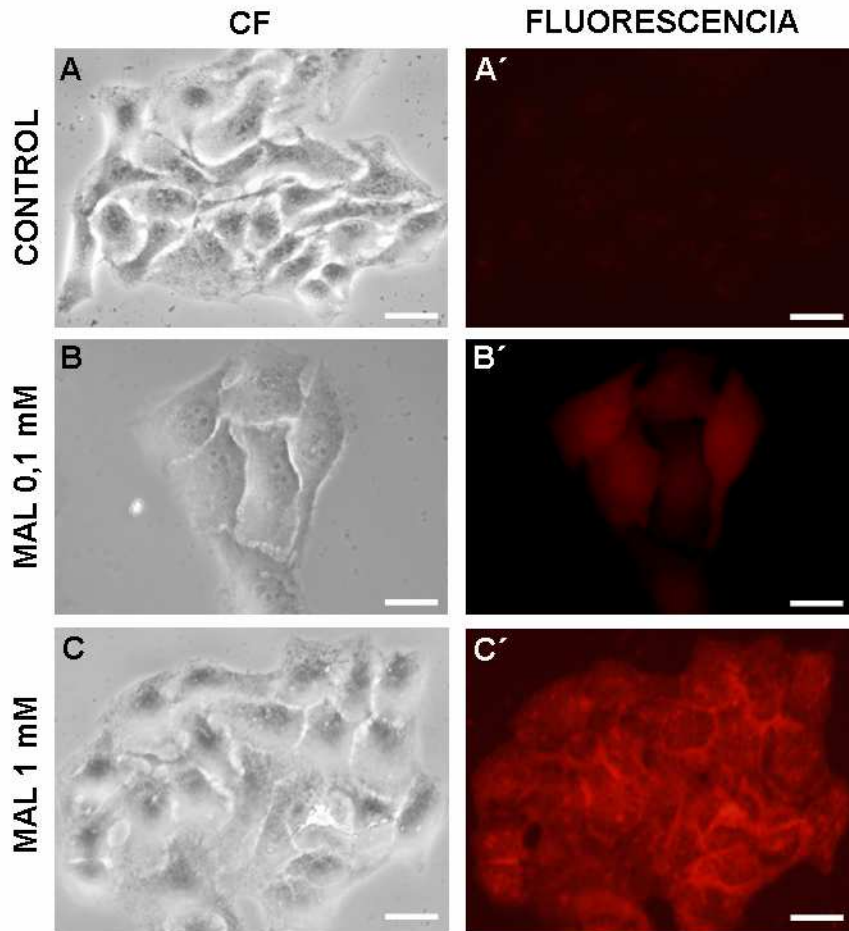
### 2.1 Medida de la producción endógena de Pp IX

Las células fueron incubadas con distintas concentraciones de MAL durante 5 h para poner de manifiesto el aumento en la producción endógena de Pp IX. La medida de la emisión de la Pp IX tras la incubación, obtenida mediante citometría de flujo, se muestra en la Figura 12. Tras la incubación con MAL 0,5 o 1 mM se registró un aumento significativo de la producción de Pp IX comparada con los controles ( $p < 0,01$ ). La incubación con MAL 0,1 mM provocó un leve aumento de la producción de Pp IX, aunque ésta se situó en el límite de la significación estadística en comparación con las células control ( $p < 0,1$ ). Por tanto, la producción endógena de Pp IX es dependiente de la concentración de MAL con la que han sido incubadas las células.



**Figura 12:** Medida de la emisión ( $\lambda=670$  nm) de la Pp IX intracelular en células HaCaT. Las células fueron incubadas con distintas concentraciones de MAL durante 5 h. La emisión se registró excitando a una longitud de onda de 620 nm. \*\*  $p < 0,01$ .

En la Figura 13 se muestran imágenes de contraste de fase (CF) y de la emisión fluorescente de la Pp IX en células HaCaT incubadas 5 h con dos concentraciones de MAL (0,1 y 1 mM), bajo luz de excitación de 546 nm. Los controles mostraron una pequeña señal de fluorescencia (Figura 13A'), probablemente debida a la Pp IX y otras porfirinas que sintetizan todas las células para producir citocromos. Las imágenes de fluorescencia de las células incubadas con concentraciones crecientes de MAL muestran que la emisión de la Pp IX se incrementó conforme aumentó la concentración de MAL (Figuras 13B' y C'). La señal de fluorescencia fue de tipo difuso, aunque parecía haber una mayor emisión en la región perinuclear. También se observó una emisión más intensa en las zonas de contacto entre células adyacentes, sobre todo en cultivos incubados con MAL 1 mM (Figura 13C').

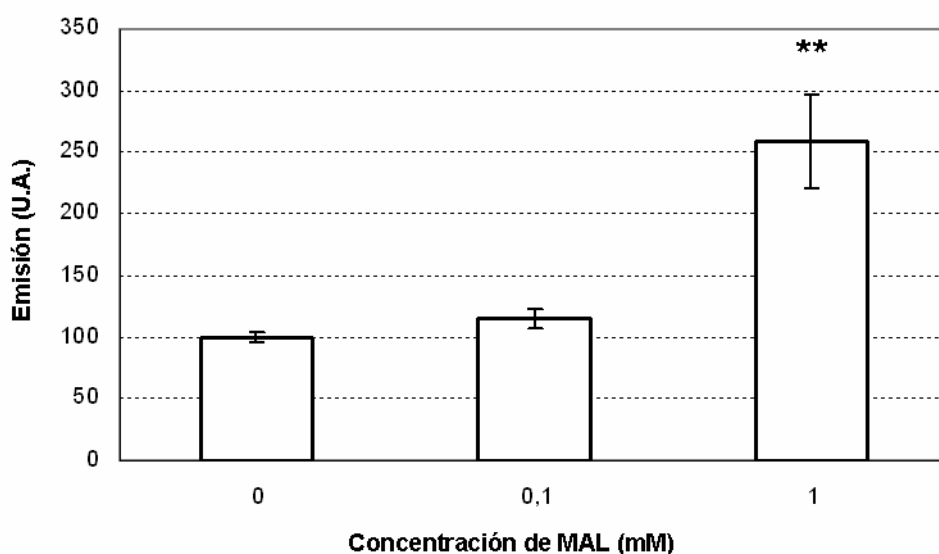


**Figura 13:** Imágenes de fluorescencia de células HaCaT incubadas con MAL. A la izquierda se muestran las fotografías tomadas en contraste de fase (CF). A la derecha aparecen las imágenes de la emisión de la Pp IX excitando a una longitud de onda de 546 nm. Barras de escala: 20  $\mu$ m.

## 2.2 Cuantificación de la producción intracelular de ROS

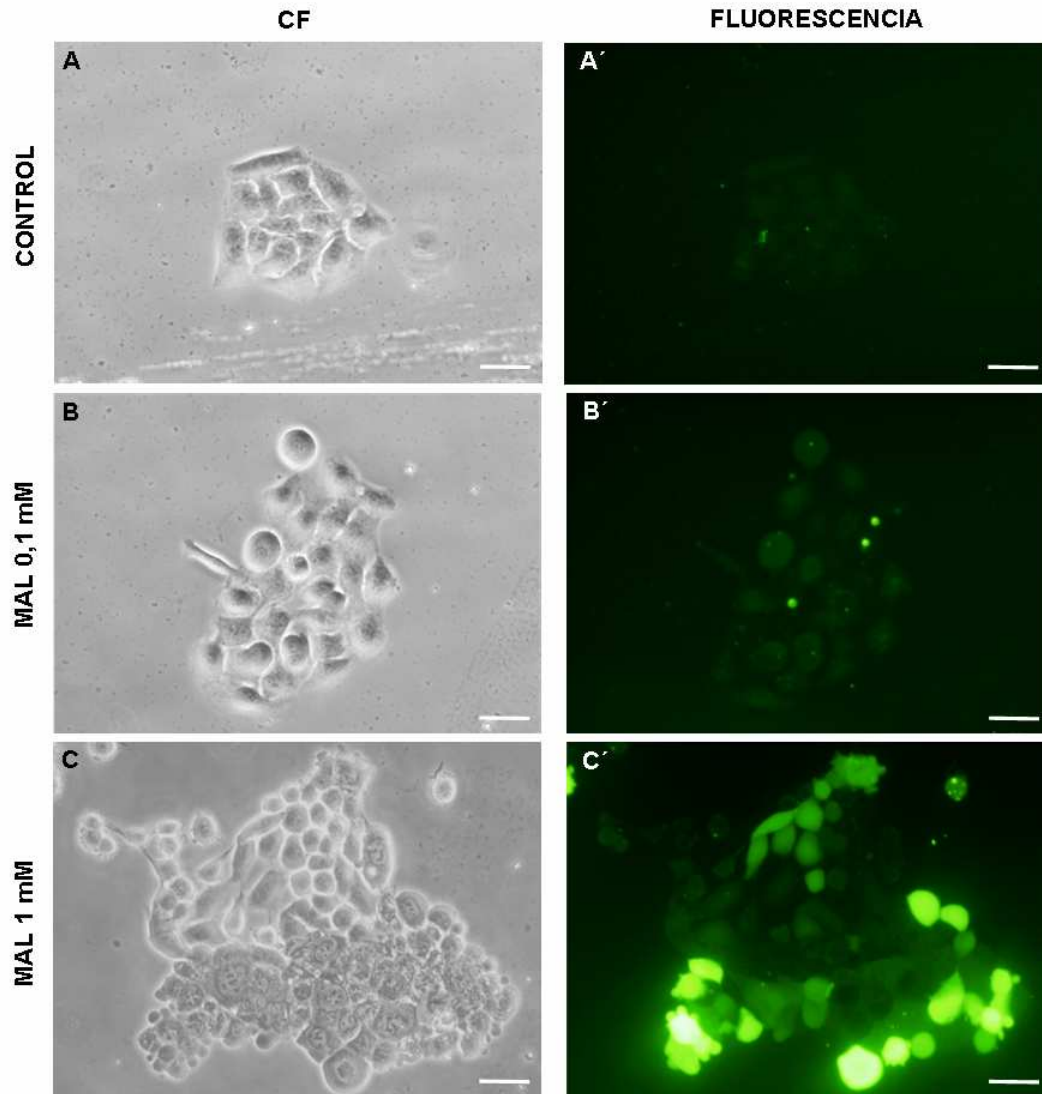
También se investigó la producción fotodinámica de ROS en células incubadas con MAL e irradiadas con luz roja, empleando la DF como sensor fluorescente de las ROS. Tras ser incubados con dos concentraciones de MAL, las células fueron irradiadas durante 10 minutos. La emisión de la DF aumentó proporcionalmente a la concentración de MAL con la que fueron incubadas las células (Figura 14). Las células incubadas con 0,1 mM de MAL mostraron un leve incremento de la emisión de la DF, en el límite de la significación estadística ( $p < 0,1$ ). Tras la incubación con MAL 1 mM, la producción

intracelular de ROS fue significativamente mayor que en las células control ( $p < 0,01$ ).



**Figura 14:** Producción fotodinámica de ROS en células HaCaT. La producción intracelular de ROS se obtuvo registrando la emisión fluorescente de la DF incorporada por las células. \*\*  $p < 0,01$ .

Se estudió la producción de ROS intracelular mediante imágenes de la emisión fluorescente de la DF (Figura 15). Las células fueron incubadas con dos concentraciones de MAL (0,1 y 1 mM) e irradiadas con luz roja. Inmediatamente después del tratamiento fotosensibilizante fueron fotografiadas en el microscopio de fluorescencia. Los controles apenas presentaron señal fluorescente de la DF, probablemente debida a la producción endógena de ROS y a que la DF también genera  $^1O_2$  cuando es excitada (Figura 15A'). Las células incubadas con MAL 0,1 mM presentaron una señal de fluorescencia mayor que la observada en las células control (Figura 15B'). Aunque la morfología celular fue normal, las células aparecieron más refringentes y redondeadas en CF comparadas con los controles (Figura 15B). El tratamiento fotosensibilizante tras la incubación con MAL 1 mM provocó un notable incremento en la producción de ROS, como mostró la fuerte señal de emisión de la DF (Figura 15C'). Observadas en CF, las células mostraron graves alteraciones en su morfología, típicas de un tratamiento fotodinámico dañino (Figura 15C). Se observó una relación entre el grado de daño celular y el nivel de emisión fluorescente de la DF, que indica una mayor concentración de ROS.



**Figura 15:** Células HaCaT incubadas con distintas concentraciones de MAL e irradiadas posteriormente con luz roja durante 10 minutos. Se muestran las células en contraste de fase (CF) y la emisión fluorescente del sensor de ROS, la DF. Se observó un incremento de la emisión de la DF conforme aumentó la concentración de MAL a la que fueron expuestos los cultivos celulares. La excitación de la DF se realizó con luz de 435 nm. Barras de escala: 20  $\mu$ m.

### 3. Evaluación del tratamiento fotodinámico sobre la proliferación celular

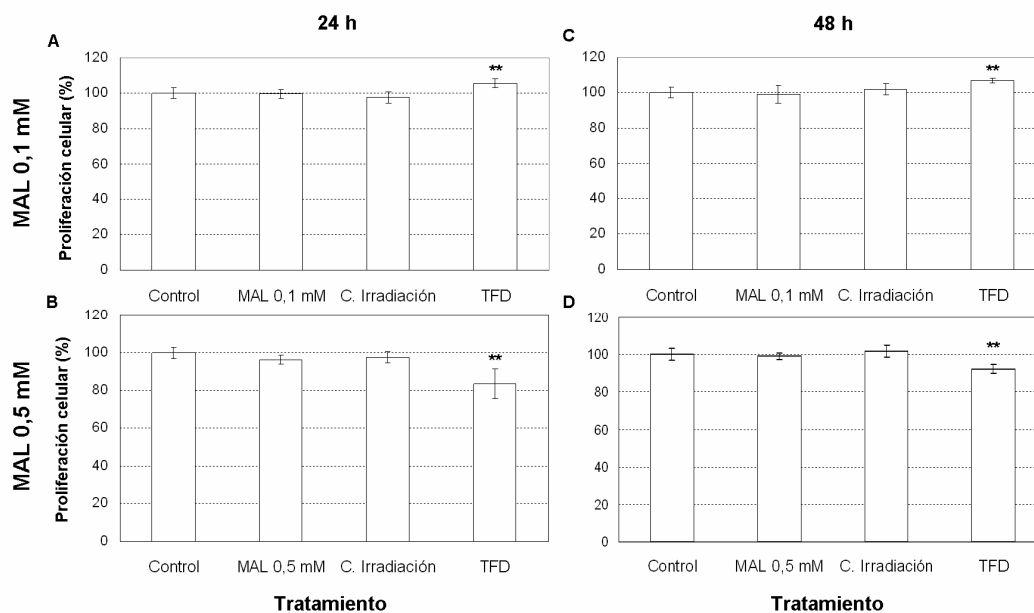
#### 3.1 Medida de la proliferación celular mediante el ensayo del MTT

Se realizaron medidas de proliferación celular mediante el ensayo del MTT, que permite estimar la población celular de un cultivo. Se evaluaron dos TFDs moderados, que consistieron en la incubación con MAL 0,1 o 0,5 mM durante 5 h seguida de 10 minutos de irradiación, para estudiar su efecto sobre la proliferación celular. Las medidas de proliferación se realizaron a las 24 y 48 h después de los tratamientos experimentales. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16.

El TFD tras incubar con MAL 0,1 mM ocasionó un incremento significativo en la proliferación celular a las 24 h post-tratamiento (Figura 16A). Este incremento significativo se mantuvo a las 48 h, aunque la proliferación no aumentó por encima del valor de las 24 h (Figura 16C). Las células incubadas con MAL 0,5 mM e irradiadas posteriormente mostraron un descenso significativo de la proliferación a las 24 h del tratamiento (Figura 16B). La proliferación se recuperó levemente a las 48 h después del tratamiento, pero continuó siendo significativamente menor que la del control. La incubación con MAL (0,1 o 0,5 mM) durante 5 h, o la irradiación con luz roja durante 10 minutos, no dieron lugar a cambios significativos en la proliferación celular comparados con las células control.

Los resultados obtenidos mediante el ensayo del MTT mostraron que el TFD más suave (incubación con MAL 0,1 mM) estimuló la proliferación celular. Por esta razón, se ha denominado a esta condición experimental tratamiento fotoestimulante (TFE), mientras que las condiciones fotodinámicas más intensas, con mayores concentraciones de MAL, se han seguido denominando TFDs.

## Resultados



**Figura 16:** Efecto de las distintas condiciones experimentales sobre la proliferación celular de células HaCaT. En la parte superior se muestra la proliferación celular después de un TFD tras la incubación con MAL 0,1 mM. En la parte inferior se muestra la proliferación después de un TFD tras la incubación con MAL 0,5 mM. \*\*  $p < 0,01$ .

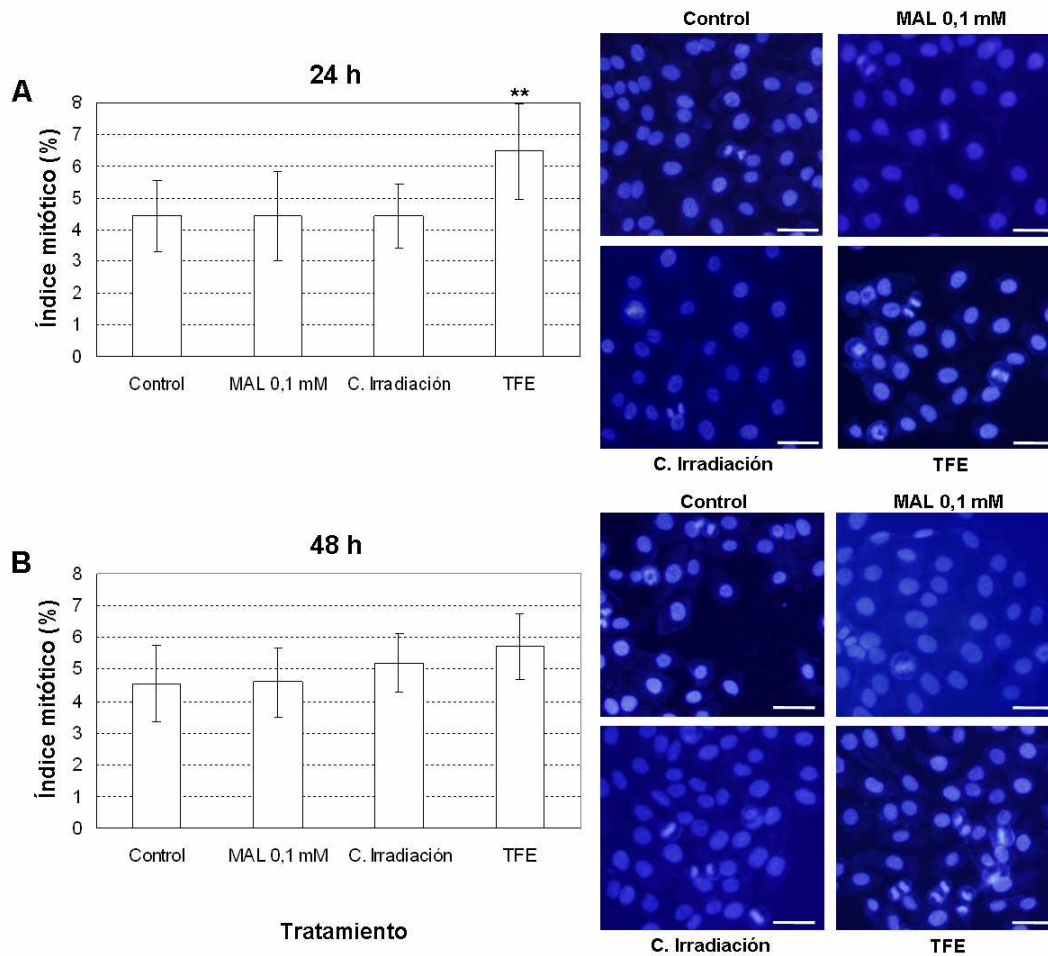
### 3.2 Medida del índice mitótico

Para establecer si los resultados obtenidos mediante el ensayo del MTT tras el tratamiento fotosensibilizante con MAL 0,1 mM (TFE) se correspondían con una mayor tasa de división celular, se realizó un recuento del número de mitosis después de este tratamiento. Los resultados obtenidos a las 24 h y 48 h se muestran en la Figura 17.

El promedio de células en división en los controles fue de un 4,42% a las 24 h. No se registraron diferencias significativas entre los controles, los cultivos expuestos sólo a MAL 0,1 mM 5 h o los irradiados durante 10 minutos. Sí se observó un aumento significativo del porcentaje de células en mitosis a las 24 h del tratamiento cuando se compararon las células sometidas al TFE con las control (6,46% frente a 4,42%). Por lo tanto, el número de mitosis aumentó un 46% en las células HaCaT 24 h después del TFE. A las 48 h, ninguna de las condiciones analizadas mostró un incremento significativo del IM, aunque las células sometidas al TFE todavía presentaron un IM del 5,70% frente al 4,55% del control. A la derecha de cada gráfica se muestran imágenes del aspecto de



los núcleos de células HaCaT para cada una de las condiciones experimentales, observándose una morfología nuclear normal en todos los casos. Asimismo, las células en mitosis no presentaron husos anormales, tanto a las 24 h como a las 48 h. Las imágenes muestran ejemplos de campos representativos como en los que se llevó a cabo el recuento mitótico para realizar las evaluaciones mostradas en la Figura 17.

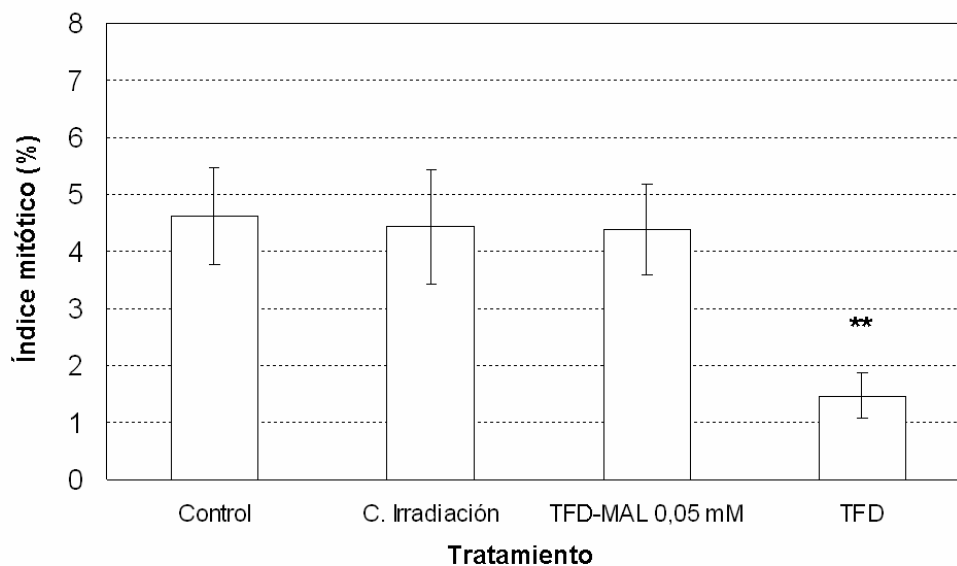


**Figura 17:** Recuento de los IM 24 h (A) y 48 h (B) después de los distintos tratamientos. Sólo las células sometidas a TFE mostraron un incremento significativo en el IM a las 24 h del tratamiento. A la derecha de las gráficas se muestran imágenes de fluorescencia (tinción con Ho), donde se puede observar la morfología de los núcleos celulares. Barras de escala: 25 µm. \*\*  $p < 0,01$ .

## Resultados

Para evaluar si las condiciones seleccionadas para el TFE eran las más adecuadas para estimular la proliferación celular, se realizaron recuentos del IM tras aplicar tratamientos fotosensibilizantes más suaves o más intensos que el TFE. Las células fueron incubadas con una concentración de MAL de 0,05 mM (TFD-MAL 0,05 mM) o de 0,5 mM (TFD). Los resultados obtenidos a las 24 h de los tratamientos se muestran en la Figura 18.

El TFD con MAL 0,05 mM no dio lugar a cambios significativos en el IM (4,39%) cuando se comparó con las células control (4,62%). Sin embargo, el TFD con MAL 0,5 mM provocó una disminución significativa del IM (1,47%) a las 24 h del tratamiento. Estos resultados indican que la incubación con MAL 0,1 mM (Figura 17) parece una condición experimental adecuada para inducir un incremento del IM en las células HaCaT.



**Figura 18:** Recuento del IM 24 h después de un TFD con MAL 0,05 mM o un TFD con MAL 0,5 mM. El TFD-MAL 0,05 mM no ocasionó cambios significativos en el IM. Sin embargo, el TFD con MAL 0,5 mM dio lugar a una disminución significativa del IM. \*\*  $p < 0,01$ .

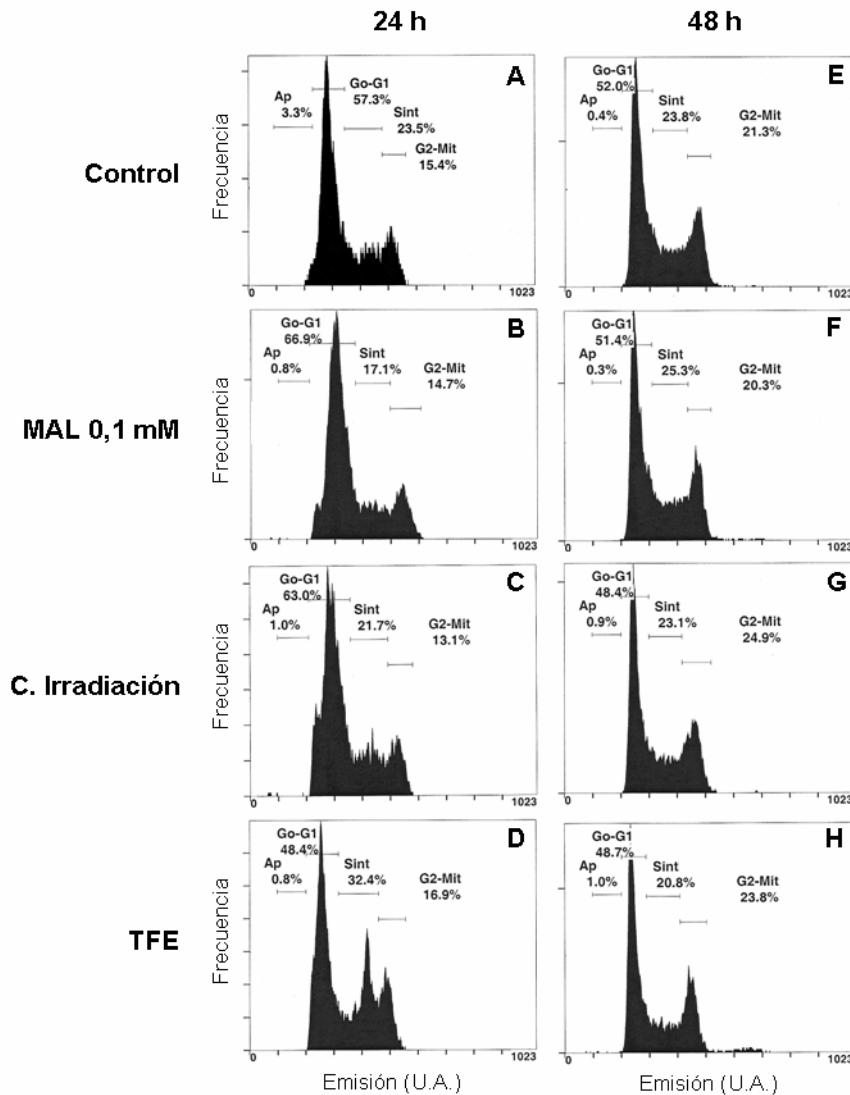
### 3.3 Evaluación del ciclo celular

Para estudiar el efecto del TFE sobre el ciclo celular, se analizó mediante citometría de flujo la distribución de las distintas etapas del ciclo celular 24 h después del tratamiento. En la Figura 19 se muestran ejemplos representativos de las gráficas de distribución del ciclo celular para cada uno de los tratamientos experimentales, tras 24 h y 48 h.

En la Figura 19 se observa que las curvas para las células control, incubadas con MAL 0,1 mM y sometidas a irradiación (Figura 19A-C) son típicas de una población celular normal: el pico de  $G_1$  más prominente, seguido por la región intermedia correspondiente a la fase S, y el pico de  $G_2/M$  de menor altura que el pico de  $G_1$ . No se observaron células en la región sub- $G_1$ , dato que indicó que no se había producido muerte celular tras los distintos tratamientos. Las células expuestas al TFE mostraron una distribución distinta a la normal, observándose la aparición de un tercer pico, muy notable, en la región de transición entre las fases S y  $G_2/M$  (Figura 19D). También se incrementó la proporción de células en  $G_2/M$  respecto a  $G_1$  (34,92%) en comparación con la proporción en las células control (25,87%). No se registró muerte celular a las 24 h de la aplicación del TFE en la región sub- $G_1$ .

Las distribuciones 48 h después de los tratamientos fueron similares a los controles, con las tres etapas del ciclo celular bien definidas (Figura 19E-H). En ninguno de los tratamientos se observó un incremento de la mortalidad celular con células en la región sub- $G_1$ .

En conjunto, estos datos indican que el TFE aumenta el porcentaje de células que entran en ciclo celular a las 24 h del tratamiento, pero que el efecto no se mantiene a las 48 h.

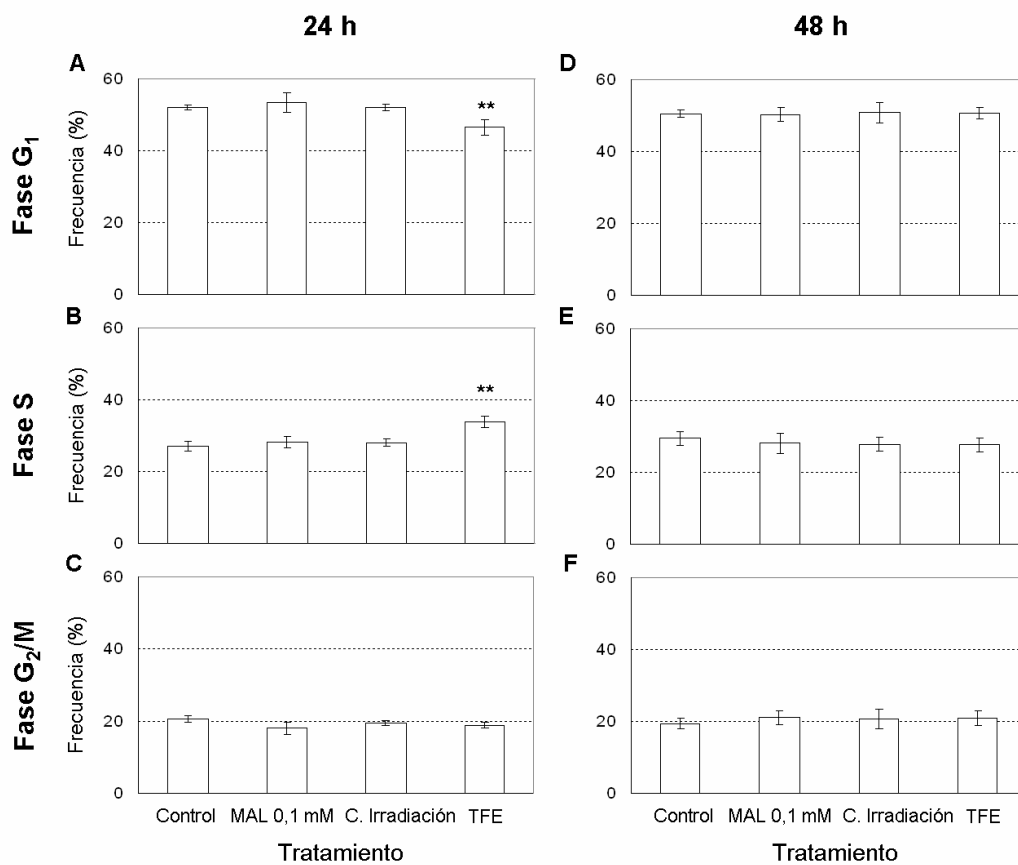


**Figura 19:** Gráficas de distribución del ciclo celular de células HaCaT. A las 24 h del TFE se observó un incremento en el número de células en la fase S comparadas con el control (19D). Este incremento aparece en la gráfica como un pico en la región de transición entre S y G<sub>2</sub>/M. También aumentó la proporción de células G<sub>2</sub>/M:G<sub>1</sub> en comparación a los controles.

