



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA

**LABORATORIO DE CÁNCER Y COMUNICACIÓN
INTERCELULAR**



**"ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS CONEXINAS EN
LA SEÑALIZACIÓN DE CALCIO DURANTE LA TERAPIA
FOTODINÁMICA EN LA LÍNEA CELULAR TUMORAL A549"**

Tesis de Investigación para obtener el grado de:

Licenciada en Biomedicina

Presenta:

Lizeth Sayuri Muñoz Rojas

Director de tesis:

D.C. Fabián Galindo Ramírez

Codirectora de tesis:

D.C. Laura Guadalupe Hernández Aragón

Asesores de tesis:

D.C. Marta Elena Hernández Caballero

D.C. José Everardo Avelino Cruz



H. Puebla de Zaragoza, octubre de 2025.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente al D.C. Fabián Galindo Ramírez, responsable del Laboratorio de Cáncer y Comunicación Intercelular, por haberme recibido en su laboratorio, brindándome la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo con total confianza.

A la D.C. Laura Guadalupe Hernández Aragón, técnica académica del Laboratorio de Cáncer y Comunicación Intercelular, por su constante disposición para ayudar y por acompañar cada paso con una sonrisa que hizo más ligero el camino.

Al M.C. (y próximo D.C.) Ricardo Martínez Zavala, por ser un compañero de laboratorio invaluable, siempre dispuesto a enseñar y a compartir su conocimiento con generosidad.

Al Biol. José Luis Córdova de la Luz, responsable del Laboratorio de Microscopia, por su disposición para colaborar y por mantener siempre una actitud optimista al momento de trabajar.

A mis amigos y futuros colegas: Jahzel, Leo y Hannia, por haber sido parte fundamental de este trayecto. Su amistad, apoyo y todas las risas compartidas me dieron fuerza en los momentos más difíciles, tanto académica como personalmente. Me siento afortunada y profundamente agradecida de haberlos conocido, así como de haber vivido esta etapa con ustedes.

A mi familia, por ser mi pilar emocional a lo largo de este proceso. Gracias por su ayuda, amor incondicional y palabras de aliento en cada paso del camino. En especial, a mis padres, por todo el sacrificio que han hecho para que yo pudiera llegar hasta aquí. Esta meta también es suya. Los quiero mucho.

Y por último, pero no menos importante, a Caleb, mi gato, por ser mi compañero durante las largas horas de estudio y el primer oyente de mis exposiciones. Su compañía silenciosa fue un soporte fundamental que me acompañó hasta el final de este camino.

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
CÁNCER	6
Definición del cáncer	6
Biología del cáncer	6
Clasificación del cáncer	7
Epidemiología del cáncer	8
Causas y factores de riesgo del cáncer.....	10
Diagnóstico y estadificación	11
Tratamientos oncológicos generales	13
Prevención y detección temprana.....	14
ANTECEDENTES GENERALES	14
CÁNCER DE PULMÓN	14
Definición y clasificación del cáncer de pulmón.....	14
Epidemiología del cáncer de pulmón.....	16
Factores de riesgo específicos	18
Mecanismos moleculares involucrados	19
Diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón	19
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	20
CONEXINAS	20
Definición y función de las conexinas	20
Conexinas en cáncer	21
Relación entre conexinas y señalización de calcio	23
Efecto bystander mediado por conexinas	23
CALCIO	25
Papel del calcio en la fisiología celular	25
Importancia del calcio en la señalización celular	27
Relación entre calcio y cáncer	28
Participación del calcio en la apoptosis	29
Participación del calcio en la necrosis	31

TERAPIA FOTODINÁMICA (TFD)	33
Principios de la terapia fotodinámica	33
Fotosensibilizadores y sus mecanismos de acción	35
AICIPc como fotosensibilizador.....	36
Uso de la TFD en cáncer de pulmón	37
Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la TFD y su impacto en la muerte celular	38
Papel de la señalización de calcio en la TFD	39
LÍNEA CELULAR A549	41
Origen y características de la línea celular A549	41
JUSTIFICACIÓN.....	43
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	44
HIPÓTESIS	45
OBJETIVO GENERAL.....	45
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
MATERIAL Y MÉTODOS.....	46
RESULTADOS	51
Determinación de la presencia de conexinas en la línea celular A549 por inmunofluorescencia indirecta.....	51
Análisis de la transmisión de la señal de $(Ca^{2+})_i$ generada por la TFD en condiciones con y sin calcio extracelular	57
Análisis de la participación de las conexinas en la transmisión de la señal de $(Ca^{2+})_i$ generada por la TFD mediante bloqueo farmacológico	61
Determinación del tipo de muerte celular generada por la TFD.....	66
DISCUSIÓN	73
CONCLUSIONES	78
PERSPECTIVAS.....	79
REFERENCIAS	80

ABREVIATURAS

(Ca ²⁺) _i	Calcio intracelular
ABC	Área Bajo la Curva
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFF	Ácido flufenámico
AICIPc	Cloruro de ftalocianina de aluminio
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosín trifosfato
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene</i> ; protooncogén B-Raf
CaSR	<i>Calcium-Sensing Receptor</i> ; receptor sensor de calcio
Ca ²⁺	Ion calcio
CO ₂	Dióxido de carbono
Cx	Conexina
Cx26	Conexina 26
Cx32	Conexina 32
Cx43	Conexina 43
Cx46	Conexina 46
Cy5	<i>Cyanine 5</i> ; canal de detección fluorescente
DAKO	Marca comercial de medio de montaje
DAMPs	Danger-Associated Molecular Patterns; patrones moleculares asociados a daño
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol (tinción nuclear fluorescente)
DMEM/F-12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12</i> ; medio nutritivo de cultivo celular
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> ; dimetilsulfóxido
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> ; factor de crecimiento epidérmico
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> ; receptor del factor de crecimiento epidérmico
EL1	Asa extracelular 1 (de conexinas)
EL2	Asa extracelular 2 (de conexinas)
ERK1/2	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 y 2</i> ; quinasas reguladas por señales extracelulares
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> ; fluoresceína isotiocianato (canal de detección fluorescente)

Fluo4 FF AM	Indicador fluorescente de calcio intracelular
g/mol	Gramos por mol
GPX4	<i>Glutathione Peroxidase 4</i> ; glutatión peroxidasa 4
GSH	Glutatión reducido
HCL	Ácido clorhídrico
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetano-sulfónico
HIF-1 α	<i>Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha</i> ; factor inducible por hipoxia 1-alfa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
IP	Yoduro de Propidio
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
IP ₃ R	Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato
kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase; quinasa de proteínas activada por mitógenos
MCU	Mitochondrial Calcium Uniporter; uniportador mitocondrial de calcio
MET	Proto-oncogén MET (<i>Mesenchymal-Epithelial Transition</i>)
mg	Miligramos
microARNs	MicroARNs (pequeños ARN reguladores)
MLKL	<i>Mixed Lineage Kinase Domain-Like protein</i> ; proteína similar a quinasa de linaje mixto
mm	Milímetros
mOsm/kg	Miliosmoles por kilogramo
mPTP	<i>Mitochondrial Permeability Transition Pore</i> ; poro de transición de permeabilidad mitocondrial
N=	Número de muestras por grupo
n \approx	Tamaño muestral aproximado
NAD+	Nicotinamida adenina dinucleótido
NaOH	Hidróxido de sodio
NF-K β	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of Activated B cells</i> ; factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa en células B activadas
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i> ; factor nuclear de células T activadas
nm	Nanómetro
NSCLC	<i>Non-Small Cell Lung Cancer</i> ; cáncer de pulmón de células no pequeñas

O ₂ • ⁻	Anión superóxido
³ O ₂	Oxígeno molecular en estado triplete
¹ O ₂	Oxígeno singlete
OH•	Radical hidroxilo
ORAI1	Canal de entrada de calcio regulado por depósito
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> ; solución salina amortiguada con fosfatos
PFA	Paraformaldehído
pH	Potencial de hidrógeno
PMCA	<i>Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase</i> ; ATPasa de calcio en membrana plasmática
PS	Fotosensibilizador
PSEs	Estado singlete excitado
PSEt	Estado triplete excitado
RE	Retículo endoplasmático
RIP1	<i>Receptor-Interacting Protein 1</i> ; proteína 1 que interactúa con el receptor
RIP3	<i>Receptor-Interacting Protein 3</i> ; proteína 3 que interactúa con el receptor
RIPK1	<i>Receptor-Interacting Protein Kinase 1</i> ; quinasa 1 que interactúa con el receptor
RIPK3	<i>Receptor-Interacting Protein Kinase 3</i> ; quinasa 3 que interactúa con el receptor
RM	Resonancia magnética
ROI	Regi[on de interés
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> ; especies reactivas de oxígeno
RyR	<i>Ryanodine Receptor</i> ; receptor de rianodina
SCLC	<i>Small Cell Lung Cancer</i> ; cáncer de pulmón de células pequeñas
SD	Desviación estándar (<i>Standard Deviation</i>)
SERCA	<i>Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase</i> ; ATPasa de calcio del retículo sarcoendoplásmico
SFB	Suero fetal bovino
Sistema TNM	Clasificación de Tumor, Nódulo y Metástasis
SOCE	<i>Store-Operated Calcium Entry</i> ; entrada de calcio operada por depósitos
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i> ; transductor de señal y activador de la transcripción 3
STIM1	Sensor de calcio en retículo endoplásmico
TC	Tomografía computarizada

TEP	Tomografía por emisión de positrones
TFD	Terapia fotodinámica
TP53	<i>Tumor Protein p53</i> ; proteína supresora de tumor p53
VGCCs	<i>Voltage-Gated Calcium Channels</i> ; canales de calcio activados por voltaje
VPH	Virus del papiloma humano
$\Delta F/F_0$	Cambio relativo de fluorescencia respecto a la fluorescencia basal
λ	Longitud de onda
μM	Micromolar

RESUMEN

La terapia fotodinámica (TFD) es una estrategia antitumoral basada en la activación de un fotosensibilizador por medio de luz, lo que genera especies reactivas de oxígeno (ROS) capaces de inducir muerte celular (Allison & Moghissi, 2013). Sin embargo, los mecanismos moleculares asociados a la respuesta celular a la TFD continúan en estudio, especialmente en relación con su capacidad para inducir señales de calcio intracelular y promover muerte celular programada. En este trabajo se analizó la señalización de calcio inducida por la TFD en la línea celular de adenocarcinoma pulmonar humano A549, así como el papel de las conexinas en su propagación y la posible implicación de necroptosis como tipo de muerte celular.

La señal de calcio intracelular (Ca^{2+}_i) fue evaluada mediante microscopía confocal utilizando el indicador fluorescente Fluo-4, observándose una señal dependiente de la presencia de calcio extracelular. La célula fotoestimulada mostró una respuesta inicial que posteriormente se propagó hacia células vecinas, lo cual fue interpretado como un mecanismo de comunicación intercelular. Esta propagación fue inhibida mediante el uso de ácido flufenámico (AFF), un bloqueador de conexinas, y se restableció parcialmente tras el lavado del fármaco, lo que sugiere que la señal es transmitida a través de uniones tipo gap formadas por conexinas, particularmente Cx43. Estos hallazgos coinciden con estudios previos donde se ha señalado la participación de conexinas en la amplificación del efecto bystander mediado por Ca^{2+} (Hoorelbeke, Decrock, Van Haver, De Bock, & Leybaert, 2018).

Adicionalmente, se evaluó el tipo de muerte celular inducido por la TFD mediante tinción con Anexina V-FITC y Yoduro de Propidio. Se observó una señal exclusiva de IP+, lo cual permitió descartar apoptosis clásica y sugirió una pérdida temprana de integridad de membrana. En este contexto, se propuso que la TFD induce necroptosis, una forma de muerte celular regulada, lítica e independiente de caspasas, que puede activarse por estrés oxidativo, como el generado por la TFD (de Souza, Mencialha, Fonseca, & de Paoli, 2024). La hipótesis de necroptosis es respaldada por estudios en modelos tumorales tratados con TFD donde se ha observado la fosforilación de MLKL y la ausencia de caspasa-3 activa (Chilakamarthi, Singu, & Giribabu, 2022).

En conjunto, los resultados sugieren que la TFD en A549 induce una señal de (Ca^{2+})_i dependiente tanto de calcio extracelular como de la comunicación intercelular mediada por conexinas, y que esta señal contribuye a desencadenar una posible necroptosis como mecanismo de muerte celular. Estos hallazgos aportan evidencia sobre la dinámica de la señal de calcio en la TFD y abren nuevas posibilidades para mejorar su eficacia terapéutica en el tratamiento del cáncer de pulmón.

Palabras clave: Terapia fotodinámica, señal de calcio, conexinas, necroptosis, A549, cáncer de pulmón.

INTRODUCCIÓN

CÁNCER

Definición del cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de células anormales, las cuales pueden invadir tejidos cercanos y diseminarse a otras partes del cuerpo a través de la sangre y el sistema linfático (Instituto Nacional del Cáncer). Este proceso inicia cuando alteraciones genéticas provocan que las células pierdan los mecanismos normales de regulación de su ciclo celular, permitiéndoles dividirse sin control y evadir la muerte celular programada (Organización Mundial de la Salud).

Las células cancerosas presentan características distintivas que las diferencian de las células normales; entre estas se encuentran la capacidad de proliferación continua, la evasión de la apoptosis, la invasión de tejidos y la formación de metástasis, así como la inducción de angiogénesis para el suministro de nutrientes (Cancer Research UK). Además, pueden modificar su entorno y evadir la respuesta inmune del organismo, lo que favorece su supervivencia y expansión (Sociedad Americana Contra El Cáncer).

El cáncer puede originarse en casi cualquier tejido del cuerpo y manifestarse en múltiples formas, dependiendo de su localización y características moleculares; su impacto en la salud global lo convierte en una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, lo que resalta la importancia de su estudio y tratamiento (Instituto Nacional del Cáncer).