También se analizaron y compararon entre sí las distribuciones porcentuales de cada una de las etapas del ciclo, a partir de los datos obtenidos por citometría de flujo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 20. Se observó un descenso significativo en el porcentaje de células de la fase G<sub>1</sub> 24 h después del TFE (Figura 20A). Al mismo tiempo, aumentó de forma significativa el porcentaje de células en la fase S del ciclo celular, también a las 24 h (Figura 20B). No se registraron cambios significativos entre los distintos tratamientos en los porcentajes correspondientes a la fase G<sub>2</sub>/M

(Figura 20C). Tampoco se apreciaron diferencias significativas 48 h después de los tratamientos (Figura 20D-F).

Estos resultados sugieren que la aplicación del TFE modula el ciclo celular a corto plazo, incrementando el porcentaje de células que progresa a través del ciclo (24 h; Figuras 19A-D y 20A-C), pero sus efectos no se prolongan a tiempos más largos (48 h; Figuras 19E-H y 20D-F).



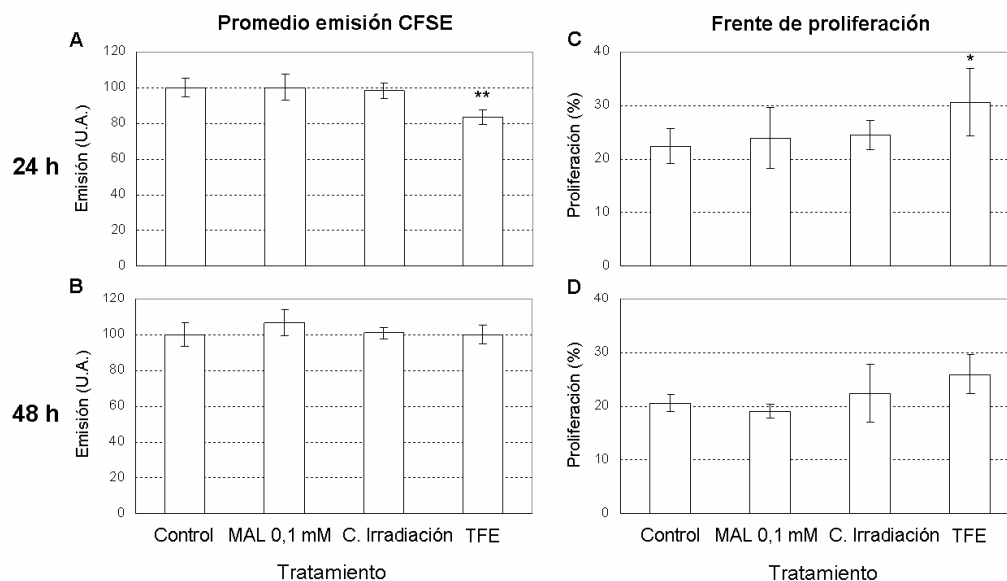
**Figura 20:** Porcentajes correspondientes a cada una de las etapas del ciclo celular para los distintos tratamientos. Se observó un descenso significativo del porcentaje de células en G<sub>1</sub> a las 24 h en las células sometidas al TFE (A); al mismo tiempo aumentó significativamente el porcentaje de células en la etapa de síntesis (B). A las 48 h de los tratamientos no se observaron diferencias significativas entre las distintas etapas del ciclo (D-F). \*\* p < 0,01.

### 3.4 Medida de la proliferación celular mediante marcaje con CFSE

La medida de proliferación celular con CFSE se basa en el marcaje fluorescente de una población celular y la pérdida de la emisión con cada división celular. Por lo tanto, midiendo la emisión a distintos tiempos después del marcaje inicial se puede hacer una estimación de la tasa de división de los cultivos celulares. Los resultados obtenidos mediante esta técnica después de la aplicación de los distintos tratamientos se muestran en la Figura 21.

Los resultados indican que a las 24 h las células que recibieron un TFE presentaron una menor emisión en promedio que las células sometidas al resto de condiciones experimentales (Figura 21A). Dado que las células van perdiendo la marca fluorescente conforme van proliferando, una menor emisión supone una mayor tasa de proliferación. La incubación con MAL 0,1 mM o la irradiación con luz roja, por separado, no dieron lugar a cambios significativos a las 24 h en los valores de la emisión del CFSE comparados con las células no tratadas. Los datos obtenidos a las 48 h indicaron que ninguno de los tratamientos experimentales generó diferencias significativas con respecto al control (Figura 21B). El TFE no prolongó la elevación de la tasa de proliferación con respecto al control más allá de las 24 h iniciales.

La evaluación del porcentaje celular con menor emisión de toda la distribución celular, o “frente de proliferación”, a las 24 h del tratamiento (Figura 21C) mostró que el TFE incrementaba significativamente ( $p < 0,05$ ) el porcentaje de células que habían proliferado. Concretamente, el porcentaje celular correspondiente al TFE fue del 30,55% frente al 22,43% del control. A las 48 h de aplicarse el tratamiento las diferencias no fueron significativas, aunque el valor correspondiente al TFE siempre se situó por encima del resto de tratamientos (Figura 21D).

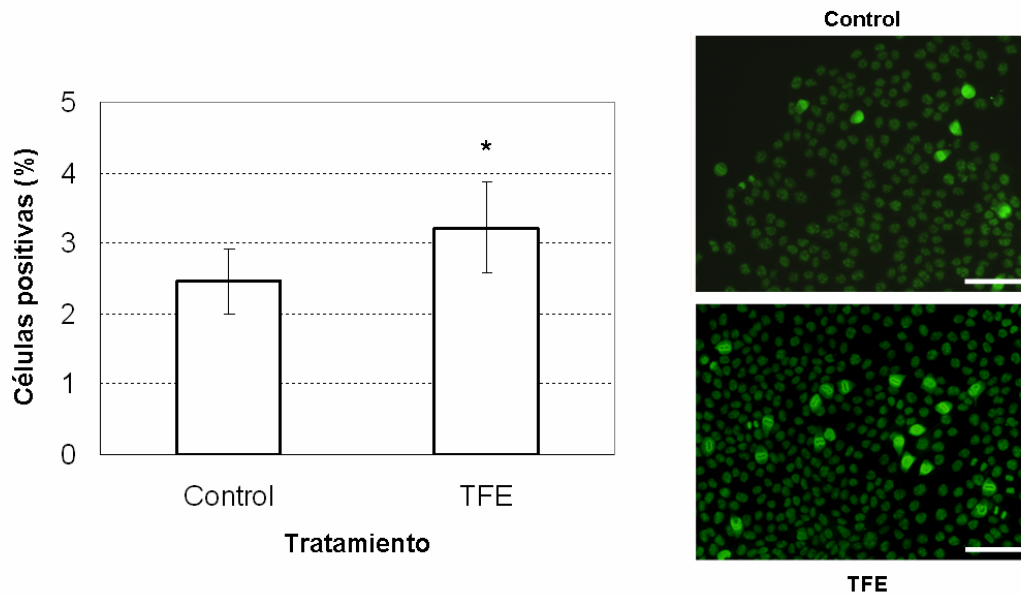


**Figura 21:** Medida de la proliferación celular mediante el ensayo del CFSE. Se observó un valor de emisión media significativamente menor con respecto al control 24 h después de la exposición al TFE (A), lo que indica una mayor tasa de proliferación celular. También a las 24 h de la aplicación del TFE se observó un incremento significativo en el “frente de proliferación” comparado con el control (D). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

### 3.5 Recuento de las células positivas para Ki-67

Las células en proliferación pueden ser identificadas poniendo de manifiesto, mediante inmunofluorescencia, un antígeno nuclear denominado Ki-67. Este antígeno se expresa preferentemente en las últimas etapas de la mitosis. En la Figura 22 se muestra el recuento de células positivas para la expresión de Ki-67 a las 24 h del tratamiento e imágenes de fluorescencia del marcaje para Ki-67.

Como se puede observar en la gráfica, un 2,46% de las células control fueron positivas para el marcaje con Ki-67. Las células sometidas al TFE mostraron un porcentaje del 3,22% para el marcaje con Ki-67. Esto supuso un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) de las células positivas para Ki-67 tras el TFE. Por lo tanto, tras el TFE, aumentó significativamente el número de células Ki-67 positivas con respecto a los controles. Estos datos corroboran los resultados obtenidos por otras técnicas de medida de la proliferación celular.



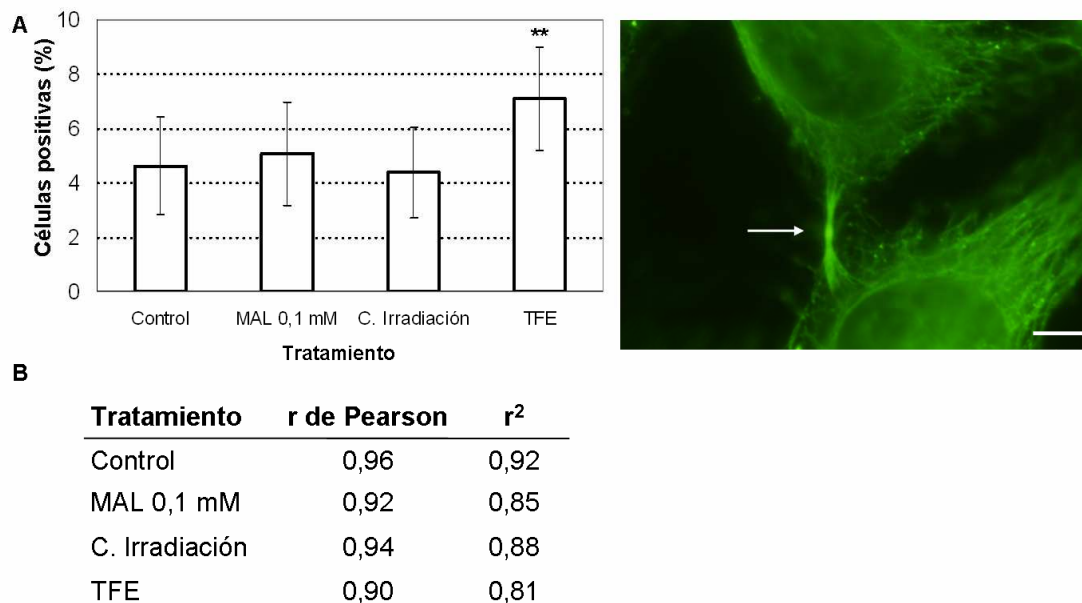
**Figura 22:** Recuento de las células positivas para Ki-67 a las 24 h del tratamiento. La aplicación del TFE aumentó significativamente las células positivas para Ki-67. A la derecha se muestran imágenes de fluorescencia en las que se aprecian las células marcadas para Ki-67 en células control y sometidas al TFE. Barras de escala: 50  $\mu$ m. \*  $p < 0,05$ .

### 3.6 Recuento de los cuerpos de Flemming

Los cuerpos de Flemming, o cuerpos residuales, son unas estructuras formadas por microtúbulos que mantienen conectadas durante un cierto tiempo a las dos células hijas resultantes de una mitosis. Por lo tanto, la presencia de estas estructuras es un criterio morfológico válido que pone de manifiesto que una división celular ha tenido lugar recientemente antes de la evaluación. Los recuentos de las células positivas para la presencia de cuerpos de Flemming se muestran en la Figura 23. En la Figura 23A se muestran los porcentajes de células HaCaT con cuerpos de Flemming 24 h después de los distintos tratamientos. Las células sometidas al TFE mostraron un incremento significativo en el número de estas estructuras 24 h después del protocolo experimental. El resto de condiciones no dieron lugar a diferencias significativas entre ellas. A la derecha se muestra un ejemplo de la morfología de un cuerpo de Flemming mediante el marcaje inmunofluorescente de la  $\alpha$ -tubulina, donde se observa la alta densidad de microtúbulos en la estructura. En la Figura 23B se muestra una tabla con los coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ) entre el porcentaje de células con cuerpos de Flemming y el IM en



esos mismos cultivos tras los diversos tratamientos. Se observó que el grado de correlación es casi del 100%. Es decir, el porcentaje de células que mostraron cuerpos residuales y el IM es prácticamente idéntico. También se muestran los valores de estos coeficientes de correlación elevados al cuadrado ( $r^2$ ). Estos valores de  $r^2$  permiten estimar qué fracción de la varianza total de las células que presentaron cuerpos residuales fue debida a una división celular previa. Los elevados valores obtenidos indican que la fracción mayoritaria de las células con cuerpos residuales mostraron estas estructuras porque había tenido lugar una división celular previa. Teniendo en cuenta que el recuento de cuerpos de Flemming es un criterio morfológico válido para estimar la fracción de células en proliferación en cultivos *in vitro*, los resultados obtenidos sugieren que el TFE aumenta la proliferación celular a las 24 h de producirse el tratamiento.

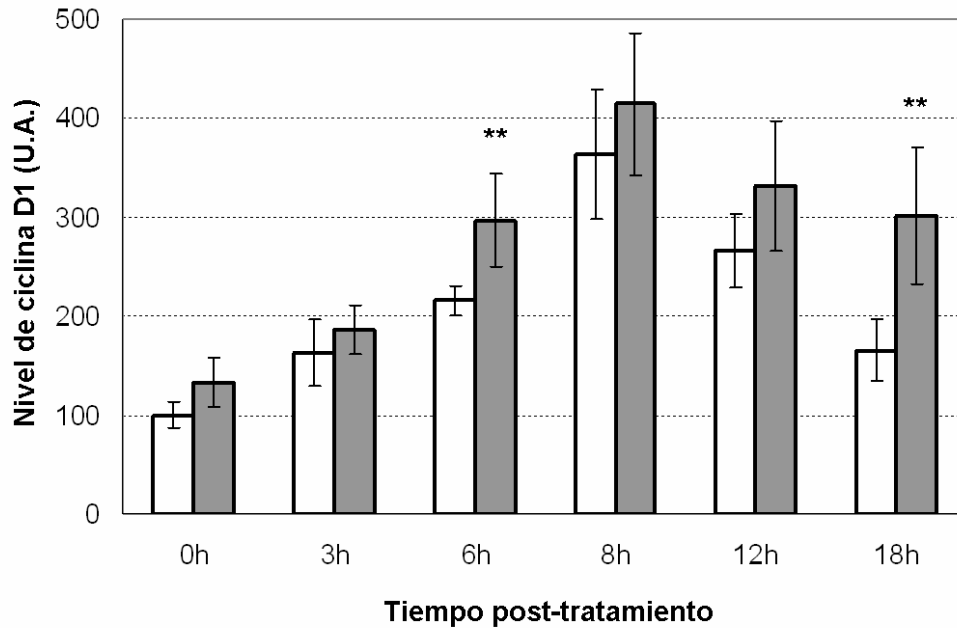


**Figura 23:** Recuento de células con cuerpos de Flemming. **(A)** Porcentaje de células HaCaT con cuerpos de Flemming 24 h después de los tratamientos. Las células que fueron sometidas al TFE presentaron un incremento significativo del número de cuerpos. A la derecha se muestra un ejemplo de un cuerpo de Flemming (flecha) entre dos células HaCaT. **(B)** Tabla con los coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ) entre las variables aparición de cuerpos de Flemming e IM tras los distintos tratamientos. También se muestran los  $r^2$  (porcentaje de la varianza explicada por el IM) de dichos coeficientes de correlación. Barra de escala: 5  $\mu$ m. \*\*  $p < 0,01$ .

### 3.7 Medida de la expresión de ciclina D1

La ciclina D1 es la primera ciclina que se expresa cuando se activan los mecanismos moleculares de entrada en el ciclo celular. En consecuencia, se realizó una evaluación de los niveles de expresión de ciclina D1 en las células a distintos intervalos de tiempo tras la aplicación del TFE, con el objetivo de verificar si aumentaban los niveles de ciclina D1 tras dicha aplicación. Las células HaCaT fueron deprivadas de SFB 24 h antes del tratamiento para sincronizarlas en fase G<sub>1</sub>, minimizando así la expresión de ciclina D1. Transcurridas 24 h, se añadió de nuevo SFB a las células, tanto si habían sido sometidas al TFE como si no, para obtener una cinética de los niveles celulares de ciclina D1 cuando las células comenzaron a recibir señales proliferativas del suero. Los resultados obtenidos midiendo la cantidad de ciclina D1 mediante citometría de flujo se muestran en la Figura 24. En las células control se observó primero un aumento (0 h-8 h) y una posterior disminución (8 h-18 h) de los niveles de ciclina D1 en función del tiempo transcurrido desde la exposición al SFB. A las 18 h los niveles de ciclina D1 volvieron a tomar valores similares a los iniciales. Estos resultados indican que se produjo una sincronización del ciclo celular en las células deprivadas de suero. La cinética de los niveles de ciclina D1 en las células sometidas al TFE fue la misma que en los controles. Sin embargo, los valores promedio de las células sometidas al TFE estuvieron siempre por encima de los valores de las células control en todos los intervalos de tiempo estudiados. Para los intervalos de 6 h y 18 h estos valores fueron significativamente superiores a los valores control ( $p < 0,01$ ).

Estos resultados indican que las células HaCaT sometidas al TFE aumentaron más rápidamente los niveles de ciclina D1 y los mantuvieron elevados más tiempo que las células control durante las primeras 18 h posteriores al tratamiento.



**Figura 24:** Medida de los niveles celulares de ciclina D1 a distintos intervalos de tiempo tras la exposición a SFB. Las células control (blanco) mostraron un aumento y posterior disminución de los niveles de ciclina D1 a distintos intervalos de tiempo desde la exposición al suero. Las células sometidas al TFE antes de añadir el suero (gris) también presentaron un aumento y posterior disminución de los niveles de ciclina D1. Estos valores fueron significativamente superiores a los del control a las 6 h y 18 h post-tratamiento. \*\*  $p < 0,01$ .

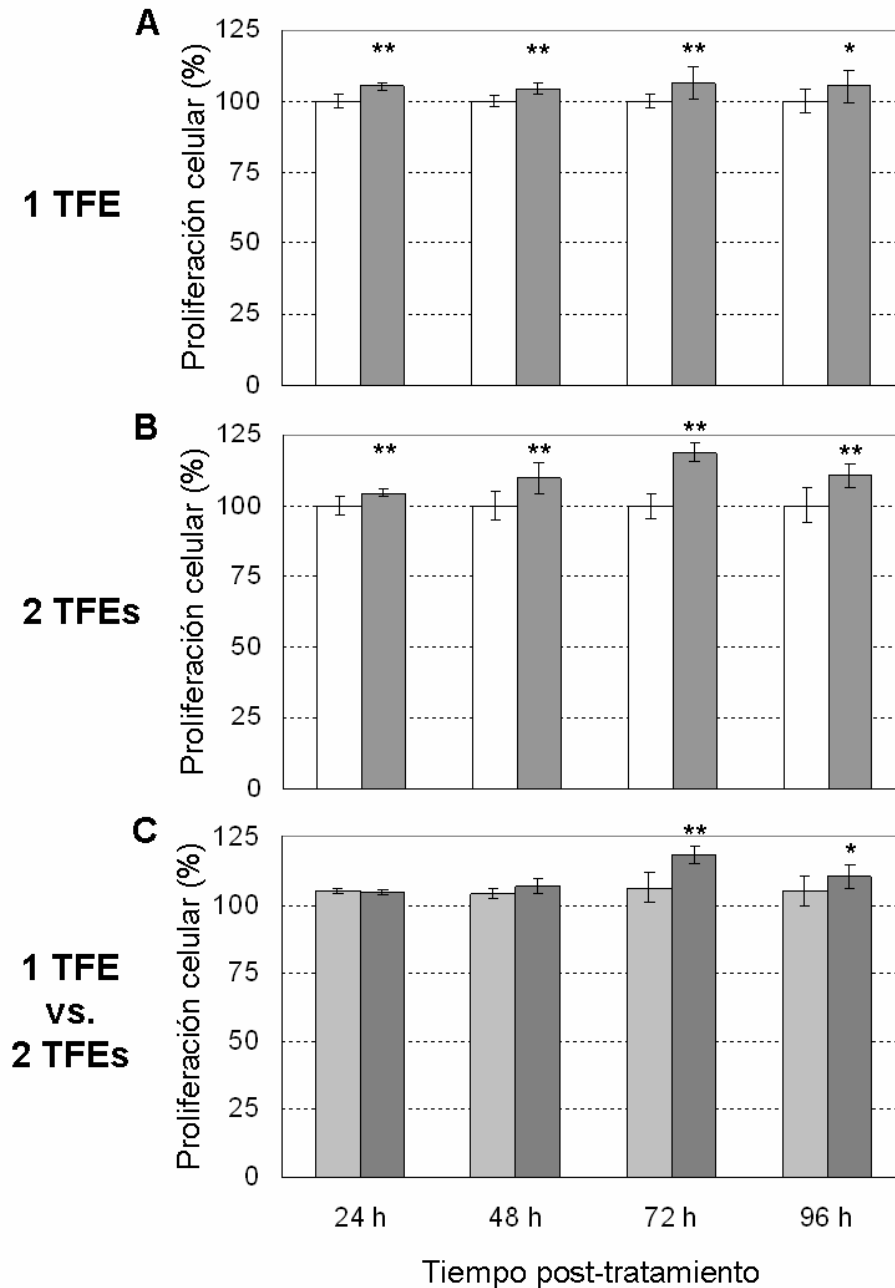
#### 4. Efecto de un doble TFE en la proliferación celular

Para determinar si los efectos de la administración del TFE eran puntuales o se mantenían en el tiempo después del tratamiento, se realizaron medidas de proliferación celular entre las 24 h y las 96 h después de la exposición a uno o dos TFEs. El protocolo de doble TFE consistió en la aplicación de un primer TFE, seguido de un segundo TFE a las 48 h de la aplicación del primero. De este modo se pretendía estudiar si era posible estimular de forma puntual la proliferación celular, o si los efectos de la estimulación se mantenían en el tiempo una vez finalizado el TFE. Los resultados de proliferación celular obtenidos en esta comparación de tratamientos se muestran en la Figura 25.

## Resultados

En la Figura 25A se comparan la proliferación celular de las células control frente a la proliferación de las células sometidas a un TFE. Se observó que la proliferación celular aumentó de forma significativa a partir de las 24 h hasta las 72 h ( $p < 0,01$ ). A las 96 h post-tratamiento el incremento de proliferación continuó siendo significativo ( $p < 0,05$ ), aunque en menor medida que a tiempos más cortos. Después del primer incremento de proliferación celular a las 24 h sobre el valor del control, el promedio del valor de proliferación de las células sometidas al TFE no presentó nuevos incrementos en todos los demás tiempos analizados, incluso disminuyó relativamente a las 96 h. En la Figura 25B se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación del doble TFE. Se observó un incremento (24 h-48 h) de la proliferación celular en las células expuestas al TFE al compararla con la proliferación de las células control. Este incremento fue significativo ( $p < 0,01$ ) y congruente con los resultados mostrados en la Figura 25A. Tras la aplicación del segundo TFE a las 48 h, se observó otro incremento de la proliferación celular a las 72 h en las células tratadas. A las 96 h las células sometidas a dos TFE aún presentaban un incremento significativo de la proliferación celular ( $p < 0,01$ ) comparadas con su control.

Al comparar los valores de proliferación celular tras un solo TFE frente a los valores de un doble TFE, se observó que existía un incremento significativo ( $p < 0,01$ ) de la proliferación celular tras el segundo TFE (Figura 25C). Este incremento disminuyó en cierta medida a las 96 h de iniciarse los protocolos, aunque continuó siendo significativo ( $p < 0,05$ ).

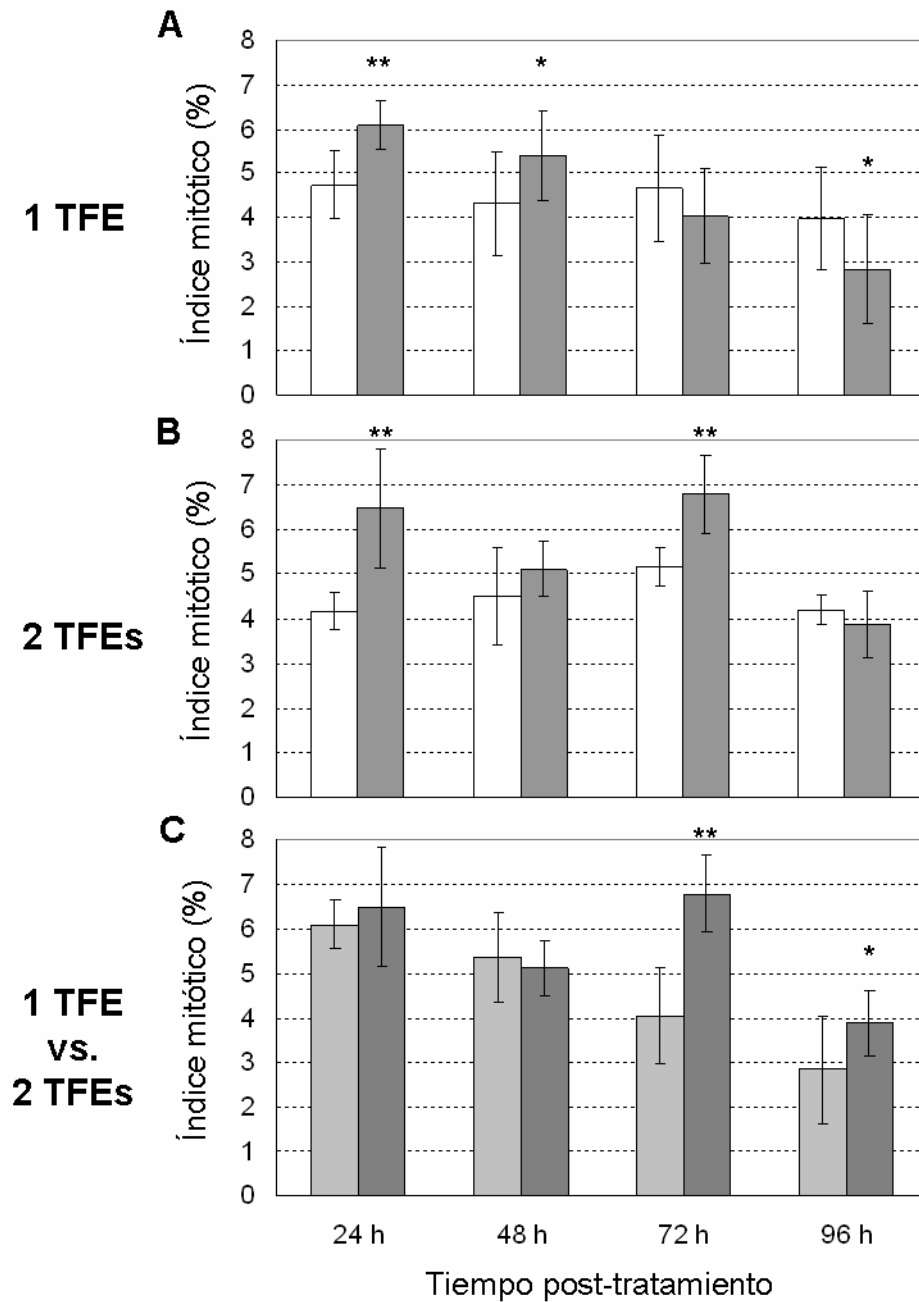


**Figura 25:** Proliferación celular a distintos intervalos de tiempo en función del número de TFEs aplicados. **(A)** Proliferación celular de células control (blanco) y sometidas a un solo TFE (gris). Se observó un incremento significativo de la proliferación celular tras el TFE que se mantuvo hasta 96 h después del tratamiento. **(B)** Proliferación celular de células control (blanco) y sometidas a un doble TFE (gris). Las células sometidas al doble TFE mantuvieron niveles de proliferación celular significativamente más elevados que los controles, con un segundo incremento de la proliferación tras el segundo TFE (72 h y 96 h). **(C)** Valores de proliferación celular de las células que sólo recibieron un TFE (gris claro) y las que recibieron dos TFE (gris oscuro); la aplicación de un segundo TFE aumentó significativamente la proliferación celular por encima de los valores de las células que habían recibido un solo TFE. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ .

## *Resultados*

Como ya se comentó anteriormente, también se compararon los IM de células control, sometidas a un TFE o sometidas a dos TFEs. Los resultados obtenidos, siguiendo los mismos tratamientos que para los datos de proliferación celular, se muestran en la Figura 26.

En la Figura 26A se muestran los IM de las células control y de células sometidas a un único TFE. Las células sometidas al TFE mostraron un aumento significativo del IM sobre los valores del control a las 24 h del tratamiento. El valor de IM para las células tratadas disminuyó pero se mantuvo significativamente por encima del valor control a las 48 h. No se registraron diferencias significativas a las 72 h del tratamiento. Por último, a las 96 h, el IM de las células sometidas al TFE disminuyó de forma significativa con respecto a los valores control. En la Figura 26B se muestran los IM de las células control y de las células sometidas a un doble TFE. Los IM a las 24 h y 48 h fueron muy parecidos a los mostrados en la Figura 26A. Sin embargo, se observó un nuevo incremento significativo del IM en las células tratadas comparadas con las células control después de la aplicación del segundo TFE. A las 96 h los valores de IM de las células tratadas no mostraron diferencias significativas con los controles. La comparación entre los valores de IM de las células sometidas a un TFE o a dos TFEs mostró que no se dieron diferencias significativas durante las primeras 48 h (Figura 26C). La aplicación de un segundo TFE incrementó significativamente el IM comparado con las células que sólo recibieron un TFE a las 72 h y 96 h.