Biología del cáncer

El cáncer es el resultado de una serie de alteraciones celulares y moleculares que convierten células normales en malignas, permitiéndoles proliferar sin control y evadir los mecanismos de regulación del organismo (Instituto Nacional del Cáncer). Estas alteraciones conducen a cambios en la funcionalidad celular que favorecen el desarrollo tumoral, incluyendo la transformación maligna, la evasión de la apoptosis, la angiogénesis y la metástasis (Piña-Sánchez, et al., 2021).

La transformación maligna ocurre cuando una célula normal adquiere mutaciones que afectan genes involucrados en la regulación del ciclo celular, la reparación del ADN y la muerte celular programada; estas mutaciones pueden alterar la expresión de protooncogenes, genes supresores de tumores y genes de estabilidad genética, lo que permite a las células proliferar sin control y acumular nuevas alteraciones que favorecen su progresión tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011).

Uno de los mecanismos más importantes en la regulación celular es la apoptosis, un proceso de muerte celular programada que elimina células dañadas o innecesarias; en el cáncer, las células malignas desarrollan estrategias para evadir la apoptosis mediante la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas, lo que les permite sobrevivir más allá de su ciclo celular normal y continuar su proliferación descontrolada (Instituto Nacional del

Cáncer, 2023). Además, algunas mutaciones pueden inactivar genes proapoptóticos, evitando así que la célula active su mecanismo de autodestrucción ante daños irreparables en su ADN (National Human Genome Research Institute, 2023).

Para sostener su crecimiento acelerado, los tumores inducen la angiogénesis, un proceso mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de los existentes; a través de la secreción de factores angiogénicos, las células tumorales promueven la formación de una red vascular que les proporciona oxígeno y nutrientes, facilitando su expansión y supervivencia (Instituto Nacional del Cáncer, 2023). Sin esta capacidad, el tamaño del tumor estaría limitado por la disponibilidad de recursos en su microambiente, restringiendo su crecimiento y progresión (Instituto Nacional del Cáncer, 2023).

A medida que el cáncer avanza, las células malignas pueden adquirir la capacidad de diseminarse a otros tejidos a través de la metástasis, un proceso en el que las células tumorales invaden estructuras cercanas, ingresan al torrente sanguíneo o linfático y colonizan órganos distantes; la metástasis es una de las principales causas de mortalidad en pacientes con cáncer, ya que compromete la función de órganos vitales y dificulta el tratamiento de la enfermedad (Instituto Nacional del Cáncer, 2023).

Estos mecanismos interrelacionados permiten que las células cancerosas proliferen, evadan la muerte celular, generen su propio suministro sanguíneo y se diseminen a otros tejidos, lo que contribuye a la progresión de la enfermedad y a su resistencia a los tratamientos convencionales (Instituto Nacional del Cáncer).

Clasificación del cáncer

Desde el punto de vista histológico, el cáncer se puede clasificar por su origen en: Carcinomas, sarcomas y linfomas (Instituto Nacional del Cáncer).

Los carcinomas son los más frecuentes y se originan en células epiteliales que recubren superficies internas y externas del cuerpo; estos se subdividen en adenocarcinomas, que afectan células productoras de moco en órganos como el colon, el páncreas y los pulmones, y carcinomas de células escamosas, que se desarrollan en epitelios planos de la piel y mucosas como la boca y el esófago (Cancer Research UK, 2023).

Otro tipo importante es el sarcoma, que se desarrolla en los tejidos conectivos como huesos, músculos, cartílagos y vasos sanguíneos; ejemplos representativos incluyen el osteosarcoma, que afecta los huesos, y el liposarcoma, que se origina en células del tejido adiposo (SEER Training Modules, 2023). En contraste con los tumores sólidos, la leucemia es un tipo de cáncer que se origina en la médula ósea, afectando la producción normal de células sanguíneas y liberando glóbulos blancos anormales al torrente sanguíneo, lo que interfiere con la función inmune y la oxigenación del organismo (Carbone, 2020).

Los linfomas son cánceres que afectan el sistema linfático y se dividen en dos tipos principales; el linfoma de Hodgkin se caracteriza por la presencia de células de Reed-Sternberg, mientras que el linfoma no Hodgkin abarca una variedad de subtipos con

características clínicas diversas (Cancer Research UK, 2023). Otro tipo de cáncer hematológico es el mieloma múltiple, el cual se desarrolla en las células plasmáticas de la médula ósea, afectando la producción normal de anticuerpos y debilitando el sistema inmunológico (SEER Training Modules, 2023).

Además de la clasificación histológica, como se mencionó anteriormente, los cánceres también se agrupan según su sitio primario, es decir, el órgano donde se originan. Algunos de los más comunes incluyen el cáncer de mama, que afecta el tejido mamario; el cáncer de pulmón, que se origina en los tejidos respiratorios y está altamente asociado con el tabaquismo; el cáncer colorrectal, que se desarrolla en el colon o el recto; y el cáncer de próstata, que afecta la glándula prostática en los hombres (Instituto Nacional del Cáncer).

Para evaluar la progresión de la enfermedad se utilizan los sistemas de estadificación y grado tumoral: La estadificación permite determinar la extensión del cáncer en el cuerpo y se basa en parámetros como el tamaño del tumor, la afectación de ganglios linfáticos y la presencia de metástasis; por otro lado, el grado del tumor describe el grado de diferenciación celular y la velocidad de crecimiento del tumor, información crucial para establecer el pronóstico y definir el tratamiento más adecuado (SEER Training Modules, 2023).

Epidemiología del cáncer

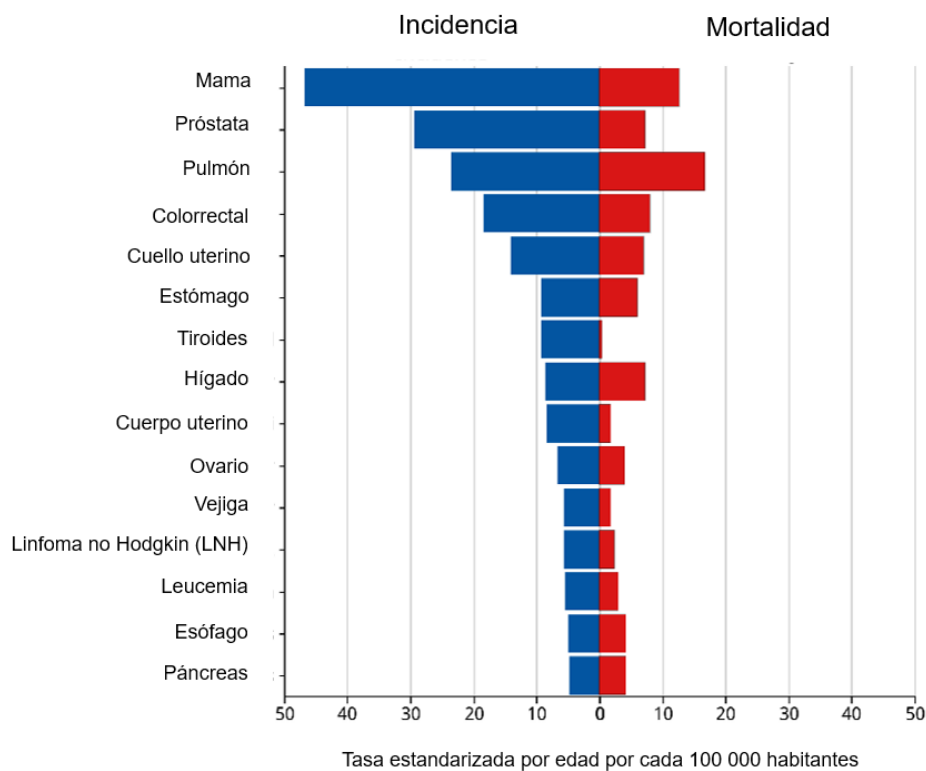


Figura 1. Los 15 principales sitios de cáncer a nivel mundial (Incidencia y Mortalidad, Ambos sexos). Imagen tomada y modificada, fuente: (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, 2025).

El cáncer representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial, con casi 10 millones de defunciones en 2020 (Fig. 1); este panorama epidemiológico resalta la importancia de estrategias de prevención y detección temprana, así como la necesidad de mejorar el acceso a tratamientos efectivos en diferentes regiones del mundo (Organización Mundial de la Salud).

Se estima que en 2022 hubo 20 millones de nuevos casos de cáncer y 9,7 millones de muertes relacionadas con la enfermedad a nivel global; además, se proyecta que para 2040 la incidencia anual de nuevos casos aumente a casi 30 millones y las muertes por cáncer alcancen los 15,3 millones, lo que subraya el impacto creciente de esta patología en la salud pública mundial (Instituto Nacional del Cáncer, 2023).

Epidemiología del cáncer en México

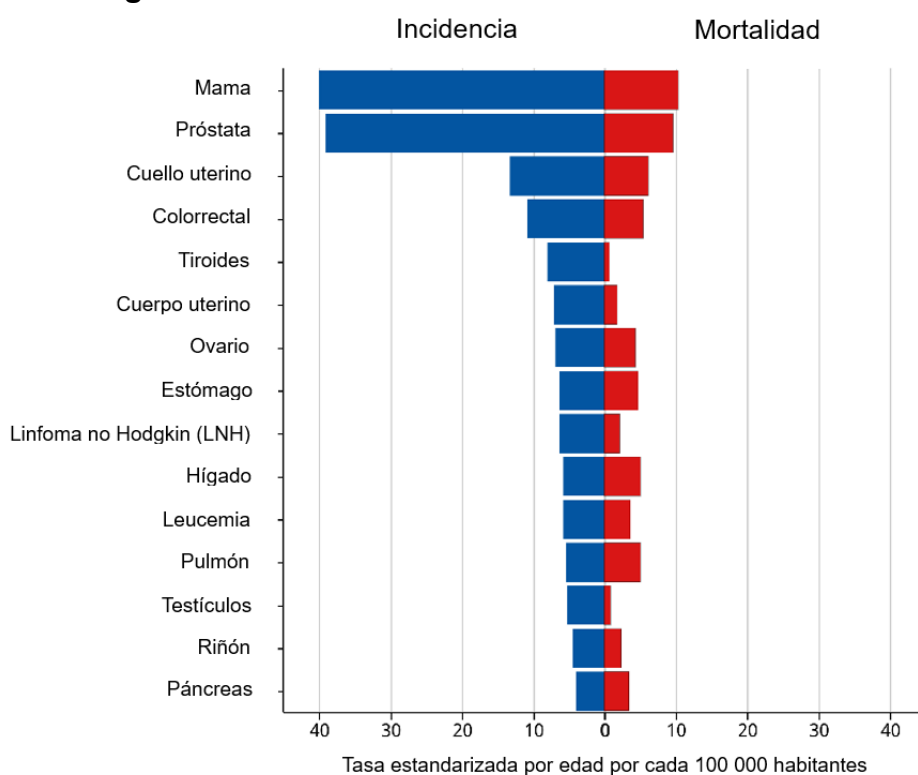


Figura 2. Los 15 principales sitios de cáncer en México (Incidencia y Mortalidad, Ambos sexos). Imagen tomada y modificada, fuente: (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, 2025).

El cáncer es una de las principales causas de muerte en México, representando el 10.6% del total de defunciones registradas en 2022; durante ese año, se reportaron 89,574 fallecimientos por tumores malignos, lo que equivale a una tasa de 68.92 defunciones por cada 100,000 habitantes (Fig.2); en la última década, esta tasa ha mostrado un incremento progresivo, reflejando la creciente carga de la enfermedad en el país (Instituto Nacional de Estadística y Geografía , 2024).

La incidencia del cáncer en México sigue una tendencia ascendente; en 2020, se estimaron alrededor de 190,000 nuevos casos de esta enfermedad, lo que la posiciona

como la tercera causa de muerte a nivel nacional; además, la mortalidad varía según el sexo y el tipo de cáncer, con una mayor prevalencia de neoplasias de mama, cérvix y pulmón en mujeres, mientras que en hombres predominan las de próstata, pulmón, estómago y colorrectal (Brau-Figueroa, Palafox-Parrilla, & Mohar-Betancourt, 2020).

En 2023, la mortalidad por cáncer en México mostró importantes variaciones regionales; las entidades con las tasas más altas de defunciones por tumores malignos por cada 100 000 habitantes fueron Chihuahua (86.3), Baja California Sur (86.2) y Sonora, en contraste, las tasas más bajas se registraron en Guerrero (51.1), Tlaxcala (62.2) y Oaxaca (62.9) (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2025).

El análisis de la mortalidad por cáncer en México ha mostrado que, entre 1990 y 2012, la tasa de defunciones por esta enfermedad aumentó de manera constante; este incremento se ha atribuido a factores como el envejecimiento poblacional, el aumento en la exposición a factores de riesgo y la mejora en los sistemas de registro y diagnóstico; sin embargo, en los últimos años, algunos tipos de cáncer, como el de pulmón y el cervicouterino, han mostrado una reducción en sus tasas de mortalidad, posiblemente debido a campañas de prevención y mejoras en los tratamientos disponibles (Reynoso-Noverón, Torres-Domínguez, Morales-Juárez, & Mohar-Betancourt, 2023).

Causas y factores de riesgo del cáncer

El desarrollo del cáncer es el resultado de la interacción entre factores genéticos, ambientales y relacionados con el estilo de vida; aunque algunas personas presentan una predisposición hereditaria, la mayoría de los casos de cáncer se originan a partir de exposiciones a agentes carcinógenos o hábitos poco saludables a lo largo del tiempo (Instituto Nacional del Cáncer, 2023).

Los factores genéticos juegan un papel importante en la susceptibilidad al cáncer: Algunas mutaciones heredadas pueden predisponer a ciertos tipos de cáncer, como las alteraciones en los genes BRCA1 y BRCA2, que incrementan el riesgo de cáncer de mama y ovario; sin embargo, estos casos representan un porcentaje reducido en comparación con los cánceres esporádicos, que se desarrollan debido a mutaciones adquiridas a lo largo de la vida (Organización Mundial de la Salud).