**Figura 26:** Recuento del IM tras la aplicación de un TFE o dos TFEs en función del tiempo. **(A)** IM de células HaCaT control (blanco) o sometidas a un TFE (gris). El IM aumentó de forma significativa frente a los controles a las 24 h y 48 h del TFE. **(B)** Las células sometidas a un primer TFE mostraron un incremento significativo del IM, seguido de un nuevo incremento significativo tras la aplicación del segundo TFE (72 h), en comparación con el control. **(C)** Comparación de los IM en células sometidas a un único TFE (gris claro) o a dos TFEs (gris oscuro). Estas últimas mostraron un incremento significativo del IM comparadas con las que recibieron un solo TFE a las 72 h y 96 h del tratamiento. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ .

Los resultados mostrados en las Figuras 25 y 26 indican que la aplicación de un TFE a células HaCaT induce una estimulación puntual en la proliferación celular. Esta estimulación parece desaparecer a partir de las 48 h post-tratamiento. La aplicación de un segundo TFE, una vez desaparecida la estimulación ocasionada por el primer tratamiento, permitió inducir un segundo ciclo de estimulación independiente del primer TFE. Estos resultados sugieren que es posible obtener incrementos consecutivos de la proliferación celular mediante la aplicación de sucesivos TFEs. Estos incrementos parecen independientes unos de otros, al menos mientras transcurran 48 h entre un TFE y el siguiente.

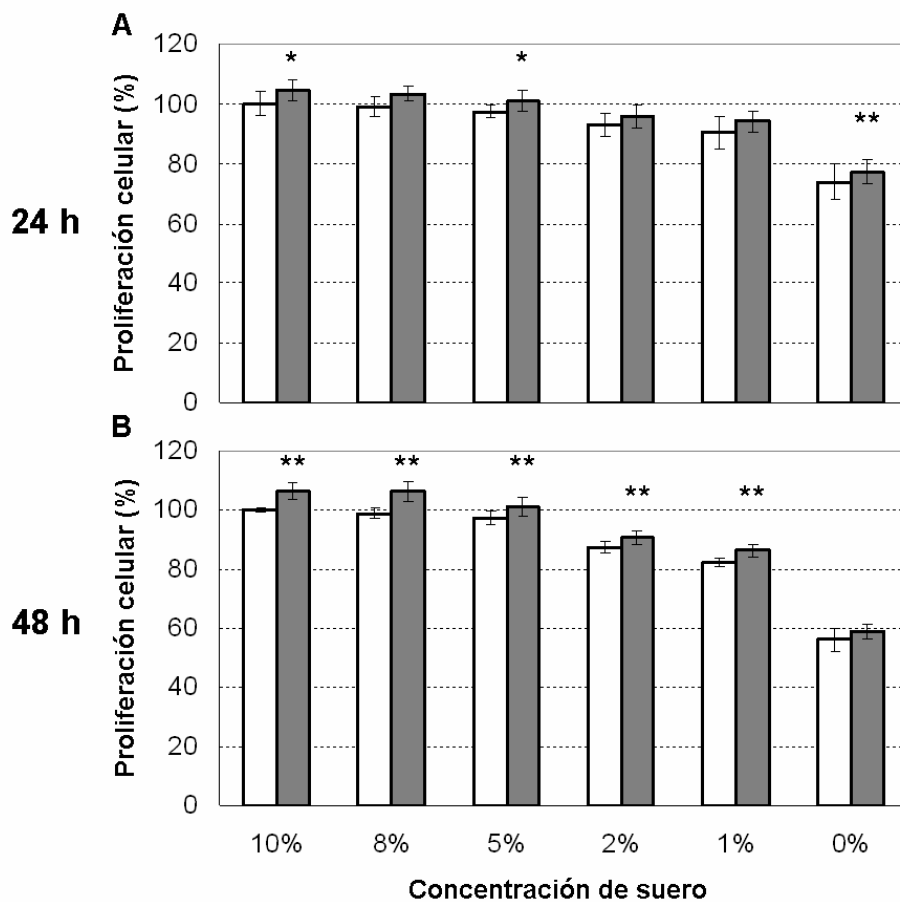
## **5. Efecto de la concentración de suero en el TFE**

Se decidió analizar si el TFE podía sustituir parcial o totalmente a los factores de crecimiento, presentes en el suero, en su función promotora de la proliferación celular. Para ello se estudió el posible efecto que pudieran tener distintas concentraciones de SFB tras la aplicación del TFE. Los estudios se realizaron midiendo la proliferación celular y mediante el recuento del IM. Las células fueron incubadas con distintas concentraciones de SFB (10%, 8%, 5%, 2%, 1% y 0%) tras la aplicación del TFE. La evaluación fue realizada a las 24 h y 48 h después del tratamiento. Los resultados de estos experimentos con respecto a la proliferación celular se muestran en la Figura 27.

En la Figura 27A se muestran los datos de proliferación celular 24 h después de la incubación con distintas concentraciones de suero en el medio de cultivo. La tendencia general en las células control fue una disminución en la proliferación celular conforme disminuyó la concentración de SFB en el medio de cultivo. Se observó la misma tendencia en la proliferación de las células sometidas al TFE pero los valores de proliferación siempre estuvieron por encima de los valores control para cualquier concentración de suero. El incremento en la proliferación celular de las células sometidas al TFE a las 24 h fue significativo para concentraciones de suero del 10%, 5% y 0%. En la Figura 27B se muestran los resultados obtenidos de proliferación celular a las 48 h de la incubación con distintas concentraciones de suero. Los resultados mostraron



la misma tendencia general que a las 24 h (Figura 27A). Cuanto menor era la concentración de suero en el medio de cultivo menor fue la proliferación celular observada en las células control. Las células sometidas al TFE y después incubadas 48 h con distintas concentraciones de suero, mostraron valores de proliferación celular siempre por encima de los valores control. Este incremento fue estadísticamente significativo para todas las concentraciones de suero, excepto cuando no se añadió suero al medio de cultivo.

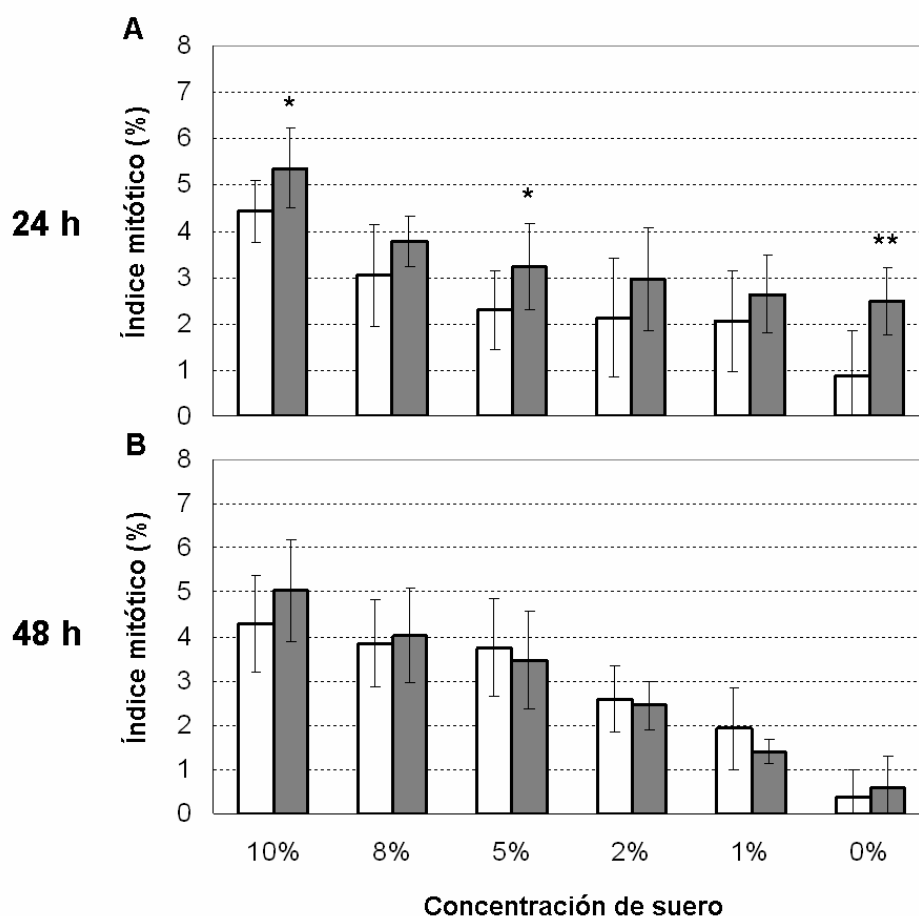


**Figura 27:** Efecto de la incubación con distintas concentraciones de suero sobre la proliferación celular. (A) A las 24 h se observó una disminución en la proliferación celular de los controles (blanco) conforme disminuyó la concentración de suero. Las células sometidas al TFE (gris) mostraron valores de proliferación significativamente mayores que los controles para concentraciones de suero del 10%, 5% y 0%. (B) Las células sometidas al TFE mostraron valores de proliferación significativamente mayores que los controles a las 48 h en todos los casos excepto cuando no se usó suero. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ .

Los resultados obtenidos con respecto a los valores del IM se muestran en la Figura 28. En la Figura 28A se muestra el recuento del IM 24 h después de haberse iniciado la incubación con distintas concentraciones de suero en el medio de cultivo. Se observó una disminución del IM en las células control cuanto menor fue la concentración de suero en el medio, al igual que había sucedido con la proliferación celular (Figuras 27A y B). Tras la aplicación del TFE, las células mostraron unos IM mayores que los de las células control para todas las concentraciones de suero utilizadas. Estos valores del IM fueron significativamente mayores que los valores control para las concentraciones de suero del 10%, 5% y ausencia de suero. En la Figura 28B se muestran los valores de los IM a las 48 h de iniciarse la incubación, donde las células sometidas al TFE no mostraron diferencias significativas con respecto a las células control.

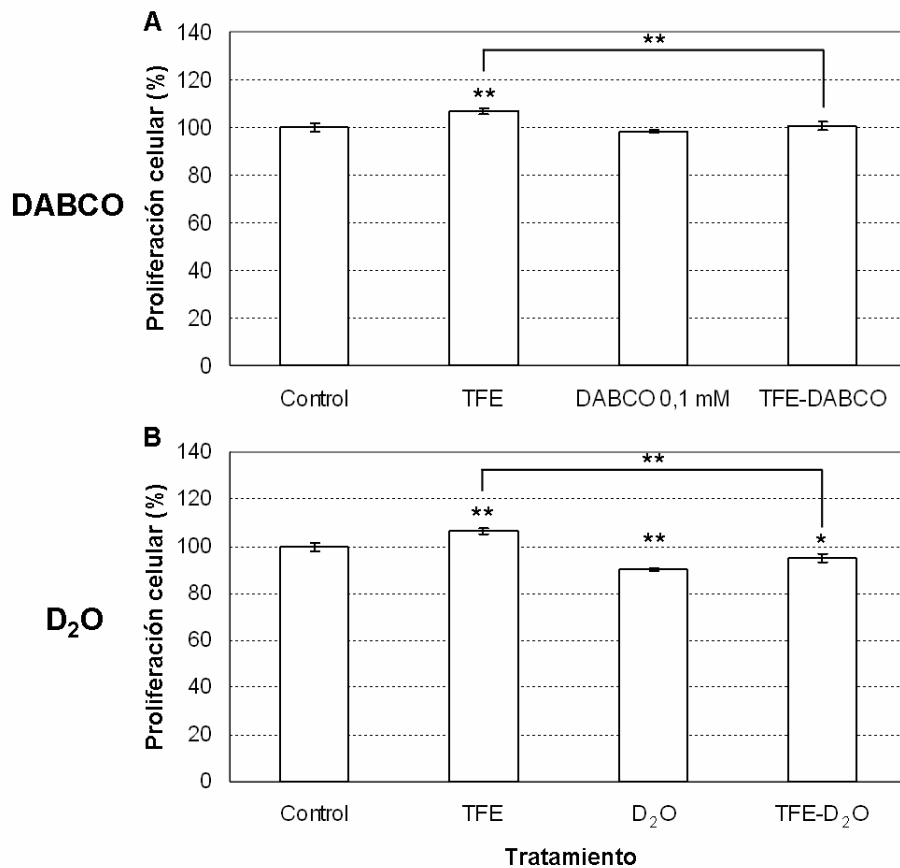
## **6. Modulación de la actividad del $^1\text{O}_2$ durante el TFE**

Una de las hipótesis experimentales de este trabajo es que el efecto estimulante sobre la proliferación celular del TFE depende de la producción de  $^1\text{O}_2$  durante la irradiación con luz roja en aquellas células que han acumulado Pp IX antes de ser irradiadas. El  $^1\text{O}_2$  daría lugar a las ROS que ejercen el efecto de estimulación al interactuar con diversas rutas de señalización celular. Para poner de manifiesto el papel que el  $^1\text{O}_2$  pudiese tener durante el TFE se realizaron experimentos incubando las células, bien con DABCO, un potente antioxidante que inactiva el  $^1\text{O}_2$ , o bien con  $\text{D}_2\text{O}$ , compuesto que aumenta la vida media del  $^1\text{O}_2$ , antes de someterlas al TFE. Se evaluaron tres parámetros celulares en los experimentos: la proliferación celular mediante el ensayo del MTT, el recuento del IM y los niveles de ciclina D1 en las células.



**Figura 28:** Efecto de la incubación con distintas concentraciones de suero en el IM. (A) En las células control (blanco) el IM disminuyó a las 24 h conforme menor fue la concentración de suero en el medio de cultivo. Las células sometidas al TFE mostraron diferencias significativas cuando las concentraciones de suero fueron del 10%, 5% y en ausencia de suero. (B) Los resultados a las 48 h mostraron que no existían diferencias significativas entre el control y el TFE. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ .

Los resultados obtenidos con respecto a la proliferación celular se muestran en la Figura 29. No se observaron diferencias significativas en la proliferación entre las células control y las incubadas con DABCO (Figura 29A). La incubación con DABCO antes de aplicar el TFE provocó una disminución significativa de la proliferación celular comparada con la de las células que fueron sometidas sólo al TFE ( $p < 0,01$ ). Los valores de proliferación celular de las células incubadas con DABCO y sometidas posteriormente al TFE fueron muy parecidos a los valores de proliferación de las células control.



**Figura 29:** Efecto del tratamiento con DABCO y D<sub>2</sub>O sobre la proliferación celular. **(A)** Proliferación celular 24 h después de la incubación con DABCO. Las células incubadas con DABCO y sometidas después al TFE mostraron una proliferación celular significativamente menor que la proliferación de las células que sólo fueron sometidas al TFE. **(B)** Proliferación celular 24 h después de la incubación con D<sub>2</sub>O. Las células incubadas con D<sub>2</sub>O y sometidas después al TFE mostraron una proliferación celular significativamente menor que la de las células sometidas sólo al TFE. \*  $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ .

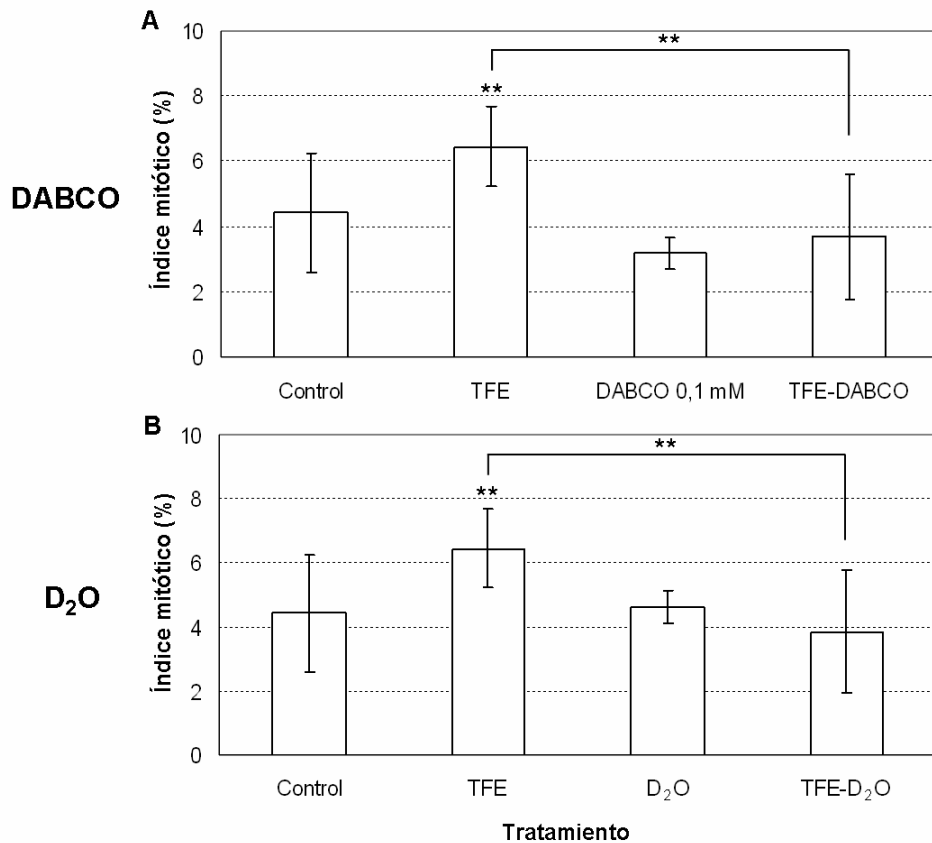
Por otro lado, la incubación con D<sub>2</sub>O provocó un descenso significativo ( $p < 0,01$ ) de la proliferación comparada con la de las células control 24 h después de la incubación (Figura 29B). Las células incubadas con D<sub>2</sub>O y sometidas después al TFE mostraron también una proliferación celular significativamente menor que la de las células control ( $p < 0,05$ ) y que la de las células que sólo se sometieron al TFE ( $p < 0,01$ ).

También se estudió el efecto de la incubación con DABCO o con D<sub>2</sub>O sobre el IM de las células. En la Figura 30 se muestran los resultados obtenidos con respecto al recuento de IM.

El recuento de los IM 24 h después de la incubación con DABCO mostró una tendencia muy similar a la observada en la proliferación celular (comparar las Figuras 29A y 30A). La incubación con DABCO disminuyó levemente el IM comparado con las células control, sin alcanzar la significación estadística. La incubación con DABCO seguida de la aplicación del TFE provocó una disminución significativa del IM comparado con las células que sólo recibieron el TFE ( $p < 0,01$ ). En esta última situación el valor del IM fue muy parecido al valor de las células control.

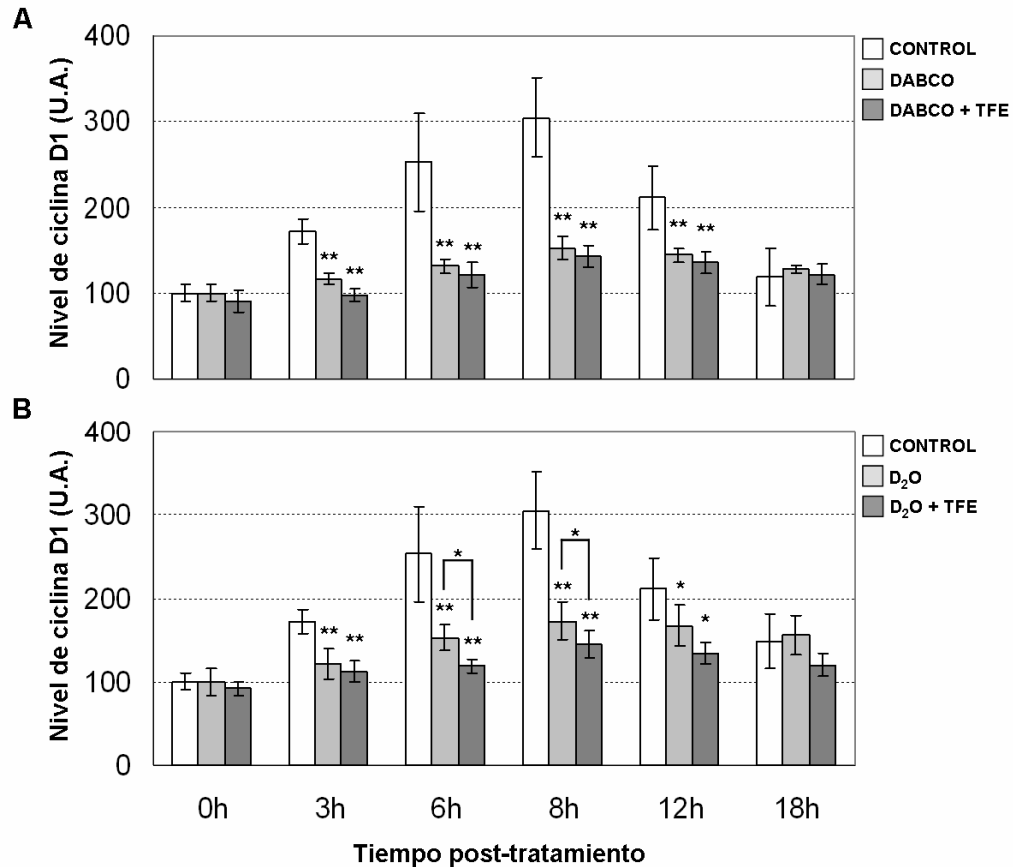
Los recuentos del IM tras la incubación con D<sub>2</sub>O se muestran en la Figura 30B. La incubación con D<sub>2</sub>O no provocó ninguna diferencia significativa en el IM de las células comparado con el IM de las células control. Las células incubadas con D<sub>2</sub>O y sometidas a continuación al TFE mostraron un valor del IM significativamente menor que el de las células sometidas al TFE ( $p < 0,01$ ). El valor del IM fue muy parecido al del control tras la incubación con D<sub>2</sub>O y la aplicación del TFE.

Por otra parte, también se quiso analizar el efecto que podría tener la incubación con DABCO o con D<sub>2</sub>O sobre los niveles de ciclina D1. Como se puede ver en la Figura 31A la incubación con DABCO provocó una disminución significativa ( $p < 0,01$ ) en los niveles de ciclina D1 comparados con los niveles de ciclina de las células control, entre las 3 h y las 12 h después de la incubación. Las células incubadas con DABCO y sometidas después al TFE también mostraron niveles significativamente inferiores de ciclina D1 ( $p < 0,01$ ) comparados con los niveles control a los mismos tiempos. No se hallaron diferencias significativas en los niveles de ciclina D1 entre las células que sólo fueron incubadas con DABCO y aquellas células que fueron sometidas al TFE después de ser incubadas con DABCO.



**Figura 30:** Recuento de los IM 24 h después de los tratamientos con DABCO o con D<sub>2</sub>O. **(A)** Las células incubadas con DABCO y sometidas después al TFE mostraron valores de IM significativamente menores que los de las células sometidas al TFE. **(B)** Las células incubadas con D<sub>2</sub>O y sometidas después al TFE también mostraron un IM significativamente menor que el de las células que sólo fueron sometidas al TFE. \* p < 0,05 \*\*p < 0,01.

En la Figura 31B se muestran los resultados del recuento del IM tras la incubación con D<sub>2</sub>O. La incubación con D<sub>2</sub>O provocó un descenso significativo de los niveles celulares de ciclina D1 comparados con los niveles en las células control desde las 3 h hasta las 12 h. Las células incubadas con D<sub>2</sub>O y luego sometidas al TFE también mostraron niveles de ciclina D1 significativamente menores que los controles (3 h – 12 h). Además, estas células, presentaron niveles de ciclina D1 significativamente más bajos que los de las células incubadas sólo con D<sub>2</sub>O a las 6 h y 8 h post-tratamiento.



**Figura 31:** Efecto de la incubación con DABCO o D<sub>2</sub>O en la expresión de ciclina D1. **(A)** Las células incubadas con DABCO mostraron niveles de ciclina D1 significativamente menores que los controles entre las 3 h y las 12 h post-incubación. Las células incubadas con DABCO y sometidas al TFE también mostraron niveles de ciclina D1 significativamente menores que los valores control a los mismos tiempos. **(B)** Las células incubadas con D<sub>2</sub>O mostraron niveles significativamente menores de ciclina D1 comparados con las células control entre las 3 h y las 12 h posteriores a la incubación, así como las células incubadas con D<sub>2</sub>O y sometidas después al TFE. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ .

En conjunto, estos resultados sugieren que tanto el DABCO como el D<sub>2</sub>O, en las concentraciones utilizadas, anularon el efecto estimulante del TFE sobre la proliferación celular y los niveles de ciclina D1.

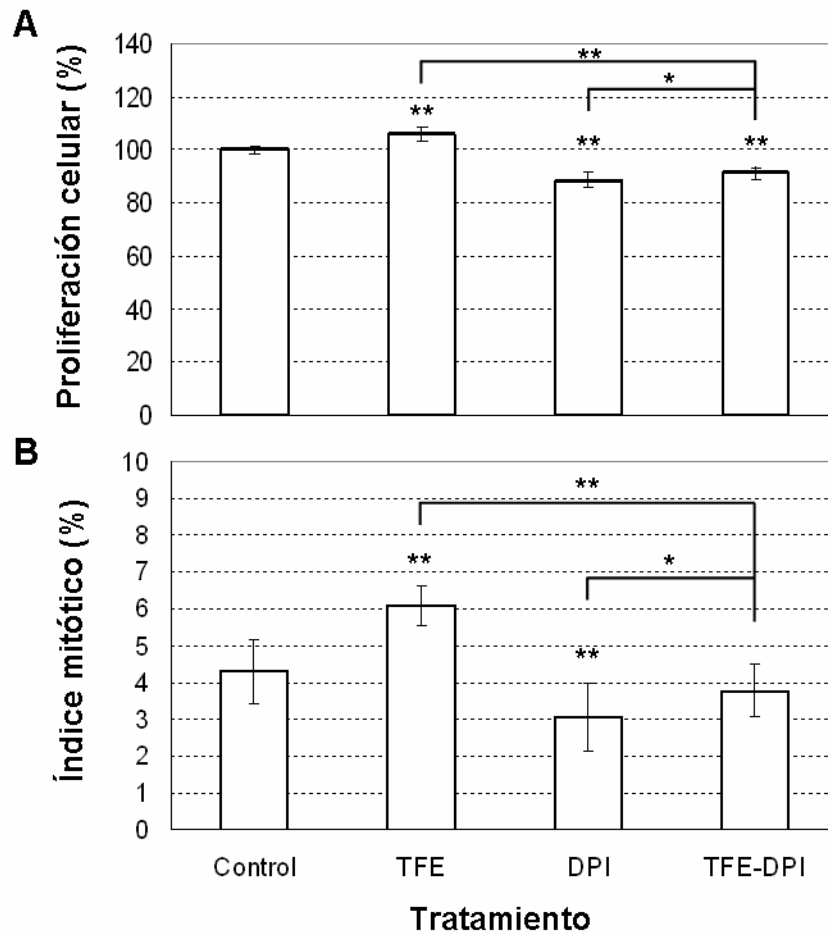
## 7. Efecto de la incubación con DPI y PP2 sobre el TFE

### 7.1 Resultados tras la incubación con DPI

Parte de la acción fisiológica de las ROS a nivel celular supone la activación del complejo NOX. En este sentido se quiso estudiar el papel que este complejo pudiera tener en el mecanismo de acción del TFE. Para ello se incubaron las células HaCaT con DPI, que es un potente inhibidor del complejo NOX. La evaluación del efecto de la incubación con DPI se realizó a las 24 h midiendo la proliferación celular, los IM y los niveles de ciclina D1. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 32 y 33.

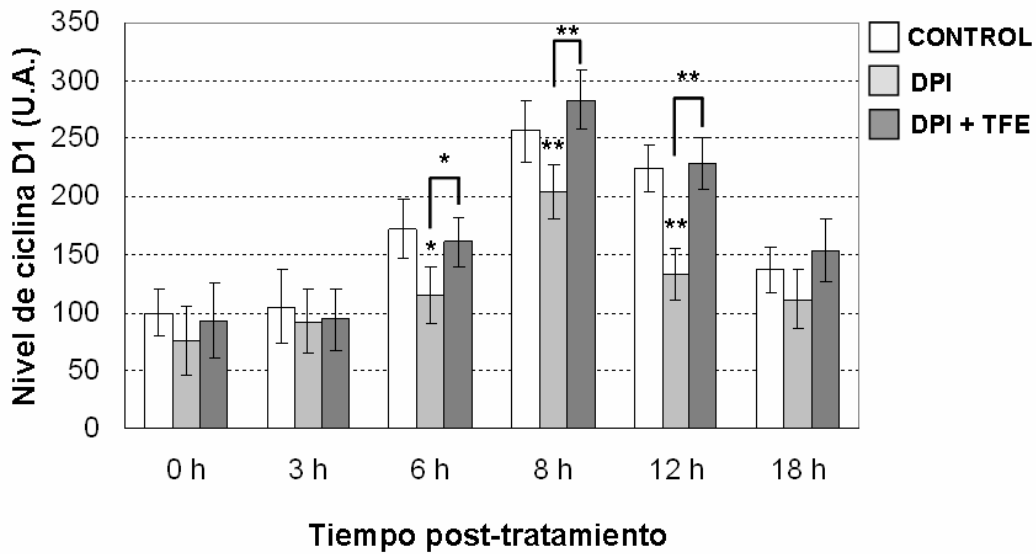
Los resultados mostrados en la Figura 32A indican que la incubación con DPI disminuyó significativamente ( $p < 0,01$ ) la proliferación celular a las 24 h de la incubación comparada con la proliferación de las células control. La incubación con DPI seguida de la aplicación del TFE resultó en un valor de proliferación significativamente inferior ( $p < 0,01$ ) al de las células a las que sólo se les aplicó el TFE. Sin embargo, la aplicación del TFE elevó de manera significativa ( $p < 0,05$ ) el valor de la proliferación celular con respecto al de las células que sólo fueron incubadas con DPI. Los recuentos del IM (Figura 32B) indican que las células incubadas con DPI mostraron un IM significativamente ( $p < 0,01$ ) menor que el IM de las células control a las 24 h de la incubación. Las células que fueron sometidas al TFE tras la incubación mostraron un IM significativamente menor ( $p < 0,01$ ) que el de las células que sólo recibieron el TFE, pero significativamente superior ( $p < 0,05$ ) que el IM de las células que sólo fueron incubadas con DPI.





**Figura 32:** Proliferación celular y recuento del IM tras la incubación de células HaCaT con DPI. **(A)** La proliferación celular a las 24 h de la incubación con DPI mostró una reducción significativa comparada con la proliferación de las células control. Las células incubadas con DPI y sometidas después al TFE mostraron una proliferación significativamente menor que la de las células que sólo recibieron el TFE. **(B)**. La incubación con DPI provocó un descenso significativo del IM en las células incubadas con respecto al valor control. Las células incubadas con DPI y sometidas después al TFE también mostraron una reducción significativa del IM al compararse con los valores de las células sometidas sólo al TFE. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ .

En la Figura 33 se muestran las medidas de los niveles de ciclina D1 obtenidas mediante citometría de flujo tras la incubación de células HaCaT con DPI.



**Figura 33:** Niveles de ciclina D1 tras la incubación con DPI. Las células incubadas con DPI presentaron niveles de ciclina D1 significativamente menores que las células control o que las células que fueron sometidas al TFE tras la incubación con DPI. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ .

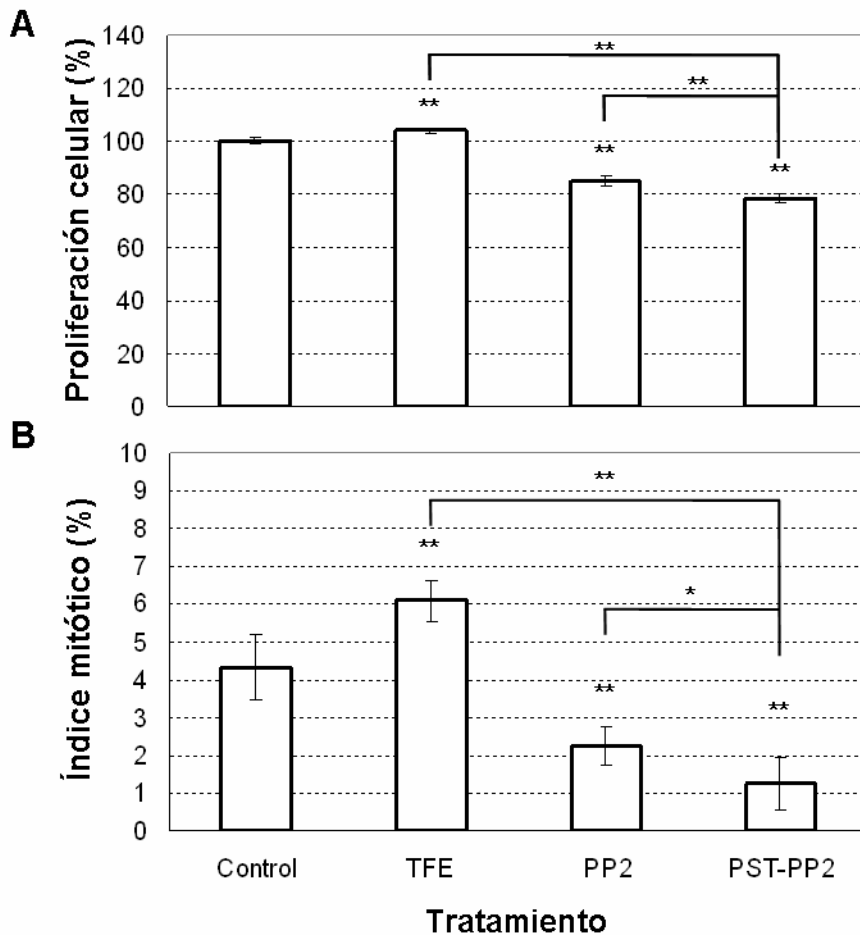
Las células incubadas con DPI presentaron unos niveles de ciclina D1 significativamente menores que los niveles de las células control entre las 6 h y las 12 h después de la incubación (Figura 33). Las células incubadas con DPI y sometidas después al TFE no mostraron diferencias significativas en los niveles de ciclina D1 comparados con los controles. Sin embargo, estas células sí presentaron niveles de ciclina significativamente superiores a los de las células que sólo fueron incubadas con DPI entre las 6 h y las 12 h después de la incubación.

Los resultados obtenidos tras la incubación con DPI parecen indicar que la actividad del complejo NOX es necesaria para un mantenimiento adecuado de la actividad proliferativa en células HaCaT. El efecto estimulante sobre esta actividad proliferativa del TFE parece deberse, en parte, al funcionamiento adecuado del complejo NOX. La inhibición del complejo NOX disminuyó de forma significativa la capacidad estimulante de la proliferación celular del TFE.

## 7.2 Resultados tras la incubación con PP2

La quinasa Src presenta una regulación redox de su acción fosforilativa y es una importante quinasa involucrada en proliferación celular. Por esta razón se decidió estudiar el papel que esta quinasa pudiese tener durante el TFE. PP2 es un potente inhibidor de la quinasa Src. Al igual que en los experimentos con DPI, se evaluaron: la proliferación celular, el IM y los niveles de ciclina D1.

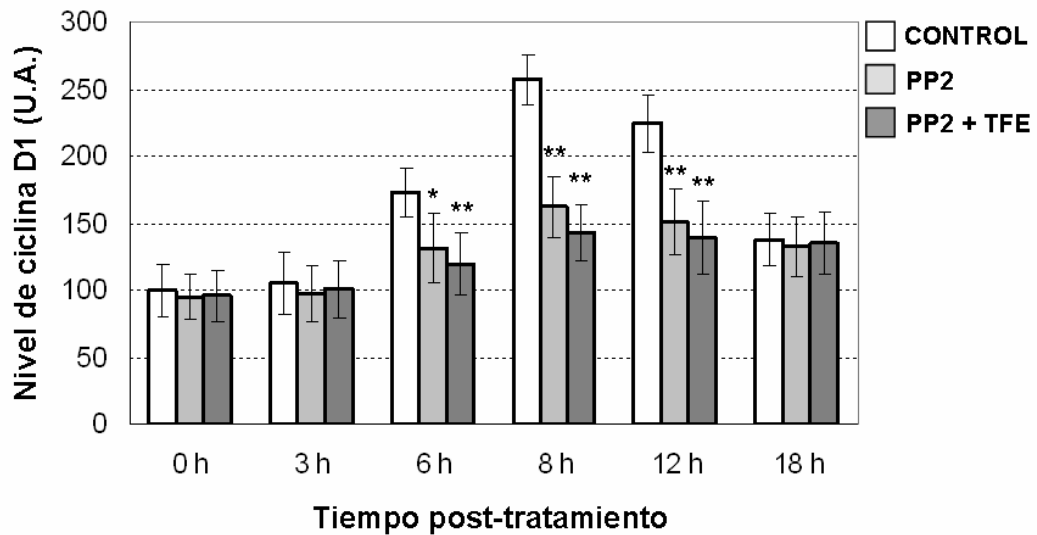
La Figura 34 muestra los resultados de proliferación y recuento del IM que se obtuvieron a las 24 h de la incubación con PP2. La proliferación celular (Figura 34A) de las células incubadas con PP2 se vio reducida de forma significativa ( $p < 0,01$ ) con respecto a la proliferación del control. Cuando las células incubadas con PP2 fueron sometidas después a un TFE, la proliferación disminuyó significativamente ( $p < 0,01$ ) respecto a la proliferación de las células que sólo recibieron el TFE o que fueron incubadas con PP2. Por tanto, los resultados sugieren que el TFE aumentó el efecto negativo del PP2 sobre la proliferación celular. El recuento del IM arrojó una tendencia muy parecida a la observada para la proliferación celular (Figura 34B). La incubación con PP2 provocó una reducción significativa ( $p < 0,01$ ) del IM con respecto al de las células control. Cuando la incubación con PP2 fue seguida de un TFE las células mostraron un valor de IM significativamente menor ( $p < 0,01$ ) que el de las células que sólo recibieron el TFE y también significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que el IM de las células que sólo fueron incubadas con PP2.



**Figura 34:** Proliferación celular y recuento del IM tras la incubación con PP2. **(A)** Las células incubadas con PP2 mostraron una disminución significativa de la proliferación celular con respecto a las células control a las 24 h de la incubación. Las células incubadas con PP2 y sometidas después al TFE mostraron una proliferación celular significativamente inferior a la de las células sometidas sólo al TFE. **(B)** La incubación con PP2 provocó un descenso significativo en el valor del IM comparado con el valor del control. Las células incubadas con PP2 y sometidas después al TFE también mostraron un valor del IM significativamente menor que el de las células sometidas sólo al TFE.  
 \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ .

En la Figura 35 se muestran los niveles de expresión de ciclina D1 a distintos intervalos de tiempo tras la incubación con PP2. Las células incubadas con PP2 mostraron una reducción significativa de dichos niveles de ciclina D1 entre las 6 h y las 12 h después de la incubación comparados con los niveles de las células control. Los niveles de ciclina en las células incubadas con PP2 y sometidas después al TFE también fueron significativamente menores ( $p < 0,01$ ) que los niveles control para los mismos tiempos. No se observaron diferencias significativas en los niveles de ciclina D1 entre las células que

fueron incubadas con PP2 y las que fueron incubadas con el inhibidor y después sometidas al TFE.



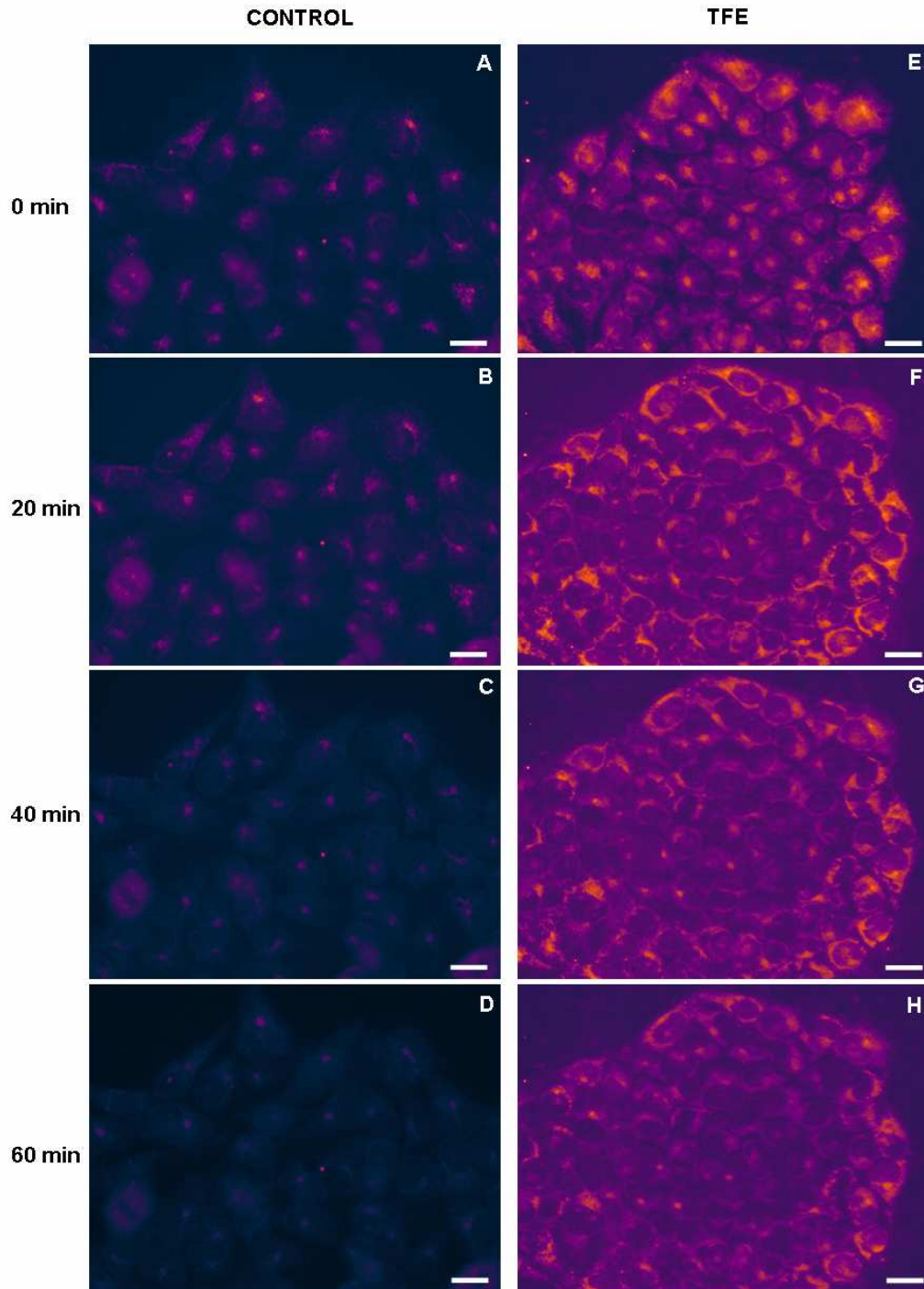
**Figura 35:** Niveles de ciclina D1 tras la incubación con PP2. Las células incubadas con PP2 mostraron una disminución significativa de los niveles de ciclina D1 comparadas con las células control a las 6 h, 8 h y 12 h. Las células incubadas con PP2 y sometidas después al TFE mostraron niveles de ciclina D1 significativamente reducidos comparados con el control también entre las 6 h y las 12 h tras la incubación. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ .

## 8. Efecto del TFE sobre la concentración intracelular de $\text{Ca}^{2+}$

Debido a la importancia del  $\text{Ca}^{2+}$  como segundo mensajero celular y a que existen evidencias de que algunas rutas de señalización por ROS, como Src, producen cambios en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , se evaluaron los posibles cambios en la concentración intracelular de este ión en las células sometidas al TFE. Las imágenes de microscopia de fluorescencia obtenidas entre 0 y 60 minutos después de los tratamientos se muestran en la Figura 36. Para poder apreciar mejor los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se modificaron las imágenes aplicándolas un gradiente de falso color. En este gradiente los colores azules representan una baja concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y los colores naranja y amarillo una concentración elevada de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Las células sometidas al TFE mostraron niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular muy elevados comparados con los controles inmediatamente después del tratamiento (Figura 36E). A los 20 minutos de la aplicación del TFE la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  continuó aumentando en las células tratadas, a la vez que éstas adquirieron una morfología redondeada (Figura 36F). A partir de los 20 minutos de la aplicación del TFE la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuyó de forma paulatina, aunque permaneció más elevada que en las células control (Figura 36G y H).

Estos resultados parecen indicar que la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  se incrementa notablemente en las células sometidas al TFE a tiempos cortos tras la aplicación del tratamiento.



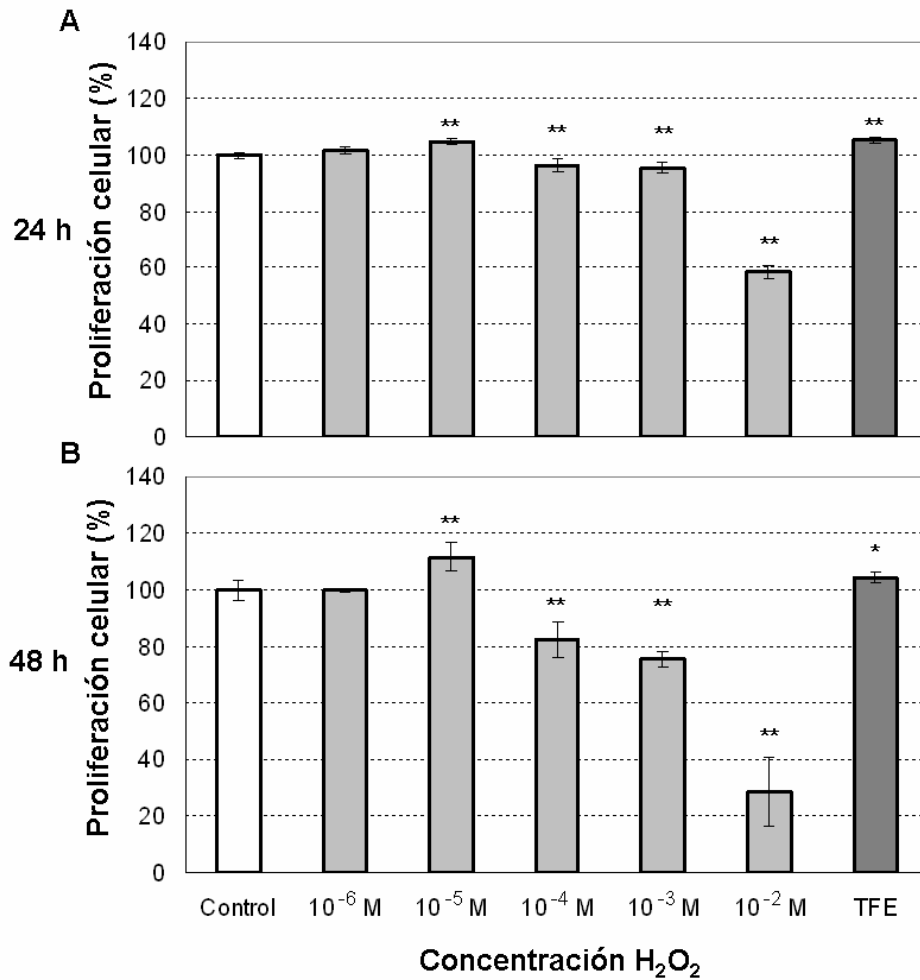
**Figura 36:** Modificaciones en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular en células HaCaT sometidas al TFE. La concentración de  $Ca^{2+}$  se ha representado como un gradiente de falso color para aumentar el contraste. En las células control se observó un leve incremento de la concentración de  $Ca^{2+}$  a los 20 minutos de iniciarse la evaluación (**B**). A los 40 minutos los niveles retornaron al nivel inicial (**C**) y disminuyeron por debajo de este nivel a los 60 minutos (**D**). En las células sometidas al TFE se observaron niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular más elevados que los de las células control justo después del tratamiento (**E**). A los 20 minutos del tratamiento los niveles siguieron aumentando (**F**). A partir de ese momento la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular comenzó a disminuir (**G** y **H**), aunque siempre se mantuvo muy por encima de los niveles del control. Barras de escala: 20  $\mu$ m.

## 9. Evaluación de la incubación con peróxido de hidrógeno sobre la proliferación celular

El peróxido de hidrógeno tiene un efecto estimulante en la proliferación celular a bajas concentraciones (Martindale y Holbrook, 2002; Pryor *et al.*, 2006). Con la finalidad de comparar la acción del TFE con los efectos observados en células incubadas con peróxido de hidrógeno, se evaluaron la proliferación celular y el IM en células sometidas al TFE e incubadas con distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno, a las 24 h y 48 h después de los tratamientos. Los resultados de proliferación celular obtenidos se muestran en la Figura 37.

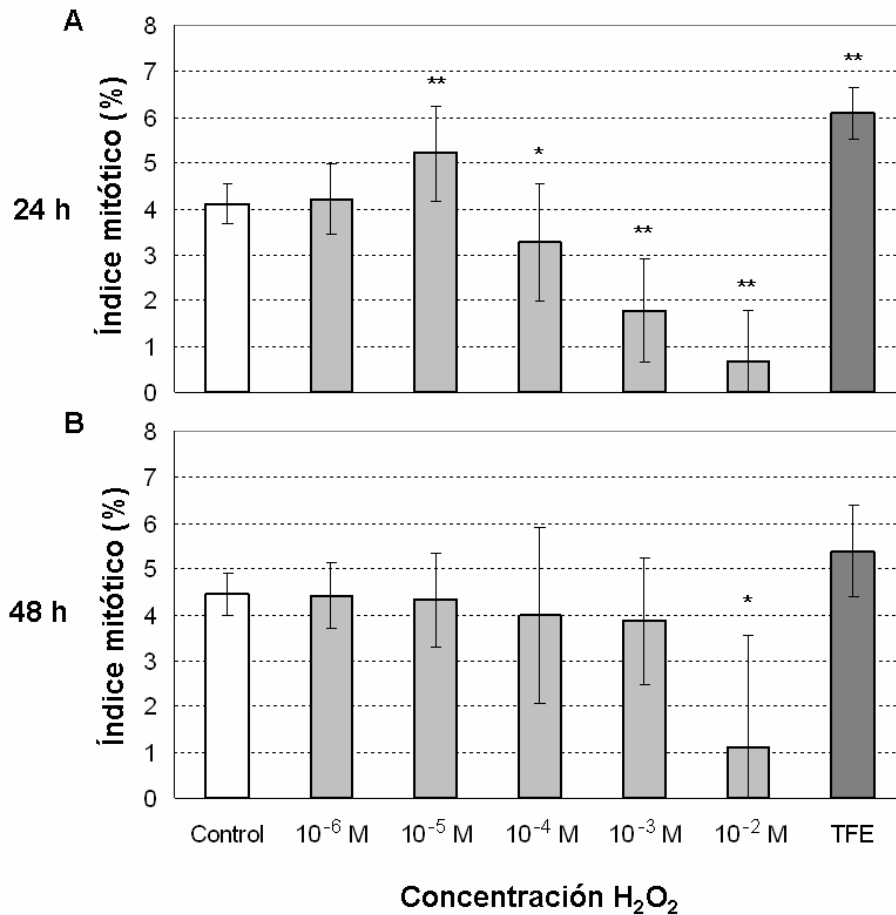
En la Figura 37A se muestran los valores de proliferación celular de las células control, de las incubadas con peróxido de hidrógeno y de las células sometidas al TFE a las 24 h de los tratamientos. Las células sometidas al TFE y las células incubadas con peróxido de hidrógeno  $10^{-5}$  M mostraron valores de proliferación significativamente mayores ( $p < 0,01$ ) que los de los controles. Las células incubadas con concentraciones de peróxido entre  $10^{-4}$  y  $10^{-2}$  M presentaron una proliferación significativamente menor que los controles. También se evaluó la proliferación celular a las 48 h de los tratamientos (Figura 37B). Las células incubadas con peróxido  $10^{-5}$  M presentaron una proliferación celular significativamente mayor ( $p < 0,01$ ) que la de las células control, así como las células sometidas al TFE ( $p < 0,05$ ). Las células incubadas con concentraciones de peróxido mayores  $10^{-5}$  M mostraron una disminución significativa ( $p < 0,01$ ) de la proliferación celular comparadas con control.





**Figura 37:** Efecto sobre la proliferación celular del TFE y de la incubación con distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno. **(A)** Proliferación celular evaluada a las 24 h de los tratamientos. La incubación con peróxido 10<sup>-5</sup> M provocó un aumento significativo de la proliferación comparado con el control, al igual que el TFE **(B)** Proliferación celular evaluada a las 48 h de los tratamientos. Tanto las células incubadas con peróxido 10<sup>-5</sup> M como las sometidas al TFE mostraron una proliferación celular significativamente mayor que las células control. \* p < 0,05 p < 0,01.

También se analizaron los valores de IM a las 24 h y 48 h de la incubación con las distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno, para poder compararlos con los obtenidos tras someter a las células al TFE (Figura 38).



**Figura 38:** Efecto del peróxido de hidrógeno sobre el IM. **(A)** La incubación con peróxido 10<sup>-5</sup> M o la aplicación del TFE incrementaron significativamente el IM comparado con el control a las 24 h de los tratamientos. **(B)** Sólo las células incubadas con peróxido 10<sup>-2</sup> M mostraron valores del IM significativamente menores que el control a las 48 h. \* p < 0,05 p < 0,01.

Los valores del IM obtenidos a las 24 h de los tratamientos (Figura 38A) mostraron que la incubación con peróxido de hidrógeno 10<sup>-5</sup> M y la aplicación del TFE elevaron significativamente los valores del IM con respecto al control (p < 0,01). La incubación con concentraciones más altas de peróxido disminuyó significativamente el IM. La Figura 38B muestra los valores del IM a las 48 h de los tratamientos. Solamente las células incubadas con peróxido 10<sup>-2</sup> M presentaron valores del IM significativamente menores que el control.

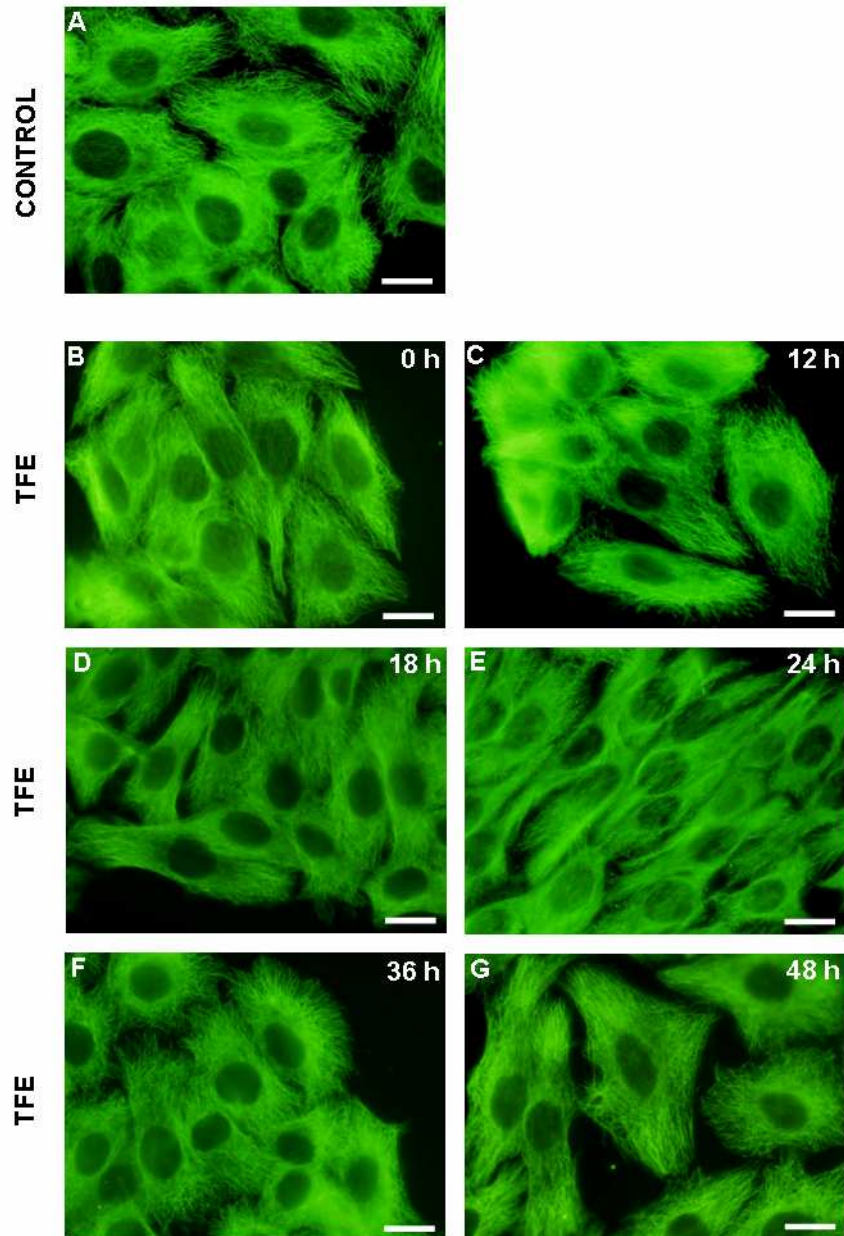
Estos resultados sugieren que la aplicación del TFE da lugar a valores de proliferación celular y de IM muy similares a los obtenidos tras la incubación con peróxido de hidrógeno 10<sup>-5</sup> M, en especial a las 24 h del tratamiento.

## **10. Efecto del TFE sobre el citoesqueleto**

Debido a que la producción de ROS por parte del complejo NOX parece incrementar la actividad de la proteína Rac, y dado que esta proteína está implicada en importantes modificaciones del citoesqueleto durante el proceso de WH, se decidió estudiar los efectos del TFE sobre la organización de los dos componentes del citoesqueleto dependientes de Rac: los microtúbulos y los filamentos de actina.

### **10.1 Efecto del TFE sobre los microtúbulos**

En la Figura 39 se muestran imágenes de microscopia de fluorescencia de células HaCaT, donde se pueden observar las modificaciones de los microtúbulos 24 h después de la aplicación del TFE, comparadas con las células control. Como se puede observar en las imágenes las células presentaron modificaciones de su morfología celular y en la distribución de los microtúbulos durante las 24 h posteriores a la aplicación del TFE (Figura 39B-E). Las células adquirieron forma de huso, presentando un mismo eje de orientación para la mayoría de las células del mismo cultivo (Figura 39E). Esto supuso un fenómeno notable, pues parece que se activó algún tipo de mecanismo de coordinación celular para formar una estructura ordenada a escala macrocelular. Este tipo de fenómenos celulares coordinados en queratinocitos son característicos del proceso de WH. Las imágenes tomadas a tiempos superiores a las 24 h tras la aplicación del TFE mostraron que las células adquirieron una morfología semejante a la de las células control (Figura 39F y G), sin que en ninguna de las imágenes hubiese indicios de algún tipo de daño al citoesqueleto de microtúbulos. Los controles no mostraron cambios morfológicos a los distintos tiempos analizados (datos no mostrados).

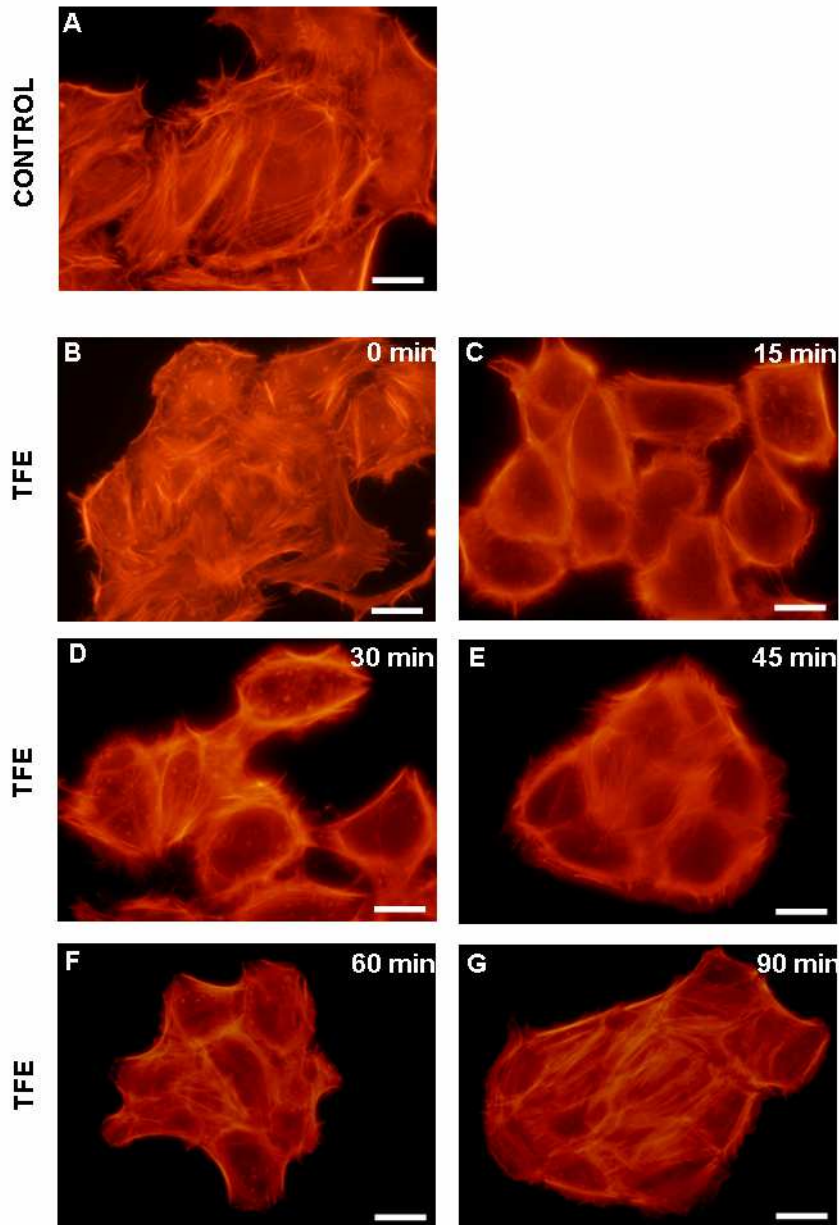


**Figura 39:** Modificaciones del citoesqueleto de microtúbulos tras la aplicación del TFE. En la parte superior se muestra la imagen de células control (**A**). Las demás imágenes corresponden a células sometidas al TFE (**B-G**). Como se puede observar las células control presentaron una morfología poligonal, sin ninguna dirección preferente en el ordenamiento de los microtúbulos. Sin embargo, tras la aplicación del TFE, se observaron ciertas modificaciones en la disposición de los microtúbulos. Transcurridas 12 h (**C**) y 18 h (**D**) desde la aplicación del TFE las células comenzaron a tomar una cierta forma de huso. A las 24 h (**E**) las células mostraron una clara orientación conforme a un eje preferente. A las 36 h (**F**) y 48 h (**G**) tras la aplicación del TFE la morfología celular se mostró muy similar a la de las células control, recuperando el aspecto poligonal típico de HaCaT. Barras de escala: 20  $\mu\text{m}$ .