Además de la predisposición genética, la exposición a factores ambientales es una de las principales causas de cáncer: La contaminación del aire, el contacto con sustancias químicas como el asbesto y el benceno, y la exposición prolongada a radiación ultravioleta o ionizante han sido ampliamente relacionadas con el desarrollo de distintos tipos de tumores; estos agentes pueden inducir daños en el ADN de las células, lo que favorece la acumulación de mutaciones que llevan a la transformación maligna (Thun, Linet, Cerhan, Haiman, & Schottenfeld, 2017).

El estilo de vida también desempeña un papel crucial en la incidencia del cáncer: Uno de los factores de riesgo más relevantes es el consumo de tabaco, responsable de un gran porcentaje de los casos de cáncer de pulmón, boca, esófago, laringe y vejiga; la exposición al humo de segunda mano también ha demostrado aumentar el riesgo en

personas no fumadoras; por otro lado, el consumo excesivo de alcohol se ha asociado con el desarrollo de cánceres de hígado, boca, faringe, esófago y mama; estos efectos se ven potenciados cuando el alcohol y el tabaco se combinan, incrementando significativamente la carcinogenicidad de ambos (Stanford Health Care, 2023).

Asimismo, la alimentación y la actividad física influyen en el riesgo de desarrollar cáncer: Una dieta escasa en frutas y verduras, alta en grasas saturadas y carnes procesadas, junto con el sedentarismo, favorece el sobrepeso y la obesidad, condiciones que han sido relacionadas con un mayor riesgo de cáncer de colon, mama, endometrio y riñón; de igual manera, la falta de actividad física contribuye al desarrollo de un entorno metabólicamente favorable para la proliferación celular descontrolada (Organización Mundial de la Salud).

Otro factor que considerar es la relación entre infecciones y cáncer: Algunas infecciones virales, bacterianas y parasitarias pueden aumentar el riesgo de desarrollar ciertos tipos de tumores; el virus del papiloma humano (VPH) está fuertemente relacionado con el cáncer cervicouterino, mientras que las infecciones crónicas por *Helicobacter pylori* aumentan la probabilidad de desarrollar cáncer gástrico; de igual manera, los virus de la hepatitis B y C son factores de riesgo bien establecidos para el carcinoma hepatocelular, debido a su efecto inflamatorio crónico sobre el hígado (Instituto Nacional del Cáncer, 2023).

Finalmente, la edad es un factor de riesgo determinante: La mayoría de los casos de cáncer ocurren en personas mayores de 60 años, ya que con el envejecimiento se acumulan mutaciones en el ADN y se reducen los mecanismos de reparación celular; este fenómeno explica por qué la incidencia de cáncer es significativamente mayor en la población adulta mayor en comparación con individuos más jóvenes (Thun, Linet, Cerhan, Haiman, & Schottenfeld, 2017).

Diagnóstico y estadificación

El diagnóstico del cáncer es un proceso esencial para confirmar la presencia de células malignas y determinar la extensión de la enfermedad en el organismo; este proceso involucra diversas pruebas que permiten evaluar la localización del tumor, su tipo histológico y la posible diseminación a otros tejidos; una vez establecido el diagnóstico, es fundamental estadificar el cáncer, ya que la clasificación del tumor en diferentes etapas ayuda a definir el tratamiento más adecuado y a predecir la evolución del paciente (Instituto Nacional del Cáncer, 2023).

El primer paso en la detección del cáncer suele ser una evaluación clínica, en la que el médico realiza un examen físico buscando anomalías como masas palpables, cambios en la piel o inflamación de ganglios linfáticos; sin embargo, debido a la heterogeneidad del cáncer, es necesario complementar esta evaluación con estudios más específicos; entre las pruebas iniciales más utilizadas se encuentran los análisis de laboratorio, los cuales pueden detectar alteraciones en la sangre, como la presencia de marcadores tumorales, que son proteínas producidas en exceso por algunas células cancerosas;

aunque estos marcadores no son diagnósticos por sí mismos, pueden proporcionar pistas sobre la actividad tumoral y la respuesta al tratamiento en ciertos tipos de cáncer (Instituto Nacional del Cáncer, 2023).

Para obtener una visualización más detallada de la lesión, se emplean diversas técnicas de imagenología, las cuales permiten localizar y medir el tamaño del tumor: La radiografía es uno de los métodos más accesibles y se usa comúnmente para detectar anomalías en estructuras óseas o en los pulmones; la tomografía computarizada (TC) ofrece imágenes transversales del cuerpo, proporcionando mayor precisión en la evaluación del tumor y su relación con estructuras cercanas; por su parte, la resonancia magnética (RM) es especialmente útil para el estudio de tejidos blandos, mientras que la tomografía por emisión de positrones (TEP) permite evaluar la actividad metabólica de las células cancerosas, facilitando la detección de metástasis en órganos distantes (Sociedad Americana contra el Cáncer, 2025).

El diagnóstico definitivo del cáncer se obtiene mediante una biopsia, procedimiento en el que se extrae una muestra de tejido sospechoso para su análisis microscópico; dependiendo de la ubicación del tumor, se pueden utilizar distintos tipos de biopsias, como la aspiración con aguja fina (PAAF), que permite obtener células individuales para su análisis, o la biopsia por aguja gruesa, que extrae fragmentos de tejido con más información estructural; en algunos casos se requiere una biopsia quirúrgica, en la que se extirpa parcial o totalmente la lesión para su estudio, este procedimiento es crucial para determinar la naturaleza maligna del tejido, su grado de diferenciación y la presencia de marcadores moleculares que pueden influir en la selección del tratamiento (Instituto Nacional del Cáncer, 2023).

Una vez confirmado el cáncer, el siguiente paso es la estadificación, proceso mediante el cual se determina la extensión de la enfermedad; el sistema de clasificación más utilizado es el sistema TNM, el cual evalúa tres parámetros fundamentales: La T hace referencia al tamaño del tumor primario y su invasión en tejidos circundantes, clasificándose desde T0, cuando no hay evidencia de tumor, hasta T4, cuando el tumor es de gran tamaño y ha invadido estructuras vecinas; la N indica la afectación de los ganglios linfáticos regionales, desde N0, sin compromiso ganglionar, hasta N3, cuando los ganglios más distantes presentan células cancerosas; finalmente, la M determina la presencia de metástasis a distancia, clasificándose como M0 cuando no hay evidencia de diseminación y M1 cuando existen metástasis en otros órganos (Instituto Nacional del Cáncer, 2023).

La combinación de estos tres criterios permite agrupar los cánceres en distintos estadios clínicos, que van desde el estadio I, caracterizado por tumores pequeños y localizados, hasta el estadio IV, en el que el cáncer se ha diseminado a otros órganos; la correcta estadificación del cáncer es clave para establecer estrategias terapéuticas adecuadas, ya que los tratamientos varían según el grado de diseminación de la enfermedad; mientras que los tumores en estadios tempranos pueden ser tratados con cirugía o

radioterapia, los cánceres avanzados suelen requerir terapias sistémicas como la quimioterapia o la inmunoterapia (Sociedad Americana contra el Cáncer, 2025).

Tratamientos oncológicos generales

El tratamiento del cáncer ha avanzado significativamente en las últimas décadas, desarrollando estrategias terapéuticas que buscan eliminar las células malignas o frenar su proliferación, dependiendo del tipo y estadio del tumor. Las principales modalidades incluyen la cirugía, la quimioterapia, la radioterapia, las terapias dirigidas y la inmunoterapia; la combinación de estos tratamientos ha permitido mejorar la tasa de supervivencia y reducir el impacto de la enfermedad en los pacientes (Instituto Nacional del Cáncer, 2023).

La cirugía ha sido utilizada históricamente como el tratamiento principal en tumores sólidos localizados, permitiendo la resección completa de la masa tumoral junto con un margen de tejido sano para minimizar el riesgo de recurrencia; este procedimiento puede ser curativo en etapas tempranas o desempeñar un papel paliativo en casos avanzados, aliviando síntomas derivados del crecimiento tumoral (Stanford Health Care, 2024).

A diferencia de la cirugía, la quimioterapia actúa de manera sistémica mediante la administración de fármacos citotóxicos que interfieren con la proliferación celular; estos agentes pueden actuar dañando el ADN, inhibiendo la síntesis de nucleótidos o bloqueando la división celular; si bien la quimioterapia ha demostrado ser altamente efectiva en tumores avanzados o metastásicos, su falta de especificidad también afecta a células normales, provocando efectos adversos (Instituto Nacional del Cáncer, 2023).

La radioterapia es otra estrategia fundamental en el manejo del cáncer y puede utilizarse como tratamiento principal o en combinación con cirugía y quimioterapia; este enfoque emplea radiación ionizante para inducir daño en el ADN de las células malignas, lo que impide su replicación y provoca su muerte celular; aunque la radiación se dirige específicamente a la zona tumoral, las células sanas circundantes también pueden verse afectadas, causando efectos adversos como inflamación, fibrosis o disfunción en los órganos irradiados (Instituto Nacional del Cáncer, 2023).

Los avances en la oncología han permitido el desarrollo de terapias dirigidas, diseñadas para inhibir específicamente las vías de señalización que promueven el crecimiento tumoral; a diferencia de la quimioterapia convencional, que afecta a todas las células en proliferación, estos tratamientos se centran en alteraciones moleculares presentes en las células malignas, lo que reduce el daño a los tejidos normales; si bien estas terapias han mostrado gran eficacia en distintos tipos de cáncer, la aparición de mutaciones en las células tumorales puede generar resistencia, limitando su efectividad a largo plazo (Instituto Nacional del Cáncer, 2023).

La inmunoterapia ha revolucionado el tratamiento del cáncer al aprovechar la capacidad del sistema inmunológico para reconocer y destruir células tumorales; no obstante, la inmunoterapia no está exenta de efectos adversos, ya que puede inducir respuestas

autoinmunes que afectan órganos sanos, además de que requieren un monitoreo cuidadoso (Instituto Nacional del Cáncer, 2023).

Prevención y detección temprana

La prevención primaria busca minimizar la exposición a factores de riesgo modificables: El consumo de tabaco es la principal causa prevenible de cáncer, siendo responsable de una proporción significativa de casos de cáncer de pulmón, esófago, vejiga y otros tipos tumorales; las políticas de control del tabaco, como el aumento de impuestos, la restricción de publicidad y la prohibición de fumar en espacios públicos, han demostrado reducir la incidencia del cáncer en poblaciones donde se han implementado eficazmente (Sociedad Americana contra el Cáncer, 2025). Mantener un estilo de vida saludable, basado en una alimentación equilibrada rica en frutas y verduras, junto con la práctica regular de actividad física, contribuye a disminuir el riesgo de cáncer colorrectal, de mama y de próstata, entre otros (Instituto Nacional del Cáncer, 2025). Asimismo, la vacunación contra agentes infecciosos como el virus del papiloma humano (VPH) y la hepatitis B ha sido una estrategia clave para la prevención del cáncer de cuello uterino y hepatocelular, respectivamente, al reducir la carga viral y la probabilidad de mutaciones oncogénicas (Organización Mundial de la Salud, 2025).

La prevención secundaria está orientada a la detección temprana del cáncer a través de programas que permiten identificar la enfermedad en sus primeras etapas, cuando el tratamiento es más efectivo y la supervivencia mejora considerablemente; exámenes como la mamografía para el cáncer de mama, la colonoscopia para el cáncer colorrectal y el papanicolaou para el cáncer cervicouterino han demostrado reducir significativamente la mortalidad asociada a estos tumores al detectar lesiones precancerosas o malignas en etapas iniciales (Sociedad Americana contra el Cáncer, 2025). Además, la educación sobre los síntomas tempranos del cáncer desempeña un papel crucial en la promoción de la consulta médica oportuna, lo que es particularmente relevante en poblaciones de alto riesgo (Instituto Nacional del Cáncer, 2025). Para que estas estrategias sean efectivas, es fundamental garantizar el acceso equitativo a los servicios de salud y pruebas de detección, disminuyendo así las desigualdades en el diagnóstico y tratamiento temprano del cáncer (Organización Mundial de la Salud, 2025).

ANTECEDENTES GENERALES

CÁNCER DE PULMÓN

Definición y clasificación del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es una enfermedad caracterizada por el crecimiento descontrolado de células malignas en el tejido pulmonar y representa una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial; su clasificación se basa en criterios histológicos y moleculares, diferenciándose principalmente en cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC,

por sus siglas en inglés), cada uno con características clínicas y terapéuticas distintivas (Nicholson, y otros, 2022).

El cáncer de pulmón de células pequeñas representa aproximadamente el 15% de los casos y se caracteriza por su crecimiento acelerado, alta tasa de proliferación y rápida diseminación sistémica; histológicamente, está compuesto por células pequeñas con escaso citoplasma, núcleos hipercromáticos y actividad mitótica elevada; su origen se encuentra en células neuroendocrinas pulmonares y su asociación con el tabaquismo es significativa; dada su agresividad, los tratamientos estándar incluyen quimioterapia y radioterapia, ya que la cirugía suele estar indicada solo en casos muy localizados (American Cancer Society, 2023).

Por otro lado, el cáncer de pulmón de células no pequeñas constituye aproximadamente el 85% de los casos y comprende tres subtipos principales: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes; el adenocarcinoma es el subtipo más frecuente y suele originarse en células epiteliales glandulares, siendo más común en personas no fumadoras y en mujeres; su crecimiento tiende a ser periférico y su diagnóstico se ve favorecido por la identificación de alteraciones genéticas como mutaciones en EGFR, ALK, ROS1 y KRAS, las cuales han permitido el desarrollo de terapias dirigidas con inhibidores específicos (Lung Cancer Research Foundation, 2024).

El carcinoma de células escamosas se asocia fuertemente al tabaquismo y suele localizarse en las vías aéreas principales; se caracteriza histológicamente por la presencia de queratinización y puentes intercelulares, con una respuesta variable a las terapias dirigidas; por último, el carcinoma de células grandes es un tipo menos común y se distingue por su falta de diferenciación histológica, lo que dificulta su clasificación dentro de los otros subtipos (Cancer Research UK, 2023).

La clasificación del cáncer de pulmón ha evolucionado con la incorporación de criterios moleculares y genéticos que han mejorado la precisión diagnóstica y el enfoque terapéutico; la diferenciación entre los subtipos tumorales es fundamental para determinar el tratamiento más adecuado y el pronóstico del paciente (Travis, et al., 2013).