## **10.2 Modificaciones en el citoesqueleto de actina**

La activación de la proteína Rac produce a tiempos cortos (minutos) cambios en el citoesqueleto de actina. Por esta razón se estudió el posible efecto que el TFE pudiese tener a tiempos cortos (0-90 minutos) sobre el citoesqueleto de actina. Las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia se muestran en la Figura 40.

En la primera imagen se muestra un ejemplo de la distribución de la actina en las células control (Figura 40A). Las células sometidas al TFE mostraron una menor densidad de fibras de estrés a los 15 minutos de aplicarse el TFE (Figura 40C). Estos cambios se vieron acompañados por un cambio en la morfología celular hacia una forma más esférica y por un aumento de la actina cortical bajo la membrana plasmática. Entre los 15 y los 30 minutos posteriores al TFE, prácticamente todas las células presentaron una morfología redondeada (Figura 40C y D). Durante este periodo se redujo casi en su totalidad el número de fibras de estrés y aumentó de manera muy notable la actina cortical. A partir de los 45 minutos posteriores al TFE, las células comenzaron a recuperar la forma poligonal y extendida típica de la línea celular HaCaT (Figura 40E). Aunque la cantidad de actina cortical se mantuvo elevada, parte de la actina comenzó a organizarse de nuevo en forma de fibras de estrés. A partir de los 60 minutos posteriores a la aplicación del TFE las células tratadas mostraron una morfología y distribución del citoesqueleto de actina muy similar a la de las células control (Figura 40F y G). Los controles no mostraron cambios en la distribución de la actina a los distintos tiempos analizados (datos no mostrados).



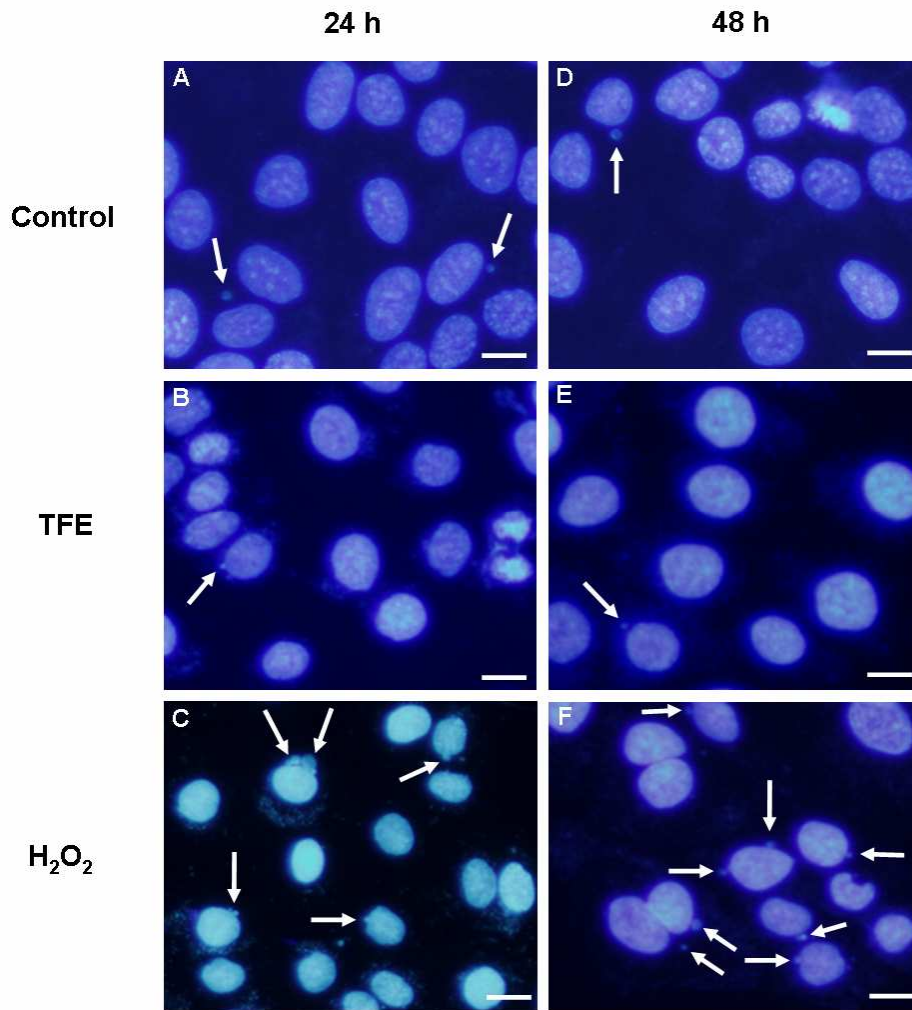
**Figura 40:** Modificaciones en el citoesqueleto de actina tras el TFE. En la parte superior se muestran las células control (A). Las demás imágenes se corresponden a las células sometidas al TFE (B-G). Desde los 0 hasta los 45 minutos posteriores a la aplicación del TFE (B-E) se observó una paulatina retracción celular, junto a una disminución en la densidad de fibras de estrés, acompañadas ambas de un incremento en la actina cortical bajo la membrana plasmática. Desde los 15 hasta los 45 minutos posteriores al TFE (C-E) se observó que las células tratadas tomaban un aspecto más esférico y menos poligonal. Las fibras de estrés prácticamente desaparecieron y se produjo una gran acumulación de actina cortical. A partir de los 30 minutos después del TFE (D-E) las células comenzaron a extenderse y a recuperar el aspecto más poligonal. A los 60 minutos del TFE (F) las células tratadas habían recuperado la morfología típica de HaCaT y presentaban fibras de estrés, aunque con actina cortical. Barras de escala: 15  $\mu$ m.

## 11. Generación de micronúcleos tras el TFE

Los micronúcleos son el resultado de una inadecuada migración de una parte de los cromosomas durante la metafase y/o de la fragmentación de uno o más cromosomas, con la consiguiente pérdida del centrómero. Tras la telofase, la membrana nuclear se vuelve a formar, no sólo en torno al núcleo, sino también alrededor de estos fragmentos cromosómicos, que forman pequeñas estructuras positivas para la tinción de la cromatina. Suelen aparecer como cuerpos esféricos en el entorno del núcleo celular, que pueden observarse tras la tinción con Ho. El recuento de micronúcleos es una medida adecuada para la estimación del daño a la cromatina por diversos agentes clastogénicos (Fenech, 2000; Hoffmann-Dörr *et al.*, 2005; Shorrocks *et al.*, 2007).

Por esta razón, se analizó el porcentaje de células que presentaban micronúcleos en células control y en aquellas sometidas a un TFE. Como control positivo de daño a la cromatina se incubaron células HaCaT con distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno, compuesto que presenta una importante capacidad clastogénica. En la Figura 41 se muestran algunos ejemplos del aspecto microscópico de los micronúcleos en células HaCaT bajo algunas de las condiciones estudiadas.

Las imágenes de la Figura 41 muestran que las células HaCaT control presentan un bajo porcentaje de micronúcleos ( $\approx 3\%$ ), al igual que las células sometidas al TFE ( $\approx 3\%$ ), tanto a las 24 h como a las 48 h del tratamiento. La incubación con peróxido de hidrógeno  $10^{-4}$  M provocó la aparición de un mayor número de micronúcleos en las células incubadas, en torno al 6% y al 18%, a las 24 h y 48 h respectivamente.

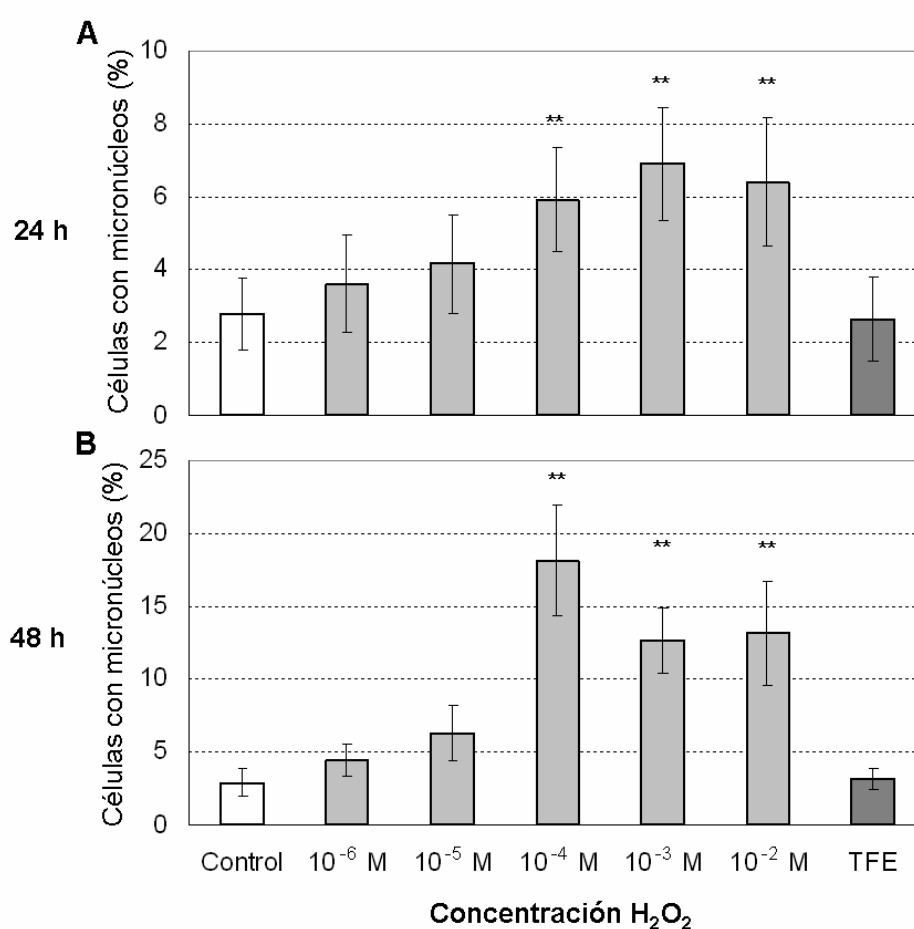


**Figura 41:** Imágenes de fluorescencia de células HaCaT que muestran ejemplos del aspecto de los micronúcleos (flechas blancas) comparados con los núcleos celulares (tinción con Ho) a las 24 h (A-C) y 48 h (D-F) de los tratamientos. Se observó que tanto las células control como las sometidas al TFE mostraban un pequeño porcentaje de micronúcleos. Las células incubadas con peróxido de hidrógeno ( $10^{-4}$  M) mostraron valores muy superiores de micronúcleos con respecto a las otras dos condiciones, tanto a las 24 h como a las 48 h del tratamiento. Barras de escala: 10  $\mu$ m.

El recuento del porcentaje de células HaCaT con micronúcleos se muestra en la Figura 42. Como se puede observar se hallaron diferencias significativas entre el porcentaje de células con micronúcleos en las células control y los porcentajes en las células incubadas con concentraciones de peróxido entre  $10^{-4}$  y  $10^{-2}$  M a las 24 h tras la incubación (Figura 42A). Las células sometidas al TFE no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de micronúcleos comparadas con el control a las 24 h. La figura 42B muestra los porcentajes a las 48 h de los tratamientos, donde las únicas



condiciones que mostraron porcentajes de células con micronúcleos significativamente superiores a los del control fueron las células que habían sido incubadas con concentraciones de peróxido entre  $10^{-4}$  y  $10^{-2}$  M. Se ha cambiado la escala entre la Figura 42A y 42B para poder apreciar mejor las diferencias porcentuales. También se realizaron recuentos de los porcentajes de células con micronúcleos comparando células control y aquellas sometidas al TFE hasta 96 h después del tratamiento. No se encontraron diferencias significativas entre ambas condiciones a ninguno de los tiempos evaluados (datos no mostrados).



**Figura 42:** Recuento del porcentaje de células HaCaT con micronúcleos. **(A)** Porcentajes de células con micronúcleos en función de la concentración de peróxido de hidrógeno o de la aplicación del TFE a las 24 h del tratamiento. **(B)** Porcentajes de células con micronúcleos a las 48 h de los tratamientos. Se ha cambiado la escala entre **(A)** y **(B)** para apreciar mejor las diferencias en los porcentajes. \*\*  $p < 0,01$ .

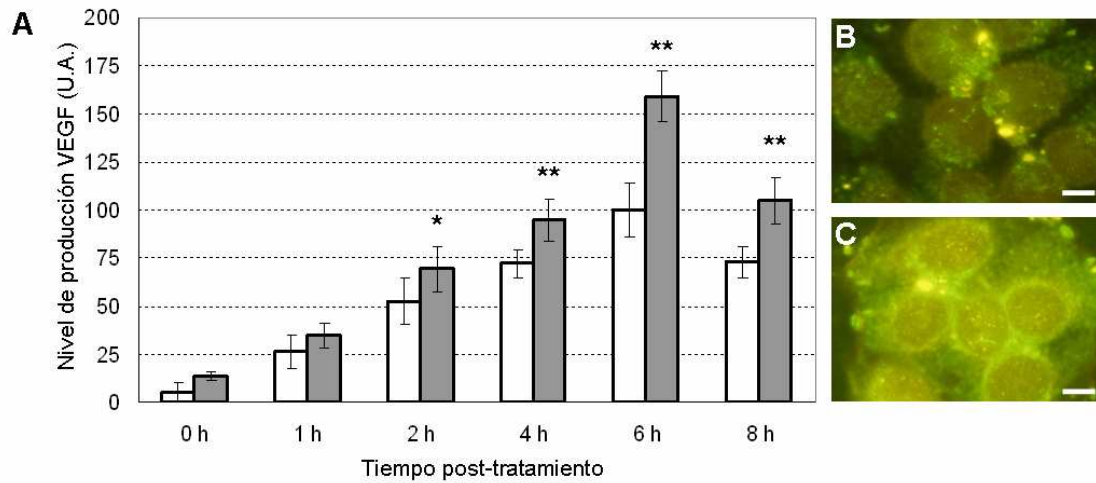
Estos resultados sugieren que la aplicación del TFE no ocasiona daño a la cromatina en relación a la formación de micronúcleos.

## 12. Producción intracelular de VEGF

Debido a la importancia que presenta el VEGF secretado por los queratinocitos como factor de señalización durante el proceso de WH, se consideró de interés medir la concentración intracelular de este factor de crecimiento tras la aplicación del TFE. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 43.

En la Figura 43A se han comparado los niveles de producción intracelular de VEGF en las células control y en las células sometidas al TFE a distintos tiempos tras la incubación con suero. En los controles se observó la ausencia de expresión de VEGF intracelular justo después de la incubación con suero (0 h). Al aumentar el tiempo de exposición al suero se apreció un incremento notable en los niveles de expresión intracelular de VEGF (1 h-6 h), alcanzándose el máximo nivel de expresión a las 6 h de la incubación con suero. Pasado este tiempo, los niveles de expresión de VEGF comenzaron a disminuir (8 h). Esta misma tendencia se observó en las células sometidas al TFE. Sin embargo, los niveles aumentaron de forma significativa con respecto a los niveles control entre las 2 h y las 8 h después del TFE y de la incubación con suero. Aunque la tendencia en la producción intracelular de VEGF fue muy similar, los niveles intracelulares de VEGF fueron siempre mayores en las células sometidas al TFE.

En la Figura 43B se muestra una imagen de fluorescencia de células control 6 h después de la incubación con suero. La expresión de VEGF se observó preferentemente en estructuras granulares muy pequeñas ( $< 1 \mu\text{m}$ ), que probablemente correspondan a gránulos de secreción. También se observó señal en la zona perinuclear, probablemente en el aparato de Golgi. En la Figura 43C se muestra una imagen de células 6 h después de someterlas al TFE e incubarlas con suero, donde el patrón de expresión de VEGF fue muy similar al de los controles. Sin embargo, la intensidad de la emisión fluorescente fue superior en las células sometidas al TFE que en las células control.



**Figura 43:** Producción intracelular de VEGF en células HaCaT. **(A)** Niveles intracelulares de VEGF en células control y células sometidas al TFE a distintos tiempos post-tratamiento. Las células a las que se les aplicó el TFE mostraron un aumento significativo en la producción de VEGF con respecto a la producción en los controles entre las 2 h y las 8 h posteriores al tratamiento. **(B)** Imagen de fluorescencia en la que se muestran células control teñidas con un anticuerpo anti-VEGF 6 h después de la incubación con suero. **(C)** Imagen de fluorescencia de células sometidas al TFE, 6 h después de aplicarles el tratamiento y de añadirles suero. Barras de escala: 10  $\mu$ m. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ .



## **DISCUSIÓN**

---



## 1. Antecedentes del estudio

Durante décadas, las ROS han sido estudiadas exclusivamente desde el punto de vista del estrés oxidativo y del daño celular. Sin embargo, durante los últimos años se ha verificado su papel en otros muchos procesos celulares (Davies, 1999; Pryor *et al.*, 2006; Matés *et al.*, 2008; Bartosz, 2009), habiéndose establecido un nuevo paradigma en el cual la respuesta celular a las ROS viene dada por la concentración y por el tiempo de exposición a estas especies químicas (Martindale y Holbrook, 2002; Boonstra y Post, 2004). El repertorio de respuestas varía desde la proliferación celular, pasando por la diferenciación y la senescencia, hasta la inducción de apoptosis o la muerte por necrosis (Wartenberg *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2003; Caporossi *et al.*, 2003; Laurent *et al.*, 2005). Asimismo, se conocen ya muchas de las vías y rutas de señalización implicadas en estas respuestas (Thannickal y Fanburg, 2000; Dröge, 2001; Janssen-Heininger *et al.*, 2008). Parece que uno de los mecanismos más importantes de señalización de las ROS es mediante la inactivación reversible de cisteínas catalíticas (Denu y Dixon, 1998; Lee y Esselman, 2002; Chiarugi y Cirri, 2003; Juarez *et al.*, 2008), como sucede en el caso de las PTPs, cuya misión es inactivar la señalización desde los RTKs situados en la membrana plasmática (Óstman y Böhmer, 2001). También se sabe que la producción de al menos dos ROS, el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, tiene lugar de forma fisiológica mediante complejos enzimáticos. Por lo tanto, en la actualidad se puede afirmar que estas ROS actúan como moléculas señalizadoras y segundos mensajeros celulares.

También se está estudiando el papel de las ROS en la inducción y el mantenimiento del proceso de WH (Tscharntke *et al.*, 2007; Gurtner *et al.*, 2008; Sen y Roy, 2008). Dada la necesidad de encontrar metodologías que optimicen este proceso regenerativo, se están investigando diversos procedimientos que modulen la producción de ROS a fin de acelerar dicho proceso (Gordillo *et al.*, 2003; Ennis *et al.* 2007; Kairuz *et al.*, 2007).

Por otra parte, el EF permite la generación de ROS a través de la interacción de tres componentes: luz, un FS y O<sub>2</sub> (Robertson *et al.*, 2009), habiéndose publicado diversos trabajos y revisiones acerca del papel del EF como posible modulador de la señalización celular a través de la producción de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Zhuang y Kochevar, 2003; Almeida *et al.*, 2004; Bozkulak *et al.*, 2007; Robertson *et al.*, 2009). En este sentido, resulta de gran interés estudiar el posible efecto proliferativo que pudiera tener el EF en la aceleración del proceso de WH (Adili *et al.*, 2002; Karrer *et al.*, 2004; Gál *et al.*, 2009; Zungu *et al.*, 2009; Liebmann *et al.*, 2010). El objetivo fundamental de este trabajo ha sido estudiar las condiciones fotodinámicas óptimas que sean capaces de promover un incremento en la proliferación de queratinocitos humanos y analizar algunos de los mecanismos implicados en este proceso.

## **2. El efecto fotodinámico y la producción intracelular de ROS**

La incubación de la línea celular HaCaT con distintas concentraciones de MAL durante 5 h generó un aumento en la concentración intracelular de Pp IX, evaluada mediante citometría de flujo y microscopia de fluorescencia (Figuras 12 y 13). Este aumento de producción de la Pp IX fue significativo tras la incubación con MAL 0,5 y 1 mM, mientras que con MAL 0,1 mM se elevó ligeramente la concentración de Pp IX, y aunque este incremento no fue estadísticamente significativo, presentó valores cercanos a la significación ( $0,05 < p < 0,1$ ). Las imágenes de fluorescencia mostraron un incremento en la emisión fluorescente de la Pp IX comparada con los controles tras la incubación con MAL 0,1 mM (Figura 13A' y B'). Conforme mayor fue la concentración de MAL mayor fue también la señal de fluorescencia registrada en el interior de las células y en las regiones situadas entre las células adyacentes de una misma colonia. Existen estudios que indican una localización citoplasmática y en la membrana plasmática de la Pp IX (Ji *et al.*, 2006). Dicha localización explicaría el carácter difuso de la emisión fluorescente y también el que la señal fuese más intensa en las regiones de contacto entre las membranas plasmáticas de las células de una misma colonia.



La aplicación del tratamiento definido como TFE (incubación con MAL 0,1 mM durante 5 h seguida de irradiación con luz roja durante 10 minutos) aumentó ligeramente los niveles de ROS medidos mediante citometría de flujo (Figura 15B'), que aunque no alcanzaron la significación estadística, mostraron un p-valor cercano a la misma ( $0,05 < p < 0,1$ ). La aplicación de condiciones de tipo TFD (MAL 1 mM) sí incrementaron significativamente los niveles de ROS intracelulares (Figura 15C') (Halliwell y Whiteman, 2004; Daghasanli *et al.*, 2008). Como se puede observar en la Figura 15A', las células control apenas mostraron una cierta emisión de la DF, el compuesto fluorescente utilizado para poner de manifiesto la presencia de ROS. También se observó, en contraste de fase, que las células más dañadas inmediatamente después de la aplicación del TFD fueron, precisamente, las células que mostraron una señal fluorescente más intensa de la DF (parte inferior de las Figuras 15C y C').

En resumen, las condiciones experimentales utilizadas para inducir el TFE provocan un incremento leve, pero manifiesto, en los niveles intracelulares tanto de Pp IX como de ROS.

La naturaleza de las ROS generadas durante el TFE probablemente sea muy variada. Bajo condiciones de cultivo celular la concentración de  $O_2$  es elevada, ya que las células están expuestas a la presión parcial atmosférica ( $p_{O_2} \approx 210$  mbar). Por lo tanto, al someter a las células al EF probablemente se producirá  $^1O_2$  de forma abundante. Se estima que la distancia de difusión del  $^1O_2$  es del orden de unos pocos centenares de nm (Schweitzer y Schmidt, 2003; Redmond y Kochevar, 2006; He *et al.*, 2008a). Esto es debido, fundamentalmente, a la inactivación del  $^1O_2$  en su interacción con el  $H_2O$ , que transforma la energía de excitación electrónica en energía vibracional y calor. También porque se producen reacciones de adición en los dobles enlaces de muchas moléculas orgánicas, como ácidos grasos o compuestos aromáticos, de forma muy eficiente. Sin embargo, recientemente se han publicado resultados que indican que la distancia de difusión del  $^1O_2$  podría ser mayor de lo establecido previamente, alcanzándose valores de varias micras (Skovsen *et al.*, 2005; Hatz *et al.*, 2007). Estas discrepancias en las distancias de difusión

se pueden entender cuando se observa que el  $^1\text{O}_2$  reacciona rápidamente con diversos metabolitos celulares para dar lugar a otras ROS de vida más larga que el propio  $^1\text{O}_2$ , tales como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno. Así, el  $^1\text{O}_2$  reacciona con el NADH/NADPH para producir dos moléculas de superóxido en el proceso (Petrat *et al.*, 2003). Asimismo, el  $^1\text{O}_2$  oxida al ascorbato celular para formar tanto anión superóxido como peróxido de hidrógeno (Kramarenko *et al.*, 2006). Estas reacciones recuerdan de forma notable la generación de superóxido que tiene lugar en el complejo NOX (Bedard y Krause, 2007). Diversos peróxidos orgánicos, fruto de la reacción ya comentada entre el  $^1\text{O}_2$  y los dobles enlaces de muchas moléculas orgánicas, terminan generando también peróxido de hidrógeno (Girotti, 2008). Por lo tanto, una producción moderada de  $^1\text{O}_2$  en el medio intracelular o en las inmediaciones de la célula puede imitar la producción de ROS señalizadoras, como superóxido y peróxido de hidrógeno, por parte del complejo NOX.

### **3. El TFE modula la proliferación de las células HaCaT en cultivo**

Para evaluar la respuesta proliferativa de las células HaCaT al TFE se utilizaron diversas técnicas de medida de la proliferación celular. Todos los resultados obtenidos indicaron que el TFE aumentaba la tasa proliferativa en las células. La primera técnica utilizada fue el ensayo de viabilidad celular del MTT. Se observó un pequeño pero significativo aumento en la reducción del tetrazolio a formazán 24 h y 48 h después del TFE (Figura 16). Sin embargo, esta reducción depende, no sólo del número total de células, sino del estado metabólico de cada una de ellas. Los resultados podían indicar un aumento del metabolismo celular tras el TFE, y no un incremento en la proliferación. Por lo tanto, se utilizaron técnicas complementarias para la medida de la proliferación celular que permitiesen establecer si los resultados obtenidos con el ensayo del MTT se debían, bien a un aumento de la proliferación, o bien a un incremento del metabolismo celular. Un incremento en el número de células, como consecuencia directa de una mayor proliferación, explica mejor los resultados experimentales del ensayo de viabilidad que una activación del metabolismo celular. El ensayo del MTT se ha utilizado con anterioridad para demostrar aumentos en la proliferación en cultivo, incluidas células HaCaT, precisamente

con tratamientos de fotoestimulación (Vinck *et al.*, 2003; Beak *et al.*, 2004; Han y He, 2009). Por lo tanto, es una medida indirecta, pero adecuada, de la proliferación celular.

Una de las técnicas complementarias utilizadas fue el recuento del porcentaje de células que se encontraba en alguna de las fases de la mitosis (IM) a distintos tiempos tras la aplicación del TFE (Figura 17). Los resultados indicaron que el TFE incrementó de forma significativa el IM a las 24 h del tratamiento. Este aumento de la proliferación fue del orden del 40% con respecto a los controles (4,5 % frente a 6,5%). El incremento del IM se mantuvo a las 48 h, pero no fue significativamente mayor comparado con el IM del control. Estos resultados permiten explicar los datos obtenidos con el ensayo del MTT. El TFE provocó un aumento puntual en la proliferación celular durante las primeras 24 h después del tratamiento y aumentó el número total de células. El ensayo del MTT mostró un incremento en la cantidad de formazán formado, consecuencia directa de una mayor cantidad de células presentes en el cultivo tras el TFE. Transcurridas 48 h desde la aplicación del TFE, la tasa de proliferación en las células tratadas volvió a los niveles normales, pero se mantuvo una mayor población celular de partida, por lo que el ensayo de proliferación volvió a presentar un valor mayor con respecto a los controles. El efecto de la aplicación de un TFD en el IM fue un descenso significativo del porcentaje de células en mitosis a las 24 h del tratamiento (Figura 18). Estos resultados parecen indicar que el TFD provoca daño celular, dado que genera una mayor cantidad de ROS.

Como técnica complementaria en el estudio del efecto del TFE en la proliferación celular, se analizó el ciclo celular mediante tinción celular con PI y citometría de flujo. Además, este tipo de análisis permitió establecer de forma aproximada si se producía algún tipo de muerte celular tras la aplicación del TFE. La típica curva de ciclo celular con dos picos, que se corresponden con las células en las fases  $G_1$  y  $G_2/M$  del ciclo, observada en los controles se transformó en una curva con tres picos en las células sometidas al TFE. Este tercer pico corresponde a células sincronizadas en la fase S del ciclo (Figura 19D). Los resultados obtenidos a las 48 h de aplicar el TFE mostraron una

distribución del ciclo celular muy similar a la de las células control (Figura 19E y H).

En conjunto estos resultados parecen indicar que los incrementos observados en la proliferación celular y el IM de las células sometidas al TFE se corresponden con un aumento de la proliferación celular, y no con un proceso de bloqueo mitótico o un incremento del metabolismo celular. Es interesante señalar que no se observó ninguna población celular en la región sub-G<sub>1</sub> de la curva, que normalmente se asocia a muerte celular, tras la aplicación del TFE, lo que indica que el tratamiento no produce daño en las células sometidas al tratamiento.

Se compararon los porcentajes correspondientes a cada una de las fases del ciclo en función del tiempo transcurrido desde los tratamientos. Se observó un descenso significativo de las células en la fase G<sub>1</sub> y un aumento significativo de las células en la fase S del ciclo 24 h después de aplicarse el TFE, comparadas con las células control (Figura 20A y B). Estas diferencias desaparecieron a las 48 h del tratamiento (Figura 20D-F). Los resultados obtenidos son sorprendentemente parecidos a los publicados recientemente en cuanto a la estimulación de células HaCaT mediante la exposición a dosis muy bajas de UVA y UVB (He *et al.*, 2008b; Han y He, 2009). Estos resultados mostraron un incremento significativo de la proliferación celular tras dosis de UVA de 1-4 J/cm<sup>2</sup> y de UVB de 2,5-10 mJ/cm<sup>2</sup>. En total acuerdo con nuestros resultados, hallaron un incremento significativo de las células en fase S del ciclo entre 18 h y 24 h después de la exposición a UVA (He *et al.*, 2008b). Dado que el mecanismo de acción a nivel celular del UVA es de tipo fotodinámico, actuando de FSs algunos cromóforos endógenos, se concluye que el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> debe de ser capaz de estimular la proliferación celular a muy bajas concentraciones, sin alterar la fisiología normal de la célula.