Epidemiología del cáncer de pulmón

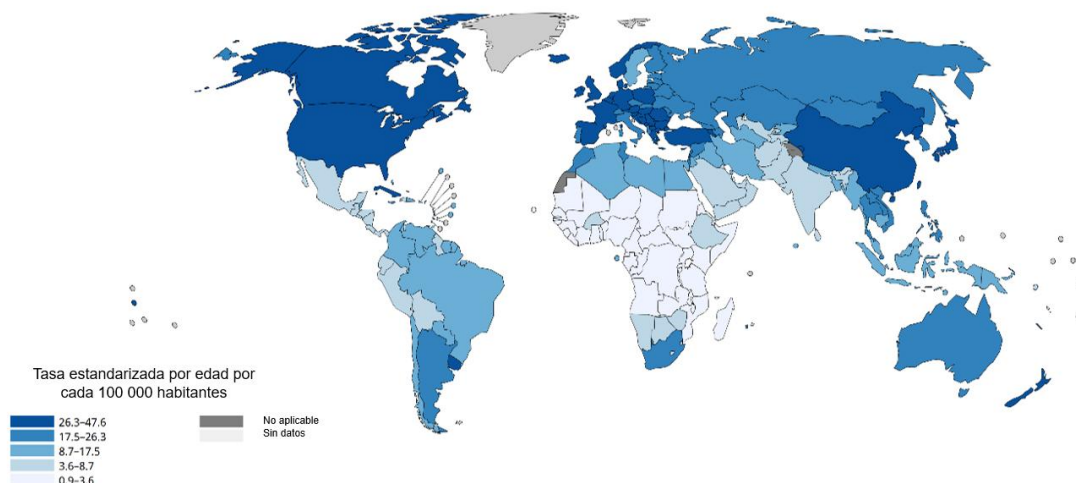


Figura 3. Mapa mundial de incidencia estandarizada por edad del cáncer de tráquea, bronquios y pulmón en ambos sexos, 2022. Las tonalidades más oscuras representan una mayor tasa de incidencia por 100,000 habitantes. Imagen tomada y modificada, fuente: (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, 2025).

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial, con aproximadamente 2 millones de casos nuevos y 1.8 millones de muertes anuales (Barta, Powell, & Wisnivesky, 2019). Representa la segunda neoplasia más común en hombres y mujeres, y su incidencia sigue aumentando en países en desarrollo debido al acceso creciente al tabaco y la contaminación ambiental (Fig. 2) (Thandra, Barsouk, Saginala, Aluru, & Barsouk, 2021).

La edad promedio de diagnóstico es de 70 años, con una prevalencia mayor en hombres, aunque en mujeres se ha observado un incremento asociado a mutaciones en EGFR y otros factores hormonales (Barta, Powell, & Wisnivesky, 2019). En regiones como Europa Central y del Este, la incidencia sigue en ascenso en mujeres, mientras que en hombres ha disminuido desde la década de 1990 (Thandra, Barsouk, Saginala, Aluru, & Barsouk, 2021). En Asia, Japón mantiene tasas de incidencia similares a las de Estados Unidos, con una mortalidad menor en mujeres debido a una mayor respuesta a terapias dirigidas (Barta, Powell, & Wisnivesky, 2019).

En países emergentes, como los pertenecientes al grupo BRICS (Brasil, Rusia, India, China y Sudáfrica), la carga de mortalidad es mayor debido al acceso limitado a diagnósticos tempranos y tratamientos adecuados (Fig. 4) (Barta, Powell, & Wisnivesky, 2019). En América del Sur, Uruguay presenta la mayor incidencia en hombres, mientras que en mujeres las tasas más altas se encuentran en Venezuela y Argentina (Thandra, Barsouk, Saginala, Aluru, & Barsouk, 2021).

A pesar de los avances en tratamiento y diagnóstico, la supervivencia a cinco años sigue siendo baja, lo que resalta la importancia de estrategias de prevención y detección

temprana para reducir el impacto global del cáncer de pulmón (Thandra, Barsouk, Saginala, Aluru, & Barsouk, 2021).

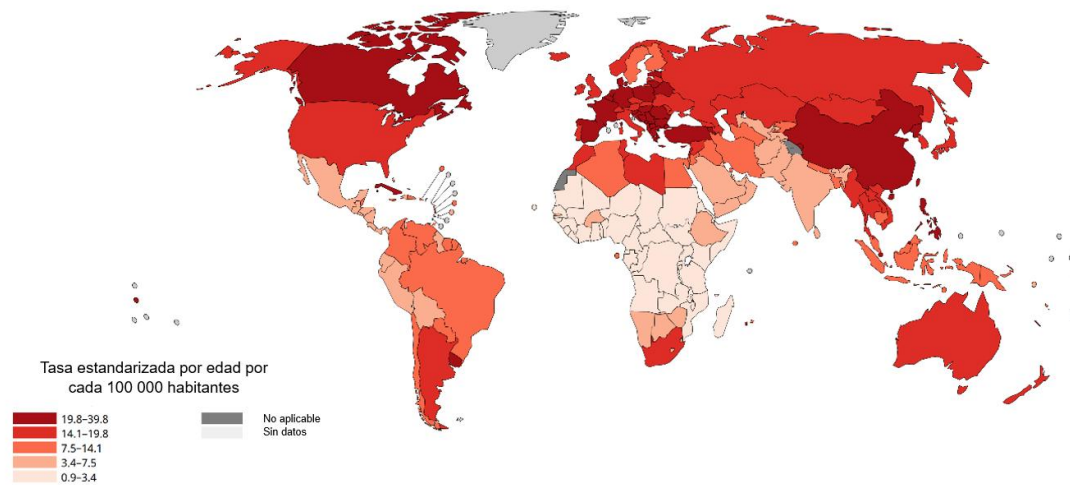


Figura 4. Mapa mundial de mortalidad estandarizada por edad del cáncer de tráquea, bronquios y pulmón en ambos sexos, 2022. Las tonalidades más oscuras representan una mayor tasa de incidencia por 100,000 habitantes. Imagen tomada y modificada, fuente: (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, 2025).

Epidemiología del cáncer de pulmón en México

Así mismo, el cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte por neoplasias en México: En 2016, se reportaron 7,811 casos nuevos y 7,044 muertes, consolidándose como la neoplasia con mayor mortalidad en el país; aunque su incidencia es menor en comparación con otras regiones del mundo, su letalidad sigue siendo elevada debido al diagnóstico tardío y las limitaciones en el acceso a tratamiento (Arrieta, et al., 2019).

La mortalidad por cáncer de pulmón ha mostrado una tendencia decreciente en los últimos años, pasando de 7.83 a 4.97 por 100,000 habitantes entre 1998 y 2016; sin embargo, esta reducción no ha sido uniforme en todo el país, ya que las tasas de mortalidad son más altas en las regiones del norte y en zonas con mayor marginación social (Fig. 5) (Ramírez-Tirado, Uribe-Ortiz, Arrieta, & Tirado-Gómez, 2019). En términos de género, los hombres son los más afectados, con una razón de 1.6:1 en comparación con las mujeres, y el 53% de los decesos ocurren en personas mayores de 70 años (Arrieta, et al., 2019).