También se estudió la estimulación de la proliferación inducida por el TFE mediante la técnica de marcaje con CFSE. Los resultados obtenidos mostraron que las células que fueron sometidas al TFE presentaron una señal fluorescente significativamente menor que la de las células control a las 24 h

del tratamiento (Figura 21A). La pérdida de la emisión fluorescente es debida al proceso de división celular. Las diferencias dejaron de ser significativas a las 48 h de los tratamientos. Este comportamiento se puede explicar por varias razones. Por una parte pudo ser debido a la desaparición del efecto estimulante a medio plazo. Por otra, existe un incremento en la variabilidad de la emisión fluorescente de las células conforme van perdiendo la sincronización en el ciclo, ya que se las sincronizaba por privación de suero previamente al tratamiento. Debido precisamente a la elevada dispersión de las curvas de emisión en los distintos experimentos, se analizó aquella porción de la curva con menor emisión. La forma de delimitar esta región de la curva de emisión, denominada “frente de proliferación”, se explicó con detalle en la sección de Materiales y Métodos. La comparación del porcentaje de células contenidas en el “frente de proliferación” tras los distintos tratamientos indicó que había un porcentaje significativamente superior de células en el “frente” 24 h después de la aplicación del TFE comparado con los controles. Estas diferencias en los porcentajes desaparecieron a las 48 h post-tratamiento. Los resultados obtenidos a través del marcaje con CFSE parecen indicar que la aplicación del TFE estimuló la proliferación de células HaCaT en las primeras 24 h después del tratamiento, aunque la estimulación no se prolongó a tiempos más largos.

Se evaluaron otros dos parámetros relacionados con las medidas de proliferación celular: el recuento de células positivas para Ki-67 y el recuento de células que mostraban cuerpos de Flemming. Ki-67 es un antígeno nuclear que aparece en las células que están en proliferación. Su uso como marcador de proliferación está muy extendido tanto en citología como en histología. Los resultados de marcaje con Ki-67 obtenidos después del TFE mostraron un incremento significativo de las células positivas para Ki-67 frente al control (Figura 22). Este incremento fue en torno al 30% (2,46% frente a 3,22%). Por otra parte, el recuento de células con cuerpos de Flemming también permite estimar el número de mitosis que han tenido lugar en el cultivo celular en las horas previas a la evaluación. Estas estructuras de microtúbulos aparecen cuando la división mitótica ha tenido lugar de forma adecuada, después de la citocinesis. Los resultados también mostraron que las células que habían recibido un TFE presentaban a las 24 h del tratamiento un aumento significativo

del número de cuerpos de Flemming frente a los controles (Figura 23). Dada la elevada correlación encontrada entre el IM de un cultivo celular y la presencia de cuerpos de Flemming, se puede afirmar que el recuento de cuerpos residuales es una medida complementaria adecuada para estimar el grado de proliferación celular.

Muchos de los resultados de la respuesta proliferativa muestran una estimulación de la misma 24 h después de la aplicación del TFE y un retorno a las condiciones basales a partir de las 48 h. Para estudiar si los cambios observados en la tasa de proliferación celular después de la aplicación del TFE eran puntuales o se mantenían a lo largo del tiempo, se midieron la proliferación celular mediante el ensayo del MTT y el IM hasta 96 h después de aplicar el TFE. Al mismo tiempo se quiso averiguar si dos TFE consecutivos daban lugar a incrementos de la proliferación independientes el uno del otro o si sus efectos se sumarían en el tiempo. Los resultados obtenidos, tanto con el ensayo del MTT como con el recuento del IM, mostraron que la acción del TFE es puntual y no se mantiene más allá de las primeras 24 h después del tratamiento. Tras la aplicación de un TFE, se observó un incremento en el número de células que fue significativamente superior al valor de proliferación del control hasta las 96 h después del tratamiento. La diferencia de proliferación con el control se mantuvo aproximadamente constante durante las primeras 72 h, para disminuir a las 96 h. La aplicación de un segundo TFE a las 48 h del primero provocó un segundo incremento de la proliferación celular, que fue significativamente mayor que el incremento sostenido si sólo se hubiera aplicado un TFE. Una tendencia similar se observó cuando se evaluaron los IM. A las 24 h de aplicar el TFE se produjo un incremento significativo del IM de las células tratadas. Posteriormente, el IM descendió pero se mantuvo significativamente por encima del control a las 48 h del tratamiento. A partir de las 72 h, el IM tomó un valor similar al de las células control, y a las 96 h disminuyó significativamente por debajo del IM control.

La aplicación de un segundo TFE a las 48 h del primero provocó otro aumento significativo del IM en las células tratadas comparadas con las células control. Al comparar los valores del IM de las células sometidas a uno o dos TFE, se observó que la estimulación de la proliferación celular dependía del número de tratamientos aplicados y que el efecto no se mantenía más allá de las 24 h-48 h después de la aplicación del TFE. Estos resultados sugieren que la aplicación del TFE induce una estimulación puntual de la proliferación celular en células HaCaT, que no se mantiene en el tiempo más allá de uno o, a lo sumo, dos ciclos mitóticos.

#### **4. El TFE incrementa los niveles de ciclina D1**

Como ya se ha comentado, el TFE produce una estimulación sobre la proliferación celular, precedida de una entrada en ciclo de parte de las células tratadas. Cabe pensar, por tanto, que dicho tratamiento incrementa los niveles de ciclina D1 en la célula. La ciclina D1 es la primera ciclina que se activa durante el ciclo celular y señala las primeras etapas de transición de la fase  $G_1$  a la fase S del ciclo (Villanueva *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en los experimentos mostraron un claro aumento de los niveles intracelulares de ciclina D1 tras el TFE en comparación con los controles. También parece favorecer un mantenimiento durante periodos de tiempo más largos de niveles de ciclina D1 más elevados al compararse con las células control. Así, el TFE incrementaría la actividad de las rutas de señalización que actúan sobre la ciclina D1 y mantendría dichas rutas activas durante más tiempo, aunque de manera transitoria. Estos resultados coinciden con datos publicados, según los cuales la ciclina D1 es una de las dianas más importantes durante la regulación redox del ciclo celular (Menon *et al.*, 2003; Burch y Heintz, 2005). La entrada en ciclo celular en células del epitelio pulmonar de ratón es dependiente de la producción de ROS por parte del complejo NOX (Ranjan *et al.*, 2006), y también se ha observado que la exposición de fibroblastos murinos a peróxido de hidrógeno aumenta los niveles de ciclina D1 (Martínez-Muñoz *et al.*, 2001). Todas estas evidencias apuntan a que la producción de ROS por parte del TFE provocaría un desplazamiento del  $E_C$  hacia valores más oxidantes, hecho que desembocaría en un incremento en los niveles de ciclina D1.

## 5. El TFE amplifica la acción proliferativa del suero

Los resultados presentados parecen indicar que la aplicación del TFE incrementa o refuerza las rutas de señalización celulares que provocan la entrada en el ciclo celular. Como la respuesta proliferativa depende de la concentración de los factores de crecimiento presentes en el medio de cultivo, se decidió estudiar si el TFE podía sustituir de forma parcial o total a estos factores de crecimiento. Para ello, las células fueron incubadas con concentraciones decrecientes de suero después de someterlas a un TFE. Como mostraron los resultados, tanto la proliferación celular como los IM aumentaron (en muchos casos de forma significativa) a las 24 h del tratamiento comparados con su control. Lógicamente, conforme menor fue la concentración de suero con la que se incubaron las células, mayor fue la disminución de la proliferación celular y el IM. Al disminuir la concentración de suero el TFE mantuvo niveles de proliferación más altos que los controles 24 h después del tratamiento. A las 48 h las diferencias entre células control y sometidas al TFE siguieron siendo apreciables en cuanto a la proliferación celular medida mediante el ensayo del MTT. Sin embargo, los IM a las 48 h se igualaron a los de los controles.

Estos resultados son muy interesantes porque ponen de manifiesto dos aspectos. Por una parte, la acción puntual del TFE, cuyo efecto se observó, una vez más, sólo en las primeras 24 h después del tratamiento. Por otra, los resultados sugieren que la aplicación del TFE parece actuar amplificando las señales mitogénicas de los factores de crecimiento celular presentes en el suero, pero no independiza a las células de la presencia de dichos factores. Es decir, el TFE no parece capaz de sustituir totalmente a los factores de crecimiento del suero, pero sí que incrementa la señalización a través de las rutas celulares activadas por estos factores. Estos resultados son similares a los obtenidos en fibroblastos murinos, en los que la exposición a dosis muy bajas de radiación UVA, UVB o UVC disminuye, mediante un mecanismo dependiente de la generación de ROS intracelulares, la apoptosis tras un periodo de privación de suero (Ibuki y Goto, 2002; Ibuki *et al.*, 2008). Este



incremento de la supervivencia celular por exposición al UV tiene lugar a través de la ruta de Akt1 y es de destacar que la incubación con N-acetilcisteína, un antioxidante que aumenta los niveles de GSH y desplaza el  $E_C$  hacia valores reducidos, anuló el efecto antiapoptótico de la radiación UV (Ibuki *et al.*, 2008).

## 6. El efecto proliferativo del TFE depende de la producción de $^1O_2$

Los resultados ya expuestos muestran que el TFE es un tratamiento fotoquímico que estimula la proliferación celular en células HaCaT, ya que la incubación con MAL o la exposición a la luz roja, por sí solas, no producen cambios en dicha proliferación. Los datos obtenidos ponen de manifiesto que el mecanismo de acción del TFE, no sólo es de origen fotoquímico, sino que depende de manera notable de la producción de  $^1O_2$ . La presencia de DABCO, un potente antioxidante e inactivador del  $^1O_2$ , consume las ROS producidas por el TFE. Así, los cultivos expuestos al TFE y al DABCO no presentaron diferencias significativas en el número de células y en el IM al compararse con el control a las 24 h de los tratamientos. Es de resaltar también que, en ausencia de TFE, la incubación con DABCO también disminuyó, sin llegar a la significación, el IM. Este hecho parece apuntar a que, efectivamente, son necesarias ciertas cantidades de ROS que desplacen el  $E_C$  hacia valores oxidantes para activar la entrada en el ciclo celular (Liu *et al.*, 1999; Onumah *et al.*, 2009). De hecho, la incubación con DABCO antes del TFE anuló cualquier incremento en la expresión de la ciclina D1, lo que pone de manifiesto la importancia que tienen las ROS y el valor que toma  $E_C$  para señalar la entrada en ciclo celular.

A su vez, la incubación con  $D_2O$  antes y durante la aplicación del TFE también anuló el efecto estimulante del tratamiento sobre la proliferación celular. En principio se hubiese esperado el efecto contrario: el  $D_2O$  actúa aumentando la vida media del  $^1O_2$ , por lo que cabría esperar que se diese un aumento de las ROS en presencia de  $D_2O$  y que se incrementase la respuesta proliferativa. Los resultados mostraron un comportamiento opuesto al esperado: la presencia de  $D_2O$  disminuyó la proliferación celular y el IM tras la aplicación del TFE. Estos resultados pueden explicarse si se supone que la

producción de ROS durante el TFE sin D<sub>2</sub>O se encuentra muy cerca del óptimo de concentración de ROS capaz de estimular la proliferación celular. Si esto es así, entonces cualquier incremento de las ROS con respecto a esa concentración óptima provocaría una disminución, en vez de una estimulación, de la proliferación celular. Parece ser que, efectivamente, este pudiera ser el caso. Si se tienen en cuenta los resultados mostrados en la Figura 16 se observa que un TFD, tras la incubación con MAL 0,5 mM, ya produce daño en vez de estimulación. A su vez, el tratamiento fotosensibilizante tras la incubación con MAL 0,05 mM no parece generar un efecto estimulante, probablemente porque la cantidad de ROS generada es tan baja que no amplifica adecuadamente la señalización proliferativa que recibe la célula del medio. En este sentido, el efecto potenciador de la acción del <sup>1</sup>O<sub>2</sub> por parte del D<sub>2</sub>O probablemente esté elevando en exceso la concentración de ROS producidas durante el TFE, desplazando el E<sub>C</sub> hacia valores demasiado oxidantes y alejándolo del óptimo proliferativo (Laurent *et al.* 2005). Por otra parte, también hay que asumir una cierta acción antiproliferativa intrínseca del D<sub>2</sub>O ya descrita en la literatura, inevitable cuando se trabaja con altas concentraciones de este compuesto (Takeda *et al.*, 1998; Skovsen *et al.*, 2005; Hatz *et al.*, 2007). Una concentración excesiva de ROS parece provocar también una disminución en los niveles de ciclina D1 (Burch y Heintz, 2005), como demostró la aplicación del TFE tras la incubación con D<sub>2</sub>O. Aunque la incubación con D<sub>2</sub>O bastó por sí sola para disminuir significativamente los niveles de ciclina D1 con respecto a los controles, si además se aplicaba posteriormente un TFE se reducían aún más estos niveles de ciclina a las 6 h y 8 h posteriores al TFE.

En conjunto, estos resultados parecen indicar que el efecto estimulante sobre la proliferación celular del TFE depende de la producción de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> por parte de la Pp IX sintetizada tras la incubación con MAL. Esta producción de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> daría lugar a un aumento en la concentración intracelular de ROS, que desplazaría el E<sub>C</sub> hacia valores oxidantes, favoreciendo la entrada en el ciclo celular.

## 7. El efecto proliferativo del TFE depende de la actividad del complejo NOX y de la ruta de la quinasa Src

Una vez establecido el papel del  $^1\text{O}_2$  y de las ROS en general en la inducción del efecto proliferativo por parte del TFE, se quiso investigar si este efecto dependía también de la producción de ROS por parte de la célula a través del complejo NOX. Es decir, si las ROS producidas por el TFE inducían, a su vez, la producción de ROS por parte de NOX, en un proceso de retroalimentación positiva. Para ello se incubó a las células con DPI, un inhibidor del complejo NOX (O'Donnell *et al.*, 1993; Scaife, 2004). Los resultados indicaron que, efectivamente, es necesaria la activación del complejo NOX para que tenga lugar el efecto estimulante de la proliferación inducido por el TFE. En presencia de DPI la aplicación del TFE no sólo no provocó un incremento en el número de células, sino que produjo un leve pero significativo descenso en la proliferación celular comparado con las células sometidas sólo al TFE. Bajo las mismas condiciones también se redujo el IM de forma significativa con respecto al valor del TFE. Asimismo, la inhibición del complejo NOX con DPI provocó que los niveles de ciclina D1 se redujeran hasta los mismos niveles que las células control tras el TFE, anulándose cualquier efecto estimulante.

En conjunto, estos resultados sugieren que una producción adecuada de ROS por parte del complejo NOX parece necesaria para que tenga lugar la estimulación de la proliferación tras el TFE. La inhibición de NOX por parte del DPI probablemente desplaza el  $E_C$  hasta valores excesivamente reducidos, inhibiéndose la entrada en ciclo mediada por la acción fisiológica de las ROS. En conclusión, parece que para que se produzca un aumento en los niveles de ciclina D1 y un incremento de la proliferación tras el TFE, resulta necesario un funcionamiento adecuado del complejo NOX.

La quinasa Src es un componente muy importante de algunas de las rutas de señalización para la entrada en ciclo celular. Además, recientemente se ha demostrado que posee una importante regulación redox de su actividad fosforilativa (Chiarugi, 2008). Por estas razones se investigó el posible papel de

Src en el mecanismo de acción del TFE. La incubación con PP2, por sí sola, provocó una disminución significativa a las 24 h de la incubación tanto de la proliferación celular como del IM, comparados con las células control. Las células sometidas al TFE e incubadas con PP2 mostraron una reducción significativa de la proliferación celular y del IM a las 24 h, comparadas tanto con las células sometidas al TFE como con las células que sólo fueron incubadas con PP2. Estos resultados parecen indicar que las rutas dependientes de la quinasa Src son muy importantes en el mantenimiento de la supervivencia celular y en la inducción de entrada en ciclo celular tras la aplicación del TFE. Cuando se inhibe esta ruta por la presencia de PP2, la moderada producción de ROS por parte del TFE parece ser suficiente para alterar hasta cierto punto la fisiología celular normal, alteración que se traduciría en una disminución de la proliferación celular.

La incubación con PP2 mostró que, para observarse una adecuada activación de la ciclina D1, era necesario que la quinasa Src señalizara adecuadamente. La inhibición de la ruta de supervivencia y proliferación de la quinasa Src anuló los efectos estimulantes del TFE sobre los niveles de ciclina D1. Resultados similares se han obtenido en células de cáncer de mama humano, en las que la incubación con PP2 inhibió la activación de la ruta de ERK1/2 por la quinasa Src, tras la activación del receptor para el EGF por exposición a peróxido de hidrógeno (Li *et al.*, 2006). Por tanto, este es un posible mecanismo mediante el cual PP2 inhibe la proliferación de las células HaCaT. Al contrario de lo que ocurrió tras la incubación con DPI, donde la aplicación del TFE anuló parcialmente los efectos negativos del compuesto sobre la proliferación celular, tras la incubación con PP2 el TFE aumentó estos efectos. Parece que, al mismo tiempo que se produce una variación del  $E_c$  hacia valores oxidantes, otras rutas de señalización celular independientes del estado redox deben de señalizar correctamente la entrada en ciclo para que la célula prolifere, como parecen indicar los resultados obtenidos tras la inhibición de la quinasa Src.

## 8. El TFE incrementa la concentración de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular

El TFE también modificó de forma temporal los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en comparación con los controles. El aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  es una de las primeras respuestas celulares que suelen observarse tras la aplicación de un tratamiento fotosensibilizante (Lavi *et al.*, 2003; Alexandratou *et al.*, 2005). Este aumento parece estar parcialmente provocado por la interacción de las ROS con los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , especialmente sensibles a la oxidación de sus cisteínas estructurales (Kourie, 1998; Thannickal y Fanburg, 2000; Bedard y Krause, 2007). Se ha descrito una relación entre la exposición de células tumorales de próstata a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno con la aparición de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cuanto mayor fue la concentración de peróxido, mayores fueron la amplitud y la duración de la onda de  $\text{Ca}^{2+}$  posterior. A su vez, las características de la onda de  $\text{Ca}^{2+}$  modificaba la respuesta celular final frente al peróxido, desde un aumento de la proliferación hasta la muerte celular (Wartenberg *et al.*, 1999). Por ejemplo, concentraciones de peróxido de hidrógeno entre  $10^{-6}$  y  $10^{-4}$  M provocaron ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  de baja amplitud y corta duración que dieron lugar a una respuesta proliferativa, mientras que concentraciones de peróxido más elevadas dieron lugar a ondas amplias y sostenidas, implicadas en el bloqueo del ciclo celular y la muerte. La exposición de oocitos de *Xenopus* a peróxido de hidrógeno provocó ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  y toda una cascada de señalización celular muy similar a la que tiene lugar tras la fertilización por parte del espermatozoide (Sato *et al.*, 2001), y en linfocitos B se ha descrito que la señalización del receptor de antígeno en la membrana, que controla la activación de la respuesta inmune celular, es debida a una doble señal cooperativa entre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmáticos y la concentración de ROS intracelular (Kumar Singh *et al.* 2005).

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que es posible modificar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  tras la aplicación del TFE, fenómeno que ya se ha descrito en la literatura utilizando otros tratamientos para modificar el estado redox celular.

## 9. El peróxido de hidrógeno a bajas concentraciones produce efectos similares a los del TFE

El peróxido de hidrógeno estimula la proliferación celular en concentraciones en torno a micromolar. Por este motivo se decidió comparar las respuestas celulares obtenidas tras la aplicación del TFE o tras la incubación con distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno, evaluando la proliferación celular y el IM. Como se puede observar en las Figuras 37 y 38 la incubación con peróxido a una concentración de  $10^{-5}$  M durante 10 minutos fue la condición experimental que más se aproximó en sus efectos sobre la proliferación celular y el valor del IM a los obtenidos tras la aplicación del TFE. La incubación con una concentración menor de peróxido ( $10^{-6}$  M) no modificó los parámetros de proliferación estudiados comparados con los controles. Mayores concentraciones de peróxido ( $10^{-4}$  –  $10^{-2}$  M), por contra, provocaron una disminución significativa de la proliferación celular y del IM a las 24 h y 48 h.

Estos resultados muestran perfectamente el efecto gradual que tienen distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno sobre la proliferación celular. El efecto estimulante de la proliferación celular con bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno ya se comentó con anterioridad (Liu *et al.*, 2003; Bartosz, 2009; Onumah *et al.*, 2009). Bajas concentraciones de peróxido actúan provocando la inactivación reversible de las PTPs, lo que facilita un incremento en la señalización de diversas rutas de supervivencia y proliferación celular (Cho *et al.*, 2004; Rhee *et al.*, 2005; Juarez *et al.*, 2008). Por ejemplo, la activación del receptor del EGF y de la ruta ERK1/2 por exposición de queratinocitos a UVB y UVA, requiere de la generación de peróxido de hidrógeno por acción de estas radiaciones (Peus *et al.*, 1999; von Monfort *et al.*, 2006a). Se ha demostrado que la producción de peróxido en queratinocitos humanos durante y tras su exposición a UVA es debida a la activación del complejo NOX (Valencia y Kochevar, 2008).

## 10. El TFE modifica el citoesqueleto

Los resultados de este estudio muestran que la aplicación del TFE provocó cambios en la morfología de las células HaCaT. Estos cambios se registraron en dos de los componentes del citoesqueleto: los microtúbulos y los microfilamentos de actina. Los cambios en los microtúbulos se produjeron a tiempos largos (12 h – 24 h), mientras que las modificaciones en los microfilamentos de actina se observaron a tiempos cortos (15 - 60 minutos) tras la aplicación del TFE.

Las imágenes de fluorescencia de células HaCaT sometidas al TFE mostraron cambios en la morfología celular y en la disposición general del citoesqueleto de microtúbulos durante las primeras 24 h posteriores al tratamiento. Durante este periodo, las células adoptaron un aspecto cada vez más fusiforme y la mayoría de las células se orientó según un eje común. A partir de las 24 h posteriores al tratamiento, las células recuperaron su aspecto poligonal y no mostraron un eje de orientación común preferente. Estos resultados podrían interpretarse como la desdiferenciación hacia una morfología más fibroblástica por parte de los queratinocitos. Estos cambios morfológicos en queratinocitos están descritos en la literatura y tendrían por objeto facilitar la migración durante el proceso de WH (Werner *et al.*, 2007; Gurtner *et al.*, 2008; Sen y Roy, 2008). Una reestructuración de los microtúbulos muy parecida a la observada en las imágenes mostradas en la Figura 39 tiene lugar en diversos tipos celulares durante el proceso de WH (Magdalena *et al.*, 2002; Omelchenko *et al.*, 2003; Onishi *et al.*, 2007). Se ha descrito que estos cambios en la disposición y organización de los microtúbulos hacia una morfología más fibroblástica dependen en parte de la activación de la proteína Rac (Hu *et al.*, 2002; Omelchenko *et al.*, 2003; Onishi *et al.*, 2007).

Por otra parte, también se observó una modificación en la disposición de los microfilamentos de actina a tiempos muy cortos tras la aplicación del TFE. Se observó que las células sometidas al TFE adoptaron una morfología redondeada, perdieron las fibras de estrés y desarrollaron bandas de actina cortical entre 0 y 60 minutos después del tratamiento. Estas modificaciones de

los microfilamentos se corresponden con los patrones de cambio de la actina descritos en la literatura tras la activación de la proteína Rac (Hall, 1998; Nimnual *et al.*, 2003). También se ha descrito que esta acción de Rac depende, parcialmente, de la presencia de ROS en células endoteliales (Wojciak-Stothard *et al.*, 2005; Moldovan *et al.*, 2006). La proteína Rac, además de su función a nivel de citoesqueleto, también es un componente esencial del complejo NOX (Werner, 2004). Así, Rac controla tanto la activación del complejo NOX, como determinados cambios en la distribución de los microfilamentos de actina.

Además de la acción general de Rac sobre el citoesqueleto de actina, las ROS pueden modular el comportamiento de los microfilamentos a través de otros dos mecanismos conocidos: la oxidación directa de la cisteína 374 de la actina y la inhibición de la fosfatasa LMW-PTP (Moldovan *et al.*, 2006). El primer mecanismo aumenta la polimerización de los microfilamentos por puentes disulfuro, lo que se traduce en una disminución del número de fibras de estrés y en un aumento de la actina cortical bajo la membrana plasmática (Dalle-Donne *et al.*, 2001; Chiarugi y Fiaschi, 2007; Chiarugi, 2008). El segundo mecanismo aumenta la actividad de la proteína p190Rho-GAP que hidroliza el GTP de Rho activo a GDP, inactivando a Rho (Nimnual *et al.*, 2003; Wojciak-Stothard *et al.*, 2005). Inicialmente el mecanismo actúa inhibiendo a la proteína LMW-PTP, que es una fosfatasa que defosforila a p190Rho-GAP. Dado que las acciones de Rac y Rho son antagónicas, la inhibición indirecta de Rho, a través de LMW-PTP y p190Rho-GAP, y la activación de Rac en presencia de ROS explican las modificaciones del citoesqueleto de actina observadas tras la aplicación del TFE. El resultado de estos dos mecanismos de acción de las ROS es la inhibición de la adhesión celular al sustrato, el desarrollo de lamelipodios y una predisposición a la migración celular (Rigacci *et al.*, 2002; Alexandrova *et al.*, 2006; Fiaschi *et al.*, 2006; Sangrar *et al.*, 2007). Por otro lado, cuando los niveles de ROS son elevados y provocan estrés oxidativo, parece ocurrir el fenómeno contrario, por el que las células incrementan las fibras de estrés a través de una ruta que implica la activación de Rho en vez de Rac (Nguyen *et al.*, 2004; Pluskalová *et al.*, 2006; Ota *et al.*, 2009).



En resumen, la aplicación del TFE parece modificar el citoesqueleto de actina de una forma similar a los cambios descritos en la literatura cuando se activa la proteína Rac.

## 11. El TFE no produce daño clastogénico

Con objeto de descartar la inducción de daño a la cromatina por acción del TFE, aunque el tratamiento produzca un incremento en la proliferación, se realizó un recuento del número de células con micronúcleos. Los resultados comparativos entre la aplicación de un TFE y la incubación con distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno (que es un reconocido agente clastogénico) indicaron que el TFE no aumentó de forma significativa, frente a un control, el número de micronúcleos hasta 48 h después del tratamiento. Este resultado es importante, ya que permitiría concluir que la aplicación del TFE no provoca daños en la cromatina de las células HaCaT sometidas al tratamiento, pese a que genera  $^1\text{O}_2$  intracelular. El daño genético estable descrito en queratinocitos humanos expuestos a radiación UVA, que es un potente agente mutagénico, parece estar provocado por la inducción de dímeros entre las bases, y no por la modificación oxidativa de las mismas al interactuar con el  $^1\text{O}_2$ , como se creía (Lisby *et al.*, 2005; Mouret *et al.*, 2006; Ikehata y Ono, 2007). Este daño oxidativo en el ADN parece repararse rápida y eficazmente (Besaratina *et al.*, 2008; Ikehata *et al.*, 2008). Por contra, la dimerización inducida mediante una reacción fotoquímica directa entre el ADN y diversos FSs endógenos, en presencia de radiación UVA, parece ser un tipo de lesión genética mucho más estable e imita el tipo de daño genético característico tras la exposición celular al UVB (Kappes *et al.*, 2006; Mouret *et al.*, 2006). Este último tipo de lesión genética, la dimerización de bases, es la implicada directamente en la inducción y progresión del cáncer cutáneo no melanoma.

Existen diversos estudios publicados sobre la ausencia de genotoxicidad de los tratamientos fotosensibilizantes. Halkiotis *et al.* demostraron la ausencia de clastogenicidad del TFD en células de carcinoma de páncreas y concluyeron que el mecanismo citotóxico observado no se debía a un daño a nivel genético (Halkiotis *et al.*, 1999). En su estudio utilizaron como FS una ftalocianina de

cinc en concentraciones entre 0,1 y 5  $\mu\text{M}$ , y la dosis de luz roja (655 nm) aplicada se situó entre 0,5 y 9  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Estas condiciones son similares a las empleadas en nuestros experimentos de TFE. También se ha demostrado la ausencia de daño genético tras un TFD con ALA (1 mM, 630 nm, 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) mediante el ensayo cometa en fibroblastos humanos (Haylett *et al.*, 2003), en condiciones fotodinámicas más drásticas que las utilizadas durante el TFE. Usando *Drosophila melanogaster* como organismo modelo, Smijs *et al.* demostraron que la aplicación de un TFD con hematoporfirina, que es un FS prácticamente idéntico en su estructura química a la Pp IX, no producía un aumento de las mutaciones genéticas comparada con organismos control (Smijs *et al.*, 2004). En conclusión, nuestros resultados sugieren que la aplicación del TFE en células HaCaT no produce daño genotóxico comparado con un control.

## 12. El TFE aumenta los niveles intracelulares de VEGF

El VEGF es el factor angiogénico más importante y uno de los factores de crecimiento esenciales durante el proceso regenerativo de WH. Por lo tanto, se quiso estudiar el efecto del TFE en los niveles intracelulares de este factor de crecimiento en células HaCaT. El TFE provocó un incremento en los niveles de VEGF tras su aplicación comparados con los controles, como se muestra en la Figura 43. El incremento resultó significativo entre las 2 h y las 8 h después de la aplicación del TFE. Desde hace algunos años se conoce el papel que tienen las ROS producidas por el complejo NOX en promover la angiogénesis, precisamente induciendo la síntesis de VEGF (Arbiser *et al.*, 2002; Maulik y Das, 2002; Ushio-Fukai, 2006). El peróxido de hidrógeno es uno de los más potentes inductores de la síntesis de VEGF en queratinocitos humanos en cultivo (Brauchle *et al.*, 1996; Mildner *et al.*, 1999; Sen *et al.*, 2002;). Este inducción de la síntesis de VEGF parece mediada por la oxidación/inactivación de la fosfatasa PTEN y la consiguiente activación, por una parte, de la ruta de PI3K/Akt (Kosmidou *et al.*, 2001; Connor *et al.*, 2005), y por otra, del factor de transcripción NF- $\kappa\text{B}$  (Maulik y Das, 2002). El papel del peróxido de hidrógeno generado por el complejo NOX en el proceso de WH parece esencial. Activa rutas de proliferación celular y de angiogénesis/vasculogénesis, y promueve la

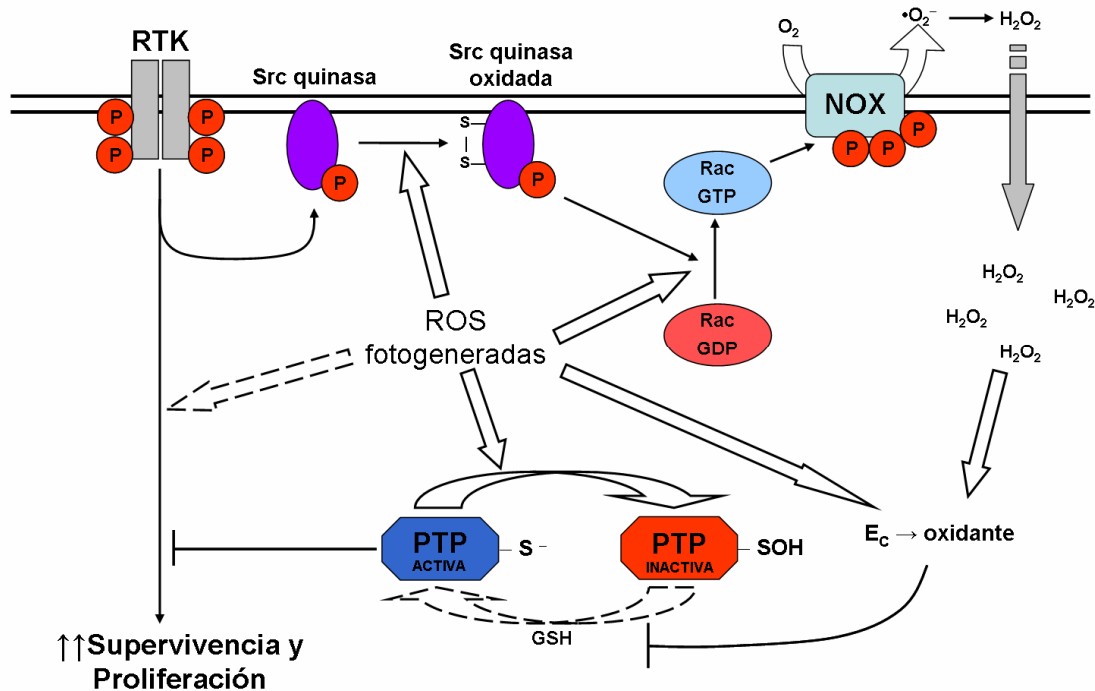
reorganización del citoesqueleto y la migración celular (Colavitti *et al.*, 2002; Xia *et al.*, 2007; Roy *et al.*, 2008; Sen y Roy; 2008).

Teniendo en cuenta las modificaciones celulares inducidas por el VEGF en el marco del proceso del WH, sería posible establecer un cierto paralelismo con los efectos provocados por el TFE en las células HaCaT. De este modo, el TFE pareció estimular a las células como si se encontrasen en una situación de WH. De hecho, existen varios trabajos en los que la aplicación de un EF es capaz de inducir una respuesta celular de tipo WH en distintas líneas celulares y tejidos. Por ejemplo, la exposición a radiación UVA ( $\approx 10 \text{ J/cm}^2$ ) provoca un incremento en la síntesis de VEGF en células HaCaT (Mildner *et al.*, 1999). La aplicación de un tratamiento fotosensibilizante en las arterias carótidas de rata aumenta significativamente el proceso de re-endotelización de las mismas (Adili *et al.*, 2002) y estos mismos tratamientos aumentan significativamente la densidad de vasos sanguíneos en el hemisferio cerebral tratado comparado con el hemisferio control en cerebros sanos de rata y ratón (Jiang *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). También se ha observado que un tratamiento fotosensibilizante, aplicado tras la inducción de un infarto de miocardio en ratas y perros, disminuye significativamente la zona dañada e incrementa la vascularización post-infarto, a través de mecanismos celulares que implican un aumento en la producción de VEGF y de NO (Tuby *et al.*, 2006). Tomando estos resultados en conjunto parece que el TFE aplicado en células HaCaT favorecería la activación de rutas de señalización celulares que inducen la puesta en marcha y el mantenimiento del proceso de WH y de la angiogénesis, a través de un incremento en la síntesis, producción y secreción del VEGF.

### 13. Modelo propuesto para explicar el mecanismo de acción del TFE a nivel celular

En conjunto, parece que el TFE modifica la proliferación y la morfología de las células HaCaT por un mecanismo que implicaría la producción de bajas concentraciones de ROS, a través de la fotoproducción de  $^1\text{O}_2$  por parte de la Pp IX. El  $^1\text{O}_2$  probablemente reacciona con distintos compuestos celulares reducidos para dar lugar a otras ROS más fisiológicas, tales como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno (Petrat *et al.*, 2003; Kramarenko *et al.*, 2006; Redmond y Kochevar, 2006). La producción de ROS mediante el TFE no parece ser suficiente por sí sola para dar lugar al fenómeno de estimulación celular. Más bien se diría que el ligero incremento en la concentración de ROS actúa como un cebador que incrementaría la producción endógena de ROS a través de la activación del complejo NOX. Una vez que activado el complejo NOX, aumentaría la señalización de una serie de rutas que desembocarían en un desplazamiento hacia valores más oxidantes del  $E_C$  y en la entrada en el ciclo celular.

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es uno de los factores proliferativos más potentes en queratinocitos. La activación del receptor del EGF aumenta la actividad de NOX1 en células vasculares de músculo liso a través de la ruta de PI3-quinasa (PI3K) (Fan *et al.*, 2005). En queratinocitos se ha observado una inhibición reversible de la PTP 1B y un incremento de la actividad de las TKs tras la activación del receptor de EGF (Lee *et al.*, 1998). Por otra parte, se sabe que la inhibición reversible de PTP 1B depende de su exposición a peróxido de hidrógeno (Salmeen *et al.*, 2003) y que los queratinocitos expresan, al menos, un miembro de la familia NOX (Chamulitrat *et al.*, 2004; Brown y Griedling, 2009). Por todas estas razones parece razonable asumir que el peróxido de hidrógeno está involucrado en la ruta de señalización del EGF en queratinocitos a través de un mecanismo que supone la inhibición reversible de la PTP 1B. En la Figura 44 se muestra un esquema propuesto para explicar el mecanismo de acción del TFE a través del incremento de la actividad de NOX, que desemboca por último en un aumento de la señalización tanto de supervivencia como de proliferación celular.



**Figura 44:** Mecanismo de acción propuesto para explicar el aumento de actividad del complejo NOX y de las rutas de supervivencia y proliferación por acción del TFE.

Como se muestra en la figura, las ROS producidas durante el TFE actuarían a dos niveles. Por una parte, producirían una modificación oxidativa de muchos componentes celulares. Por otra, aumentarían la actividad del complejo NOX, lo que a su vez elevaría la concentración de ROS intracelulares. El resultado final sería el desplazamiento del E<sub>c</sub> hacia un valor más oxidante. Como ya se ha comentado, un cambio puntual del E<sub>c</sub> hacia valores más positivos implica una tendencia a progresar en el ciclo celular desde la fase G<sub>1</sub> a la fase S (Conour *et al.*, 2004; Menon y Goswami, 2007; Hoffman, 2009).

Existen evidencias de que, además del superóxido y el peróxido de hidrógeno, también el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> es capaz de provocar la oxidación del grupo sulfhídrico a ácido sulfénico en algunas PTPs (Groß *et al.*, 1999; von Monfort *et al.*, 2006b). Este es uno de los mecanismos para explicar la activación de los RTKs y de las rutas de señalización observada tras la exposición a la radiación UV. La radiación UV provoca la activación de los receptores de membrana, con la consecuente señalización celular inadecuada (Heck *et al.*, 2004). El complejo

NOX parece tener un papel preponderante en esta señalización, actuando tanto como antena de la propia radiación UV, como transformando la energía luminosa en señal celular. Así, los cofactores del complejo NOX (citocromos, FAD y NADPH) actuarían como cromóforos que absorben los fotones UV y favorecerían la transferencia de electrones al O<sub>2</sub> desde el estado excitado (He *et al.*, 2005; Valencia y Kochevar, 2008). Las ROS producidas en el complejo NOX mediante un proceso fotoquímico favorecerían el establecimiento de un mecanismo de retroalimentación positiva, aumentando la actividad del complejo NOX. En este sentido, se ha demostrado que la incubación con DPI inhibe la producción de ROS por parte de la NOX durante la exposición de queratinocitos murinos primarios a la radiación UVA (He *et al.*, 2005). También existen pruebas que confirman el papel esencial de las ROS en la activación fotodinámica de rutas de señalización celulares por radiación UV (Tobi *et al.*, 2000; He *et al.*, 2004), y en concreto del receptor para el EGF en células HaCaT (von Monfort *et al.*, 2006). Estos ejemplos de activación de la señalización celular por UV, sobre todo UVA, son de gran interés porque representan activaciones de tipo fotodinámico, muy similares a la activación inducida durante la aplicación del TFE. En el caso del TFE simplemente se ha hecho a la célula más susceptible a la región del VIS, saturando la ruta de síntesis de la Pp IX. Los mecanismos fotodinámicos subyacentes, activando al FS en el UVA o en el VIS, son esencialmente idénticos en ambos casos (Mahmoud *et al.*, 2008).

Como han mostrado los experimentos, la ruta de la quinasa Src parece tener un papel preponderante para que tenga lugar la acción estimulante del TFE. Esta quinasa también está sujeta a una importante regulación redox, que modifica su capacidad para fosforilar eficazmente a sus dianas celulares. Existe dos cisteínas, una en el dominio SH2 (cys245) y otra en el dominio quinasa (cys487) de la proteína, que, en un ambiente oxidante, tienden a formar un puente disulfuro. Esta modificación incrementa notablemente la capacidad fosforilativa de Src (Wang *et al.*, 2005; Chiarugi, 2008). Recientemente se ha demostrado que el mecanismo responsable del incremento en la proliferación de células HeLa irradiadas con luz láser es, precisamente, la activación de Src mediada por ROS (Zhang *et al.*, 2008). También parece existir un bucle de

retroalimentación mutua entre Src y NOX, que pone de manifiesto la complejidad del fenómeno de señalización mediada por ROS (Catarzi *et al.*, 2005; Gianni *et al.*, 2008).

También se está estudiando la acción directa de las ROS sobre la proteína Rac y su actividad celular. La proteína Rac es una GTPasa que aumenta su actividad intrínseca cuando intercambia GDP por GTP. Se conocen al menos dos mecanismos moleculares por los cuales las ROS son capaces de acelerar la activación de Rac mediante la sustitución de GDP por GTP: la oxidación directa del cofactor GDP unido a la proteína y la activación de la proteína Vav2 por parte de la quinasa Src. El primer mecanismo se ha demostrado tanto en la proteína Ras como en los distintos miembros de la familia de Rho GTPasas (a la que pertenece Rac), y supone la oxidación del cofactor GDP por parte de una molécula de superóxido. El cofactor oxidado abandona su sitio de unión a la GTPasa y es sustituido por un GTP, con la consecuente activación de la proteína (Heo y Campbell, 2005a; Heo y Campbell, 2005b). El segundo mecanismo implica la fosforilación de la proteína Vav2 por la quinasa Src. Esta proteína Vav2 tiene la capacidad de favorecer el intercambio del GDP por GTP en Rac1, lo que provoca su activación (Gianni *et al.*, 2008).

La quinasa Src también está implicada en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, ya que activa a la fosfolipasa C (PLC). La PLC eleva los niveles de inositol trifosfato el cual se une y promueve la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico. Por tanto, la activación de Src lleva asociada un incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Sato *et al.*, 2006; Bradshaw, 2010). Así, un aumento moderado en la concentración de ROs puede elevar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  por un mecanismo directo de oxidación de los canales del retículo, o por un mecanismo indirecto a través de la activación de la quinasa Src.

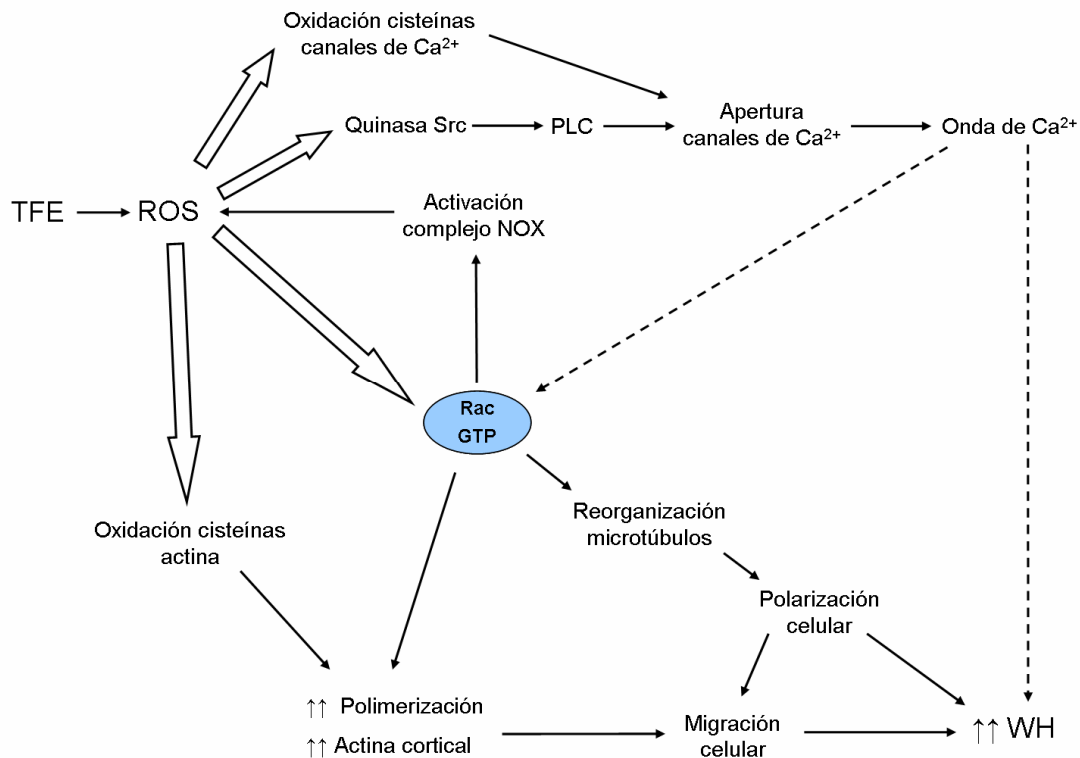
Todos estos mecanismos provocan, en último término, un refuerzo de las señales iniciadas por los RTKs tras su activación por factores de crecimiento. Por lo tanto, la estimulación de la proliferación celular mediada en parte por la modificación oxidativa del ambiente celular sigue siendo

dependiente de los factores de crecimiento presentes en el medio extracelular. El TFE no independizaría a las células del medio externo, sino que las haría más sensibles a las señales de supervivencia y proliferación que proceden de dicho medio. Este nos parece un aspecto esencial del tratamiento, ya que lo que se pretende es que, en un ambiente propenso a la regeneración por la presencia de distintos factores de señalización, se optimice el proceso de WH tras la aplicación de un TFE. Por ello el TFE debería de reforzar la señalización implicada en WH, pero sólo cuando hubiese señales en el medio que indiquen que dicho proceso tiene que tener lugar.

En este sentido también se han observado modificaciones en el citoesqueleto de las células HaCaT sometidas al TFE. Un cambio morfológico es esencial durante el proceso de WH para permitir la migración celular que sostiene la regeneración del tejido (Werner *et al.*, 2007; Gurtner *et al.*, 2008). Tras el TFE se observaron un conjunto de modificaciones en la morfología celular, en los microtúbulos y en el citoesqueleto de actina, que parecían indicar que las células eran receptivas a las señales del medio para iniciar un proceso de WH.

Un modelo para explicar algunos de los mecanismos implicados en los cambios observados tras el TFE se propone en la Figura 45.





**Figura 45:** Esquema propuesto para explicar el mecanismo de modificación del citoesqueleto y de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  tras el TFE en células HaCaT.

A tiempos cortos (minutos) tras la aplicación del TFE se observó un incremento notable de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático y una remodelación del citoesqueleto de actina. Estos cambios se supone que están asociados a la activación de rutas de señalización implicadas en el proceso de migración celular (Alexandrova *et al.*, 2006; Moldovan *et al.*, 2006; Sangrar *et al.*, 2007). De hecho, la formación de lamelipodios y la expansión celular son cambios morfológicos celulares dependientes de la activación de Rac, la cual se debe parcialmente a la presencia de ROS y de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  (Price *et al.*, 2003).

A tiempos más largos (horas) se observó una alteración de los microtúbulos, que adoptaron una distribución polarizada, acompañada de una morfología fusiforme de las células HaCaT. Como ya se ha comentado, esta morfología celular y la disposición de los microtúbulos se suele observar en células epiteliales durante la migración y el proceso de WH (Magdalena *et al.*, 2003; Omelchenko *et al.*, 2003; Onishi *et al.*, 2007). Estas modificaciones de la morfología celular y de los microtúbulos están asociadas a la activación de la

## *Discusión*

proteína Rac, la cual, al mismo tiempo que produce estos cambios morfológicos, también incrementa la actividad de NOX y la producción intracelular de ROS (Wittmann *et al.*, 2003; Wojciak-Stothard *et al.*, 2005; Moldovan *et al.*, 2006). Por lo tanto, parece razonable concluir que la activación de la proteína Rac es un proceso esencial en las rutas de señalización durante el proceso de WH. En este sentido, la modulación de la actividad de Rac mediante fuentes exógenas de ROS, como por ejemplo el TFE, parece una aproximación adecuada para optimizar procesos de regeneración tisular tales como el WH (Ennis *et al.*, 2007; Tschardtke *et al.*, 2007; Sen y Roy, 2008).

## **CONCLUSIONES**



## Conclusiones de la investigación

De los resultados obtenidos en este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Las células HaCaT sintetizan Pp IX cuando son incubadas con MAL entre 0,1 y 1 mM durante un periodo de 5 h. La cantidad de Pp IX sintetizada es suficiente para generar un efecto fotodinámico tras la irradiación con luz roja ( $\lambda = 636 \text{ nm}$ ), incrementando los niveles intracelulares de ROS.
2. La aplicación de un tratamiento fotodinámico moderado (TFE) aumenta la tasa de proliferación celular de las células HaCaT a las 24 h del tratamiento, tal y como han puesto de manifiesto diversas técnicas complementarias de evaluación de la proliferación celular.
3. La aplicación del TFE eleva los niveles intracelulares de ciclina D1 entre las 6 h y las 18 h después del tratamiento, por un mecanismo dependiente del  $^1\text{O}_2$ .
4. El efecto estimulante de la proliferación celular del TFE no se mantiene más allá de las primeras 24 h tras la aplicación del tratamiento. No obstante, es posible aplicar dos tratamientos consecutivos con un intervalo entre ellos mayor de 24 h sin que, aparentemente, se dé un efecto sinérgico entre ambos.
5. La aplicación de un TFE disminuye los efectos negativos de concentraciones cada vez menores de suero sobre la proliferación celular, aunque no independiza a las células de los factores de crecimiento presentes en el suero y necesarios para que se dé dicha proliferación.
6. La acción del TFE sobre la proliferación celular y los niveles de ciclina D1 en las células HaCaT depende parcialmente de la adecuada activación del complejo NOX, y de una forma muy notable del correcto funcionamiento de la ruta de señalización celular de la quinasa Src.

## *Conclusiones*

7. El TFE provoca un incremento transitorio en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  inmediatamente después de la aplicación del tratamiento.
8. Concentraciones diluidas de peróxido de hidrógeno provocan un efecto modulador de la proliferación en células HaCaT muy similar al obtenido tras la aplicación del TFE, a las 24 h de la incubación con el peróxido.
9. La aplicación del TFE en células HaCaT induce modificaciones de los microtúbulos y de los microfilamentos de actina que son similares a las modificaciones observadas en las primeras etapas del proceso de WH.
10. La aplicación del TFE no aumenta el número de células con micronúcleos en comparación con los controles.
11. El TFE incrementa los niveles intracelulares de VEGF por encima del valor control entre las 2 h y las 8 h posteriores al tratamiento.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---





**Bibliografía**

- Adili, F., Scholz, T., Hille, M., Heckenkamp, J., Barth, S., Engert, A. y Schmitz-Rixen, T. Photodynamic therapy mediated induction of accelerated re-endothelialisation following injury to the arterial wall: implications for the prevention of postinterventional restenosis. *Eur. J. Endovasc. Surg.* **24**: 166-175 (2002)
- Alexandova, A.Y., Kopnin, P.B., Vasiliev, J.M. y Kopnin, B.P. ROS up-regulation mediates Ras-induced changes of cell morphology and motility. *Exp. Cell Res.* **312**: 2066-2073 (2006)
- Alexandratou, E., Yova, D. y Loukas, S. A confocal microscopy study of the very early cellular response to oxidative stress induced by zinc phthalocyanine sensitization. *Free Radical Biol. Med.* **39**: 1119-1127 (2005)
- Allen, R.G. y Tresini, M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biol. Med.* **28**(3): 463-499 (2000)
- Allison, R.R., Sibata, C.H., Downie, G.H. y Cuenca, R.E. A clinical review of PDT for cutaneous malignancies. *Photodiag. Photodynamic Ther.* **3**: 214-226 (2006)
- Almeida, R.D., Manadas, B.J., Carvalho, A.P. y Duarte, C.B. Intracellular signalling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **1704**: 59-86 (2004)
- Antunes, F. y Cadenas, E. Estimation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients across biomembranes. *FEBS Lett.* **475**: 121-126 (2000)
- Arbiser, J.L., Petros, J., Klaffer, R., Govindajaran, B., McLaughlin, E.R., Brown, L.F., Cohen, C., Moses, M., Kilroy, S., Arnold, R.S. y Lambeth, J.D. Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **99**(2): 715-720 (2002)
- Bae, G.U., Seo, D.W., Kwon, H.K., Lee, H.Y., Hong, S., Lee, Z.W., Ha, K.S., Lee, H.W. y Han, J.W. Hydrogen peroxide activates p70<sup>S6k</sup> signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **274**(46): 32596-32602 (1999)
- Bartosz, G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? *Biochem. Pharmacol.* **77**: 1303-1315 (2009)

## *Bibliografía*

- Bayraktutan, U. Nitric oxide synthase and NAD(P)H oxidase modulate coronary endothelial cell growth. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **36**: 277-286 (2004)
- Beak, S.M., Lee, Y.S. y Kim, J.A. NADPH oxidase and cyclooxygenase mediate the ultraviolet B-induced generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor- $\kappa$ B in HaCaT human keratinocytes. *Biochim.* **86**: 425-429 (2004)
- Bedard, K. y Krause, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* **87**: 245-313 (2007)
- Bienert, G.P., Schjoerring, J.K. y Jahn, T.P. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**: 994-1003 (2006)
- Bokoch, G.M. y Diebold, B.A. Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood* **100**: 2692-2696 (2002)
- Boonstra, J. y Post, J.A. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* **337**: 1-13 (2004)
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. y Fusenig, N.E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Biol. Chem.* **106**: 761-771 (1988)
- Boukamp, P., Popp, S., Altmeyer, S., Hülsen, A., Fasching, C., Cremer, T. Y Fusenig, N.E. Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT. *Genes Chromosomes & Cancer* **19**: 201-214 (1997)
- Bozkulak, O., Wong, S., Luna, M., Ferrario, A., Rucker, N., Gulsoy, M. y Gomer, C.J. Multiple components of photodynamic therapy can phosphorylate Akt. *Photochem. Photobiol.* **83**: 1029-1033 (2007)
- Bradshaw, J.M. The Src, Syk, and Tec family kinases: Distinct types of molecular switches. *Cell. Signal.* **22**: 1175-1184 (2010)
- Brauchle, M., Funk, J.O., Kind, P. y Werner, S. Ultraviolet B and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **271**(36): 21793-21797 (1996)
- Brown, D.I. y Griending, K.K. Nox in signal transduction. *Free Radical Biol. Med.* **47**:1239-1253 (2009)
- Buetler, T.M., Krauskopf, A. y Ruegg, U.T. Role of superoxide as a signaling molecule. *News Physiol. Sci.* **19**: 120-123 (2004)

- Burch, P.M. y Heintz, N.H. Redox regulation of cell-cycle re-entry: Cyclin D1 as a primary target for the mitogenic effects of reactive oxygen and nitrogen species. *Antioxid. Redox Signal.* **7**: 741-751 (2005)
- Caporossi, D., Ciafrè, S.A., Pittaluga, M., Savini, I. y Farace, M.G. Cellular responses to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and bleomycin-induced oxidative stress in L6C5 rat myoblasts. *Free Radical Biol. Med.* **35**(11): 1355-1364 (2003)
- Catarzi, S., Biagioni, C., Giannoni, E., Favilli, F., Marcucci, T., Iantomasi, T. y Vincenzini, M.T. Redox regulation of platelet-derived-growth-factor-receptor: role of NADPH-oxidase and c-Src tyrosine kinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1745**: 166-175 (2005)
- Chamulitrat, W., Stremmel, W., Kawahara, T., Rokutan, K., Fujii, H., Wingler, K., Schmidt, H.H.W. y Schmidt, R. A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91 $phox$  homologs in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **122**: 1000-1009 (2004)
- Chan, E.C., Jiang, F., Peshavariya, H.M. y Dusting, G.J. Regulation of cell proliferation by NADPH oxidase-mediated signaling: Potential roles in tissue repair, regenerative medicine and tissue engineering. *Pharmacol. Thera.* **122**: 97-108 (2009)
- Chiarugi, P. y Cirri, P. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends Biochem. Sci.* **28**(9): 509-514 (2003)
- Chiarugi, P., Pani, G., Giannoni, E., Taddei, L., Colavitti, R., Raugei, G., Symons, M., Borrello, S., Galeotti, T. y Ramponi, G. Reactive oxygen species as essential mediators of the cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion. *J. Cell Biol.* **161**(5): 933-944 (2003)
- Chiarugi, P. y Fiaschi, T. Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. *Cell. Signal.* **19**: 672-682 (2007)
- Chiarugi, P. Src redox regulation: there is more than meets the eye. *Mol. Cells* **26**: 329-337 (2008)
- Chiarugi, P. From anchorage dependent proliferation to survival: lessons from redox signalling. *Life* **60**(5): 301-307 (2008)

- Cho, S.H., Lee, C.H., Ahn, Y., Kim, H., Kim, H., Ahn, C.Y., Yang, K.S. y Lee, S.R. Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated cell signaling. *FEBS Lett.* **560**: 7-13 (2004)
- Circu, M.L. y Aw, T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biol. Med.* **48**:749-762 (2010)
- Clark, C., Bryden, A., Dawe, R., Moseley, H., Ferguson, J. y Ibbotson, S.H. Topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for cutaneous lesions: outcome and comparison of light sources. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **19**: 134-141 (2003)
- Colavitti, R., Pani, G., Bedogni, B., Anzevino, R., Borrello, S., Waltenberger, J. y Galeotti, T. Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor-2/KDR. *J. Biol. Chem.* **277**(2): 3101-3108 (2002)
- Connor, K.M., Subbaram, S., Regan, K.J., Nelson, K.K., Mazurkiewicz, J.E., Bartholomew, P.J., Aplin, A.E., Tai, Y.T., Aguirre-Ghiso, J., Flores, S.C. y Melendez, J.A. Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulates the angiogenic phenotype via PTEN oxidation. *J. Biol. Chem.* **280**(17): 16916-16924 (2005)
- Conour, J.E., Graham, W.V. y Gaskins, H.R. A combined *in vitro*/bioinformatic investigation of redox regulatory mechanisms governing cell cycle progression. *Physiol. Genomics* **18**: 196-205 (2004)
- Cross, A.R. y Segal, A.W. The NADPH oxidase of professional phagocytes-prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1657**: 1-22 (2004)
- Daghastanli, N.A., Itri, R. y Baptista, M.S. Singlet oxygen reacts with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and contributes to the formation of 2',7'-dichlorofluorescein. *Photochem. Photobiol.* **84**: 1238-1243 (2008)
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Milzani, A., Di Simplicio, P. y Colombo, R. The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radical Biol. Med.* **31**(12): 1624-1632 (2001)
- Davies, K.J. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: A new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life* **48**: 41-47 (1999)

- Denu, J.M. y Dixon, J.E. Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**: 633-641 (1998)
- Denu, J.M. y Tanner, K.G. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochem.* **37**: 5633-5642 (1998)
- DeRosa, M. y Crutchley, R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev.* **233-234**: 351-371 (2002)
- Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**: 47-95 (2001)
- Duval, C., Cantero, A.V., Auge, N., Mabile, L., Thiers, J.C., Negre-Salvayre, A. y Salvayre, R. Proliferation and wound healing of vascular cells trigger the generation of extracellular reactive oxygen species and LDL oxidation. *Free Radical Biol. Med.* **35**(12): 1589-1598 (2003)
- Dypbukt, J.M., Ankarcrona, M., Burkitt, M., Sjöholm, A, Ström, K., Orrenius, S. y Nicotera, P. Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. *J. Biol. Chem.* **269**(48): 30553-30560 (1994)
- Eligini, S., Arenaz, I., Barbieri, S.S., Faleri, M.L., Crisci, M., Tremoli, E. y Colli, S. Cyclooxygenase-2 mediates hydrogen peroxide-induced wound repair in human endothelial cells. *Free Radical Biol. Med.* **46**: 1428-1436 (2009)
- Ennis, W.J., Lee, C. y Meneses, P. A biochemical approach to wound healing through the use of modalities. *Clinics Dermatol.* **25**: 63-72 (2007)
- Fan, C.Y., Katsuyama, M., Nishinaka, T. y Yabe-Nishimura, C. Transactivation of the EGF receptor and a PI3 kinase-ATF-1 pathway is involved in the upregulation of NOX1, a catalytic subunit of NADPH oxidase. *FEBS Lett.* **579**: 1301-1305 (2005)
- Fenech, M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mut. Res.* **455**: 81-95 (2000)
- Fiaschi, T., Cozzi, G., Raugei, G., Formigli, L., Ramponi, G. y Chiarugi, P. Redox regulation of  $\beta$ -actin during integrin-mediated cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **281**(32): 22983-22991 (2006)
- Finkel, T. Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* **476**: 52-54 (2000)

## *Bibliografía*

- Finkel, T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr. Opin Cell Biol.* **15**: 247-254 (2003)
- Fotinos, N., Campo, M.A., Popowycz, F., Gurny, R. y Lange, N. 5-Aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: characteristics, applications and perspectives. *Photochem. Photobiol.* **82**: 994-1015 (2006)
- Fusenig, N.E. y Boukamp, P. Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol. Carcinog.* **23**: 144-158 (1998)
- Gál, P., Mokry, M., Vidinsky, B., Kilik, R., Depta, F., Harakalová, M., Longauer, F., Mozes, S. y Sabo, J. Effect of equal daily doses achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 nm on open skin wound healing in normal and corticosteroid-treated rats. *Lasers Med. Sci.* **24**: 539-547 (2009)
- Gianni, D., Bohl, B., Courtneidge, S.A. y Bokoch, G.M. The involvement of the tyrosine kinase c-Src in the regulation of reactive oxygen species generation mediated by NADPH oxidase-1. *Mol. Biol. Cell* **19**: 2984-2994 (2008)
- Girotti, A.W. Translocation as a means of disseminating lipid hydroperoxide-induced oxidative damage and effector action. *Free Radical Biol. Med.* **44**: 956-968 (2008)
- Gopalakrishna, R. y Jaken, S. Protein kinase C signalling and oxidative stress. *Free Radical Biol. Med.* **28**(9): 1349-1361 (2000)
- Gordillo, G.M. y Sen, C.K. Revisiting the essential role of oxygen in wound healing. *Am. J. Surgery* **186**: 259-263 (2003)
- Gregg, D., Rauscher, F.M. y Goldschmidt-Clermont, P.J. Rac regulates cardiovascular superoxide through diverse molecular interactions: more than a binary GTP switch. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **285**: C723-C734 (2003)
- Groß, S., Knebel, A., Tenev, T., Neininger, A., Gaestel, M., Herrlich, P. y Böhmer, F.D. Inactivation of protein-tyrosine phosphatases as mechanism of UV-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* **274**(37): 26378-26386 (1999)
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y. y Longaker, M.T. Wound repair and regeneration. *Nature* **453**: 314-321 (2008)

- Halkiotis, K., Yova, D. y Pantelias, G. *In vitro* evaluation of the genotoxic and clastogenic potential of photodynamic therapy. *Mutagenesis* **14**(2): 193-198 (1999)
- Hall, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**: 509-514 (1998)
- Halliwell, B. y Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British J. Pharmacol.* **142**: 231-255 (2004)
- Han, M.J., Kim, B.Y., Yoon, S.O. y Chung, A.S. Cell proliferation induced by reactive oxygen species is mediated via mitogen-activated protein kinase in chinese hamster lung fibroblast (V79) cells. *Mol. Cells* **15**(1): 94-101 (2003)
- Han, W. y He, Y.Y. Requirement for metalloproteinase-dependent ERK and AKT activation in UVB-induced G<sub>1</sub>-S cell cycle progression of human keratinocytes. *Photochem. Photobiol.* **85**: 997-1003 (2009)
- Hatz, S., Lambert, J.D.C. y Ogilby, P.R. Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability. *Photochem. Photobiol. Sci.* **6**: 1106-1116 (2007)
- Havens, C.G., Ho, A., Yoshioka, N. y Dowdy, S.F. Regulation of late G<sub>1</sub>/S phase transition and APC<sup>Cdh1</sup> by reactive oxygen species. *Mol. Cell. Biol.* **26**(12): 4701-4711 (2006)
- Haylett, A.K., Ward, T.H. y Moore, J.V. DNA damage and repair in Gorlin syndrome and normal fibroblasts after aminolevulinic acid photodynamic therapy: a comet assay study. *Photochem. Photobiol.* **78**(4): 337-341 (2003)
- He, Y.Y., Huang, J.L. y Chignell, C.F. Delayed and sustained activation of extracellular signal-regulated kinase in human keratinocytes by UVA. *J. Biol. Chem.* **279**(51): 53867-53874 (2004)
- He, Y.Y., Huang, J.L., Block, M.L., Hong, J.S. y Chignell, C.F. Role of phagocyte oxidase in UVA-induced oxidative stress and apoptosis in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **125**: 560-566 (2005)
- He, Y.Y., Council, S.E., Feng, L., Bonini, M.G., Chignell, C.F. Spatial distribution of protein damage by singlet oxygen in keratinocytes. *Photochem. Photobiol.* **84**: 69-74 (2008a)
- He, Y.Y., Council, S.E., Feng, L. y Chignell, C.F. UVA-induced cell cycle progression is mediated by a disintegrin and metalloprotease/epidermal

## Bibliografía

- growth factor receptor/Akt/Cyclin D1 pathways in keratinocytes. *Cancer Res.* **68**: 3752-3758 (2008b)
- Heck, D.E., Gerecke, D.R., Vetrano, A.M. y Laskin, J. Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **195**: 288-297 (2004)
- Heo, J. y Campbell, S.L. Superoxide anion radical modulates the activity of Ras and Ras-related GTPases by a radical-based mechanism similar to that of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **280**(13): 12438-12445 (2005a)
- Heo, J. y Campbell, S.L. Mechanism of redox-mediated guanine nucleotide exchange on redox-active Rho GTPases. *J. Biol. Chem.* **280**(35): 31003-31010 (2005b)
- Hoffman, A. Insulin action mechanism for redox signalling in the cell cycle: its alterations in diabetes. *Free Radical Biol. Med.* **47**: 1093-1097 (2009)
- Hoffmann-Dörr, S., Greinert, R., Volkmer, B. y Epe, B. Visible light (>395 nm) causes micronuclei formation in mammalian cells without generation of cyclobutane pyrimidine dimers. *Mut. Res.* **572**: 142-149 (2005)
- Honoré, S., Kovacic, H., Pichard, V., Briand, C. y Rognoni, J.B.  $\alpha 2\beta 1$ -integrin signalling by itself controls G<sub>1</sub>/S transition in a human adenocarcinoma cell line (Caco-2): implication of NADPH oxidase-dependent production of ROS. *Exp. Cell Res.* **285**: 59-71 (2003)
- Hu, Y.L., Li, S., Miao, H., Tsou, T.C., del Pozo, M.A. y Chien, S. Roles of microtubules dynamics and small GTPase Rac in endothelial cell migration and lamellipodium formation under flow. *J. Vasc. Res.* **39**:465-476 (2002)
- Ibuki, Y. y Goto, R. Antiapoptotic effects induced by different wavelengths of ultraviolet light. *Photochem. Photobiol.* **75**(5): 495-502 (2002)
- Ibuki, Y., Akaike, M., Toyooka, T. y Goto, R. Akt1-mediated intracellular oxidation after UVB irradiation suppresses apoptotic cell death induced by cell detachment and serum starvation. *Photochem. Photobiol.* **84**: 154-161 (2008)
- Iiyama, M., Kakihana, K., Kurosu, T. y Miura, O. Reactive oxygen species generated by hematopoietic cytokines play roles in activation of receptor-mediated signaling and in cell cycle progression. *Cell. Signal.* **18**: 174-182 (2006)



- Ikehata, H. y Ono, T. Significance of CpG methylation for solar UV-induced mutagenesis and carcinogenesis in skin. *Photochem. Photobiol.* **83**: 196-204 (2007)
- Ikehata, H., Kawai, K., Komura, J.I., Sakatsume, K., Wang, L., Imai, M., Higashi, S., Nikaido, O., Yamamoto, K., Hieda, K., Watanabe, S., Kasai, H. y Ono, T. UVA1 genotoxicity is mediated not by oxidative damage but by cyclobutane pyrimidine dimers in normal mouse skin. *J. Invest. Dermatol.* **128**: 2289-2296 (2008)
- Janssen-Heininger, Y.M.W., Mossman, B.T., Heintz, N.H., Forman, H.J., Kalyanaraman, B., Finkel, T., Stamler, J.S., Rhee, S.G. y van der Vliet, A. Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radical Biol. Med.* **45**: 1-17 (2008)
- Ji, Z., Yang, G., Vasovic, V., Cunderlikova, B., Suo, Z., Nesland, J.M. y Peng, Q. Subcellular localization pattern of protoporphyrin IX is an important determinant for its photodynamic efficiency of human carcinoma and normal cell lines. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **84**: 213-220 (2006)
- Jiang, F., Zhang, Z.G., Katakowski, M., Robin, A.M., Faber, M., Zhang, F. y Chopp, M. Angiogenesis induced by photodynamic therapy in normal rat brain. *Photochem. Photobiol.* **79**(6): 494-498 (2004)
- Juarez, J.C., Manuia, M., Burnett, M.E., Betancourt, O., Boivin, B., Shaw, D.E., Tonks, N.K., Mazar, A.P. y Doñate, F. Superoxide dismutase 1 (SOD1) is essential for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidation and inactivation of phosphatases in growth factor signalling. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **105**(20): 7147-7152 (2008)
- Juarranz, A., Jaén, P., Sanz-Rodríguez, F. Cuevas, J. y González, S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin. Translational Oncology* **10**: 148-154 (2008)
- Juzeniene, A., Juzenas, P., Ma L.W., Iani, V. y Moan, J. Effectiveness of different light sources for 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Lasers Med. Sci.* **19**: 139-149 (2004)
- Juzeniene, A., Peng, Q. y Moan, J. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochem. Photobiol. Sci.* **6**: 1234-1245 (2007)

## *Bibliografía*

- Kairuz, E., Upton, Z., Dawson, R.A., y Malda, J. Hyperbaric oxygen stimulates epidermal reconstruction in human skin equivalents. *Wound Rep. Reg.* **15**: 266-274 (2007)
- Kamata, H. y Hirata, H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell. Signal.* **11**(1): 1-14 (1999)
- Kappes, U.P., Luo, D., Potter, M., Schulmeister, K. Y Rüniger, T.M. Short- and long-wave UV light (UVB and UVA) induce similar mutations in human skin cells. *J. Invest. Dermatol.* **126**: 667-675 (2006)
- Karrer, S., Bosserhoff, A.K., Weiderer, P., Landthaler, M. y Szeimies, R.M. Influence of 5-aminolevulinic acid and red light on collagen metabolism of human dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **120**(2): 325-331 (2003)
- Karrer, S., Bosserhoff, A.K., weiderer, P., Landthaler, M. y Szeimies, R.M. Keratinocyte-derived cytokines after photodynamic therapy and their paracrine induction of matrix metalloproteinases in fibroblasts. *Br. J. Dermatol.* **151**: 776-783 (2004)
- Kennedy, J.C., Pottier, R.H. y Pross, D.C. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **6**: 143-148 (1990)
- Kennedy, J.C. y Pottier, R.H. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for the photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **14**: 275-292 (1992)
- Khanna, S., Venojarvi, M., Roy, S., Sharma, N., Trikha, P., Bagchi, D., Bagchi, M. y Sen, C.K. Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. *Free Radical Biol. Med.* **33**(8): 1089-1096 (2002)
- Kim, B.Y., Han, M.J. y Chung, A.S. Effects of reactive oxygen species on proliferation of chinese hamster lung fibroblasts (V79) cells. *Free Radical Biol. Med.* **30**(6): 686-698 (2001)
- Kosmidou, I., Xagorari, A., Roussos, C. y Papapetropoulos, A. Reactive oxygen species stimulate VEGF production from C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> skeletal myotubes through a PI3K/Akt pathway. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **280**: L585-L592 (2001)
- Kourie, J.I. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)* **275**: C1-C24 (1998)

- Kramarenko, G.G., Hummel, S.G., Martin, S.M. y Buettner, G.R. Ascorbate reacts with singlet oxygen to produce hydrogen peroxide. *Photochem. Photobiol.* **82**: 1634-1637 (2006)
- Krammer, B. y Plaetzer, K. ALA and its clinical impact, from bench to bedside. *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**: 283-289 (2008)
- Kumar Singh, D., Kumar, D., Siddiqui, Z., Kumar Basu, S., Kumar, V. y Rao, K.V.S. The strength of receptor signaling is centrally controlled through a cooperative loop between  $Ca^{2+}$  and an oxidant signal. *Cell* **121**: 281-293 (2005)
- Laurent, A., Nicco, C., Chéreau, C., Goulvestre, C., Alexandre, J., Alves, A., Lévy, E., Goldwasser, F., Panis, Y., Soubrane, O., Weill, B. y Batteux, F. Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res.* **65**(3): 948-956 (2005)
- Lavi, R., Shainberg, A., Friedmann, H., Shneyvays, V., Rickover, O., Eichler, M., Kaplan, D. y Lubart, R. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. *J. Biol. Chem.* **278**(42): 40917-40922 (2003)
- Lavoie, J.N., L'Allemain, G., Brunet, A., Müller, R. y Pouyssegur, J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44<sup>MAPK</sup> and negatively by the p38/HOG<sup>MAPK</sup> pathway. *J. Biol. Chem.* **271**(34): 20608-20616 (1996)
- Lee, S.R., Kwon, K.S., Kim, S.R. y Rhee, S.G. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **273**(25): 15366-15372 (1998)
- Lee, K. y Esselman, W.J. Inhibition of PTPs by  $H_2O_2$  regulates the activation of distinct MAPK pathways. *Free Radical Biol. Med.* **33**(8): 1121-1132 (2002)
- Lee, P.J. y Choi, A.M.K. Pathways of cell signaling in hyperoxia. *Free Radical Biol. Med.* **35**(4): 341-350 (2003)
- Li, Z., Hosoi, Y., Cai, K., Tanno, Y., Matsumoto, Y., Enomoto, A., Morita, A., Nakagawa, K. y Miyagawa, K. Src tyrosine kinase inhibitor PP2 suppresses ERK1/2 activation and epidermal growth factor receptor transactivation by X-irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**: 363-368 (2006)
- Liebmann, J., Born, M. y Kolb-Bachofen, V. Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. *J. Invest. Dermatol.* **130**: 259-269 (2010)

## Bibliografía

- Lisby, S., Gniadecki, R. y Wulf, H.C. UV-induced DNA damage in human keratinocytes: Quantitation and correlation with long-term survival. *Exp. Dermatol.* **14**: 349-355 (2005)
- Liu, M., Wikonkal, M. y Brash, D.E. Induction of cyclin-dependent kinase inhibitors and G<sub>1</sub> prolongation by the chemopreventive agent N-acetylcysteine. *Carcinogenesis* **20**(9): 1869-1872 (1999)
- Liu, Y.W., Sakaeda, T., Takara, K., Nakamura, T., Ohmoto, N., Komoto, C., Kobayashi, H., Yagami, T., Okamura, N. y Okumura, K. Effects of reactive oxygen species on cell proliferation and death in HeLa cells and its MDR1-overexpressing derivative cell line. *Biol. Pharm. Bull.* **26**(2): 278-281 (2003)
- Macdonald, I.J. y Dougherty, T.J. Basic principles of photodynamic therapy. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **5**: 105-129 (2001)
- Magdalena, J., Millard, T.H. y Machesky, L.M. Microtubule involvement in NIH 3T3 Golgi and MTOC polarity establishment. *J. Cell Sci.* **116**: 743-756 (2003)
- Mahmoud, B.H., Hexsel, C.L., Hamzavi, I.H. y Lim, H.W. Effects of visible light on the skin. *Photochem. Photobiol.* **84**: 450-462 (2008)
- Martindale, J.L. y Holbrook, N.J. Cellular response to oxidative stress: signalling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* **192**: 1-15 (2002)
- Martínez Muñoz, C., Post, J.A., Verkleij, A.J., Verrips, C.T. y Boonstra, J. The effect of hydrogen peroxide on the cyclin D expression in fibroblasts. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**: 990-996 (2001)
- Matés, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J. y Márquez, J. Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Arch. Toxicol.* **82**: 273-299 (2008)
- Mathews, C.K., van Holde, K.E. y Ahern, K.G. *Biochemistry*, 3<sup>rd</sup> edition. Ed. Heyden, R. Addison Wesley Longman, California, USA (2000)
- Maulik, N. y Das, D.K. Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radical Biol. Med.* **33**(8): 1047-1060 (2002)
- Menon, S.G., Sarsour, E.H., Spitz, D.R., Higashikubo, R., Sturm, M., Zhang, H. y Goswami, P.C. Redox regulation of the G<sub>1</sub> to S phase transition in the mouse embryo fibroblast cell cycle. *Cancer Res.* **63**: 2109-2117 (2003)
- Menon, S.G. y Goswami, P.C. A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. *Oncogene* **26**: 1101-1109 (2007)

- Mildner, M., Weninger, W., Trautinger, F., Ban, J. y Tschachler, E. UVA and UVB radiation differentially regulate vascular endothelial growth factor expression in keratinocyte-derived cell lines and in human keratinocytes. *Photochem. Photobiol.* **70**(4): 674-679 (1999)
- Moldovan, L., Mythreye, K., Goldschmidt-Clermont, P.J. y Satterwhite, L.L. Reactive oxygen species in vascular endothelial cell motility. Roles of NAD(P)H oxidase and Rac1. *Cardiovasc. Res.* **71**:236-246 (2006)
- Morré, D.J. Chemical hormesis in cell growth: a molecular target at the cell surface. *J. Appl. Toxicol.* **20**: 157-163 (2000)
- Mouret, S., Baudouin, C., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J. y Douki, T. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**(37): 13765-13770 (2006)
- Murrell, G.A.C., Francis, M.J.O. y Bromley, L. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem. J.* **265**: 659-665 (1990)
- Nguyen, A., Chen, P. y Cai, H. Role of CaMKII in hydrogen peroxide activation of ERK1/2, p38 MAPK, HSP27 and actin reorganization in endothelial cells. *FEBS Lett.* **572**: 307-313 (2004)
- Nimnual, A.S., Taylor, L.J. y Bar-Sagi, D. Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nature Cell Biol.* **5**: 236-241 (2003)
- O'Donnell, V.B., Tew, D.G., Jones, O.T. y England, P.J. Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem. J.* **290**: 41-49 (1993)
- Omelchenko, T., Vasiliev, J.M., Gelfand, I.M., Feder, H.H. y Bonder, E.M. Rho-dependent formation of epithelial "leader" cells during wound healing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**(19): 10788-10793 (2003)
- Onishi, K., Higuchi, M., Asakura, T., Masuyama, N. y Gotoh, Y. The PI3K-Akt pathway promotes microtubule stabilization in migrating fibroblasts. *Genes to Cells* **12**:535-546 (2007)
- Onumah, O.E., Jules, G.E., Zhao, Y., Zhou, L., Yang, H. y Guo, Z. Overexpression of catalase delays G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- to S-phase transition during cell cycle progression in mouse aortic endothelial cells. *Free Radical Biol. Med.* **46**: 1658-1667 (2009)

## Bibliografía

- Ota, H., Matsumura, M., Miki, N. y Minamitami, H. Photochemically induced increase in endothelial permeability regulated by RhoA activation. *Photochem. Photobiol. Sci.* **8**: 1401-1407 (2009)
- Östman, A. y Böhmer, F.D. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell Biol.* **11**(6): 258-266 (2001)
- Page, K., Li, J., Hodge, J.A., Liu, P.T., Vanden Hoek, T.L., Becker, L.B., Pestell, R.G., Rosner, M.R. y Hershenson, M.B. Characterization of a Rac1 signaling pathway to cyclin D1 expression in airway smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **274**(31): 22065-22071 (1999)
- Parsons, S.J. y Parsons, J.T. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* **23**: 7906-7909 (2004)
- Petrat, F., Pindiur, S., Kirsch, M. y de Groot, H. NAD(P)H, a primary target of  $^1\text{O}_2$  in mitochondria of intact cells. *J. Biol. Chem.* **278**(5): 3298-3307 (2003)
- Petrucci, R.H. y Harwood, W.S. *General Chemistry: principles and modern applications*, 7<sup>th</sup> edition. Prentice Hall, NY, USA (1997)
- Peus, D., Meves, A., Vasa, R.A., Beyerle, A., O'Brien, T. y Pittelkow, M.R.  $\text{H}_2\text{O}_2$  is required for UVB-induced EGF receptor and downstream signalling pathway activation. *Free Radical Biol. Med.* **27**(11/12): 1197-1202 (1999)
- Piccoli, C., D'Aprile, A., Ripoli, M., Scrima, R., Lecce, L., Boffoli, D., Tabilio, A. y Capitanio, N. Bone-marrow derived hematopoietic stem/progenitor cells express multiple isoforms of NADPH oxidase and produce constitutively reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353**: 965-972 (2007)
- Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F. y Kiesslich, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med. Sci.* **24**: 259-268 (2009)
- Pluskalová, M., Pešlová, G., Grebeňová, D., Halada, P. y Hrkal, Z. Photodynamic treatment (ALA-PDT) suppresses the expression of the oncogenic Bcr-Abl kinase and affects the cytoskeleton organization in K562 cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **83**: 205-212 (2006)
- Price, L.S., Langeslag, M., ten Klooster, J.P., Hordijk, P.L., Jalink, K. y Collard, J.G. Calcium signaling regulates translocation and activation of Rac. *J. Biol. Chem.* **278**(41): 39413-39421 (2003)

- Pryor, W.A., Houk, K.N., Foote, C.S., Fukuto, J.M., Ignarro, L.J., Squadrito, G.L. y Davies, K.J.A. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **291**: R491-R511 (2006)
- Ram Na, A., Min Chung, Y., Baek Lee, S., Ho Park, S., Lee, M.S. y Do Yoo, Y. A critical role for Romo1-derived ROS in cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**: 672-678 (2008)
- Ranjan, P., Anathy, V., Burch, P.M., Weirather, K., Lambeth, J.D. y Heintz, N.H. Redox-dependent expression of cyclin D1 and cell proliferation by Nox1 in mouse lung epithelial cells. *Antioxid. Redox Signal.* **8**: 1447-1459 (2006)
- Redmond, R.W. y Kochevar, I.E. Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* **82**: 1178-1186 (2006)
- Rhee, S.G., Kang, S.W., Jeong, W., Chang, T.S., Yang, K.S. y Woo, H.A. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**: 183-189 (2005)
- Rigacci, S., Rovida, E., Sbarba, P.D. y Berti, A. Low  $M_r$  phosphotyrosine protein phosphatase associates and dephosphorylates p125 focal adhesion kinase, interfering with the cell motility and spreading. *J. Biol. Chem.*: **277**(44): 41631-41636 (2002)
- Robertson, C.A., Hawkins, D. y Abrahamse, E.H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **96**: 1-8 (2009)
- Rodríguez, R. y Redman, R. Balancing the generation and elimination of reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**(9): 3175-3176 (2005)
- Roy, S., Khanna, S. y Sen, C.K. Redox regulation of the VEGF signaling path and tissue vascularization: hydrogen peroxide, the common link between physical exercise and cutaneous wound healing. *Free Radical Biol. Med.* **44**: 180-192 (2008)
- Sailer, G., Strauss, W.S.L., Wagner, M., Emmert, H. y Schneckenburger, H. Relation between intracellular location and photodynamic efficacy of aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX *in vitro*. Comparison between human glioblastoma cells and other cancer cell lines. *Photochem. Photobiol. Sci.* **6**: 145-151 (2007)

## Bibliografía

- Salmeen, A., Andersen, J.N., Myers, M.P., Meng, T.C., Hinks, J.A., Tonks, N.K. y Barford, D. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* **423**: 769-773 (2003)
- Salmon, A.B., Richardson, A. y Pérez, V.I. Update on the oxidative stress theory of aging: Does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? *Free Radical Biol. Med.* **48**:642-655 (2010)
- Sangrar, W., Gao, Y., Scott, M., Truesdell, P. y Greer, P.A. Fer-mediated cortactin phosphorylation is associated with efficient fibroblast migration and is dependent on reactive oxygen species generation during integrin-mediated cell adhesion. *Mol. Cell. Biol.* **27**(17): 6140-6152 (2007)
- Sato, K., Ogawa, K., Tokmakov, A.A., Iwasaki, T. y Fukami, Y. Hydrogen peroxide induces Src family tyrosine kinase-dependent activation of *Xenopus* eggs. *Develop. Growth Differ.* **43**: 55-72 (2001)
- Sato, K., Fukami, Y. y Stith, B.J. Signal transduction pathways leading to Ca<sup>2+</sup> release in a vertebrate model system: Lessons from *Xenopus* eggs. *Seminars Cell Develop. Biol.* **17**: 285-292 (2006)
- Sauer, H., Wartenberg, M. y Hescheler, J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell. Physiol. Biochem.* **11**: 173-186 (2001)
- Scaife, R.M. G<sub>2</sub> cell cycle arrest, down-regulation of cyclin B, and induction of mitotic catastrophe by the flavoprotein inhibitor diphenyleneiodonium. *Mol. Cancer Ther.* **3**(10): 1229-1237 (2004)
- Schafer, F.Q. y Buettner, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biol. Med.* **30**(11): 1191-1212 (2001)
- Schweitzer, C. y Schmidt, R. Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chem. Rev.* **103**: 1685-1757 (2003)
- Sen, C.K., Khana, S., Babior, B., Hunt, T.K., Ellison, E.C. y Roy, S. Oxidant-induced vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes and cutaneous wound healing. *J. Biol. Chem.* **277**(36): 33284-33290 (2002)
- Sen, C.K. The general case for redox control of wound healing. *Wound Rep. Reg.* **11**(6): 431-438 (2003)



- Sen, C.K. y Roy, S. Redox signals in wound healing. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**: 1348-1361 (2008)
- Shorrocks, J., Paul, N.D. y McMillan, T.J. The dose rate of UVA treatment influences the cellular response of HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **128**: 685-693 (2008)
- Skovsen, E., Snyder, J.W., Lambert, J.D.C. y Ogilby, P.R. Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell. *J. Phys. Chem. B* **109**: 8570-8573 (2005)
- Smijs, T.G.M., Nivard, M.J.M. y Schuitmaker, H.J. Development of a test system for mutagenicity of photosensitizers using *Drosophila melanogaster*. *Photochem. Photobiol.* **79**(4): 332-338 (2004)
- Spiekstra, S.W., Breetveld, M., Rustemeyer, T., Scheper, R.J. y Gibbs, S. Wound-healing factors secreted by epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts in skin substitutes. *Wound Rep. Reg.* **15**: 708-717 (2007)
- Szaciłowski, K., Macyk, W., Drzewiecka-Matuszek, A., Brindell, M. y Stochel, G. Bioinorganic photochemistry: Frontiers and mechanisms. *Chem. Rev.* **105**: 2647-2694 (2005)
- Takashashi, Y., Ogra, Y. y Suzuki, K.T. Synchronized generation of reactive oxygen species with the cell cycle. *Life Sci.* **75**: 301-311 (2004)
- Takeda, H., Nio, Y., Omori, H., Uegaki, K., Hirahara, N., Sasaki, S., Tamura, K. y Ohtani, H. Mechanisms of cytotoxic effects of heavy water (deuterium oxide: D<sub>2</sub>O) on cancer cells. *Anti-Cancer Drugs* **9**: 715-725 (1998)
- Tatla, S., Woodhead, V., Foreman, J.C. y Chain, B.M. The role of reactive oxygen species in triggering proliferation and IL-2 secretion in T cells. *Free Radical Biol. Med.* **26**(1/2): 14-24 (1999)
- Terada, L.S. Specificity in reactive oxidant signaling: think globally, act locally. *J. Cell Biol.* **174**(5): 615-623 (2006)
- Thannickal, V.J. y Fanburg, B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **279**: L1005-L1028 (2000)
- Theodossiou, T. y MacRobert, A.J. Comparasion of the photodynamic effect of exogenous photoprotoporphyrin and protophorphyrin IX on Pam 212 murine keratinocytes. *Photochem. Photobiol.* **76**(5): 530-537 (2002)
- Tobi, S.E., Paul, N. y McMillan, T.J. Glutathione modulates the level of free radicals produced in UVA-irradiated cells. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* **57**: 102-112 (2000)

## Bibliografía

- Tscharntke, M., Pofahl, R., Chrostek-Grashof, A., Smyth, N., Niessen, C., Niemann, C., Hartwig, B., Herzog, V., Klein, H.W., Krieg, T., Brakebusch, C. y Haase, I. Impaired epidermal wound healing *in vivo* upon inhibition or deletion of Rac1. *J. Cell Sci.* **120**: 1480-1490 (2007)
- Tuby, H., Maltz, L. y Oron, U. Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. *Lasers Surg. Med.* **38**: 682-688 (2006)
- Uehlinger P., Zellweger, M., Wagnières, G., Juillerat-Jeanneret, L., van den Bergh, H. y Lange, N. 5-aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **54**: 72-80 (2000)
- Ushio-Fukai, M. Redox signaling in angiogenesis: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc. Res.* **71**: 226-235 (2006)
- Uzdensky, A., Kolpakova, E., Juzeniene, A., Juzenas, P. y Moan, J. The effect of sub-lethal ALA-PDT on the cytoskeleton and adhesion of cultured human cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1722**: 43-50 (2005)
- Valencia, A. y Kochevar, I.E. Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **128**: 214-222 (2008)
- Villanueva, A., Vidania, R., Stockert, J.C., Cañete, M. y Juarranz, A. Photodynamic effects on cultured tumor cells. Cytoskeleton alterations and cell death mechanisms. *Handbook of Photochemistry and Photobiology* (Vol. 4). Ed. Nalwa, H.S. American Scientific Publishers, California, USA (2003)
- Villanueva, J., Yung, Y., Walker, J.L. y Assoian, R.K. ERK activity and G<sub>1</sub> phase progression: identifying dispensable versus essential activities and primary versus secondary targets. *Mol. Biol. Cell* **18**: 1457-1463 (2007)
- Vinck, E.M., Cagnie, B.J., Cornelissen, M.J., Declercq, H.A. y Cambier, D.C. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med. Sci.* **18**: 95-99 (2003)
- von Monfort, C., Fernau, N.S., Beier, J.I., Sies, H. y Klotz, L.O. Extracellular generation of hydrogen peroxide is responsible for activation of EGF receptor by ultraviolet radiation. *Free Radical Biol. Med.* **41**: 1478-1487 (2006a)

- von Monfort, C., Sharov, V.S., Metzger, S., Schöneich, C., Sies, H. y Klotz, L.O. Singlet oxygen inactivates protein tyrosine phosphatase-1B by oxidation of the active site cysteine. *Biol. Chem.* **387**: 1399-1404 (2006b)
- Wang, Y., Botvinick, E.L., Zhao, Y., Berns, M.W., Usami, S., Tsien, R.Y. y Chien, S. Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature* **434**: 1040-1045 (2005)
- Wartenberg, M., Diederhagen, H., Hescheler, J. y Sauer, H. Growth stimulation versus induction of cell quiescence by hydrogen peroxide in prostate tumor spheroids is encoded by the duration of the Ca<sup>2+</sup> response. *J. Biol. Chem.* **274**(39): 27759-27767 (1999)
- Weishaupt, K.R., Gomer, C.J. y Dougherty, T.J. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. *Cancer Res.* **36**: 2326-2329 (1976)
- Weiss, F.U., Daub, H. y Ullrich, A. Novel mechanisms of RTK signal generation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**: 80-86 (1997)
- Werner, E. GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *J. Cell Sci.* **117**: 143-153 (2004)
- Werner, S., Krieg, T. y Smola, H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J. Invest. Dermatol.* **127**: 998-1008 (2007)
- Winterbourn, C.C. y Hampton, M.B. Thiol chemistry and specificity in redox signalling. *Free Radical Biol. Med.* **45**: 549-561 (2008)
- Wittmann, T., Bokoch, G.M. y Waterman-Storer, C.M. Regulation of leading edge microtubule and actin dynamics downstream of Rac1. *J. Cell Biol.* **161**(5): 845-851 (2003)
- Wojciak-Stothard, B., Yen Fen Tsang, L y Haworth, S.G. Rac and Rho play apposing roles in the regulation of hypoxia/reoxygenation-induced permeability changes in pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **288**: L749-L760 (2005)
- Wolin, M.S. Reactive oxygen species and the control of vascular function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **296**: H539-H549 (2009)
- Wood, Z.A., Poole, L.B. y Karplus, P.A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* **300**: 650-653 (2003)

## Bibliografía

- Xia, C., Meng, Q., Liu, L.Z., Rojanasakul, Y., Wang, X.R. y Jiang, B.H. Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* **67**(22): 10823-10830 (2007)
- Zane, C., Capezzer, R., Sala, R., Venturini, M., y Calzavara-Pinton, P. Clinical and echographic analysis of photodynamic therapy using methylaminolevulinate as sensitizer in the treatment of photodamaged facial skin. *Lasers Surg. Med.* **39**: 203-209 (2007)
- Zhang, X., Jiang, F., Gang Zhang, Z., Kalkanis, S.N., Hong, X., deCarvalho, A.C., Chen, J., Yang, H., Robin, A.M. y Chopp, M. Low-dose photodynamic therapy increases endothelial cell proliferation and VEGF expression in nude mice brain. *Lasers Med. Sci.* **20**: 74-79 (2005)
- Zhang, J., Xing, D. y Gao, X. Low-power laser irradiation activates Src tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediated signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* **217**: 518-528 (2008)
- Zhuang, S. y Kochevar, I.E. Singlet oxygen–induced activation of Akt/protein kinase B is independent of growth factor receptors. *Photochem. Photobiol.* **78**(4): 361-371 (2003)
- Zungu, I.L., Hawkins Evans, D. y Abrahamse, H. Mitochondrial responses of normal and injured human skin fibroblasts following low level laser irradiation- An *in vitro* study. *Photochem. Photobiol.* **85**: 987-996 (2009)