A pesar de los desafíos en la detección y tratamiento, la mortalidad por cáncer de pulmón ha disminuido debido a la reducción en el consumo de tabaco y a la implementación de políticas de control del tabaquismo en los últimos años (Arrieta, et al., 2019). No obstante, la ausencia de un programa nacional de tamizaje sigue limitando la detección temprana de la enfermedad, lo que subraya la necesidad de fortalecer estrategias de prevención y acceso a terapias efectivas en el país (Ramírez-Tirado, Uribe-Ortiz, Arrieta, & Tirado-Gómez, 2019).

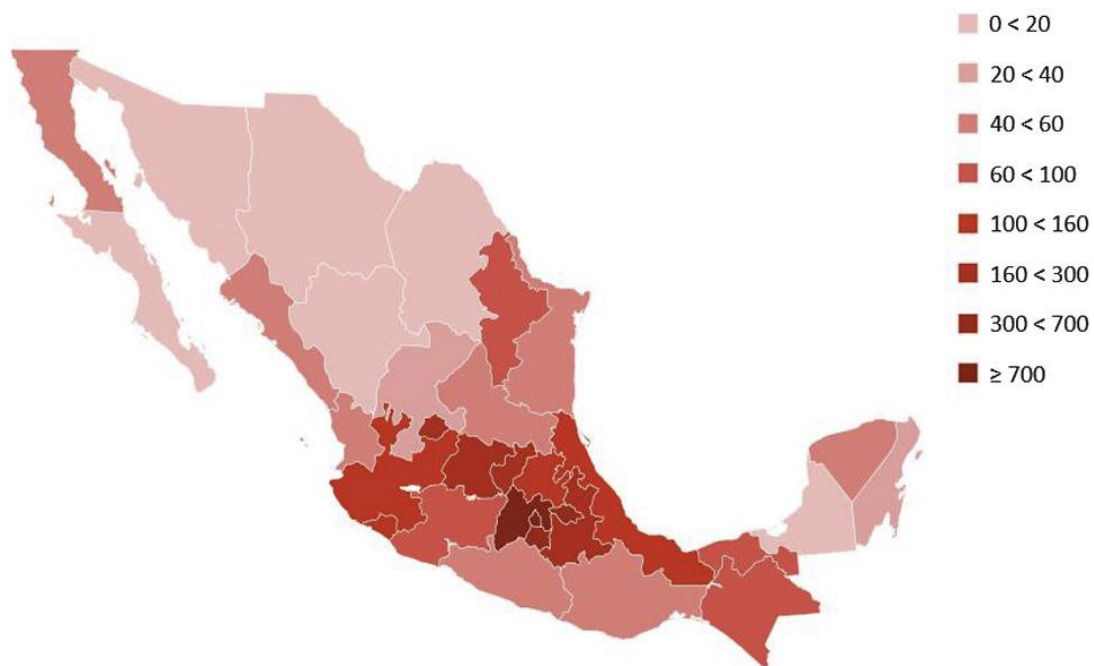


Figura 5. Distribución de la mortalidad por cáncer de pulmón en México por estado. Se observa una mayor concentración de casos en las regiones centro del país. Tomado de (Arrieta, et al., 2019).

Factores de riesgo específicos

El desarrollo del cáncer de pulmón está fuertemente vinculado a factores de riesgo ambientales y ocupacionales, siendo el tabaquismo el principal determinante de la enfermedad; el consumo de tabaco es responsable de la mayoría de los casos de cáncer de pulmón y su efecto nocivo se debe a la exposición prolongada a carcinógenos presentes en el humo del cigarrillo; la probabilidad de desarrollar la enfermedad aumenta con la cantidad de cigarrillos consumidos y los años de exposición; aunque dejar de fumar reduce significativamente el riesgo, este nunca llega a igualarse con el de una persona que nunca ha fumado (Cancer Research UK, 2023). Además, la exposición al humo de segunda mano también incrementa el riesgo de desarrollar la enfermedad, lo que resalta la importancia de las políticas de control del tabaco (American Cancer Society, 2023).

Otro factor relevante es la contaminación ambiental, tanto en espacios exteriores como en interiores; la inhalación prolongada de partículas finas y gases tóxicos derivados de fuentes como la combustión de combustibles fósiles y la industria manufacturera está asociada con un incremento en la incidencia del cáncer de pulmón (Cancer Research UK, 2023). En zonas urbanas altamente industrializadas, la calidad del aire puede ser un factor determinante en la aparición de la enfermedad, afectando incluso a personas no fumadoras (American Cancer Society, 2023).

Además, la exposición ocupacional a carcinógenos representa un riesgo significativo; trabajadores de industrias como la construcción, minería y manufactura pueden estar expuestos a sustancias como asbesto, sílice y gases de escape diésel, todos reconocidos como agentes cancerígenos pulmonares (American Cancer Society, 2023).

La combinación de estos agentes con el tabaquismo potencia considerablemente el riesgo, generando un efecto sinérgico que acelera el daño celular y la transformación maligna del epitelio pulmonar (Cancer Research UK, 2023).

Dado que estos factores de riesgo son prevenibles, su identificación y control resultan fundamentales para reducir la carga global del cáncer de pulmón; estrategias como la regulación del consumo de tabaco, la mejora de la calidad del aire y la protección laboral contra sustancias carcinógenas pueden contribuir significativamente a la disminución de la incidencia de esta enfermedad (American Cancer Society, 2023).

Mecanismos moleculares involucrados

El cáncer de pulmón es una enfermedad heterogénea con múltiples alteraciones moleculares que impulsan su desarrollo y progresión; las mutaciones en EGFR, KRAS, ALK, MET y BRAF son algunas de las más comunes y contribuyen a la activación de vías de señalización aberrantes que favorecen la proliferación celular, la resistencia a la apoptosis y la invasión tumoral (Skoulidis & Heymach, 2019).

En el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), las mutaciones en EGFR son altamente prevalentes y promueven una señalización desregulada a través de las vías PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK y JAK/STAT, favoreciendo el crecimiento tumoral y la resistencia terapéutica (Camidge, Doebele, & Kerr, 2019).

Otro mecanismo relevante en la patogénesis del cáncer de pulmón es la activación de KRAS, que está presente en aproximadamente el 30% de los adenocarcinomas pulmonares; KRAS actúa como un regulador clave de la vía MAPK, y su mutación provoca una señalización proliferativa constante, lo que confiere resistencia a diversas terapias dirigidas (Camidge, Doebele, & Kerr, 2019). Además, alteraciones en BRAF y amplificaciones en MET han sido descritas en subpoblaciones de tumores pulmonares, permitiendo la evasión de los tratamientos dirigidos contra EGFR (Li & Cao, 2020).

A nivel epigenético, se han identificado alteraciones en la metilación del ADN, modificaciones en histonas y desregulación de microARNs que pueden influir en la progresión del cáncer de pulmón. La inactivación de genes supresores de tumores como TP53, RB1 y PTEN debido a estos cambios epigenéticos favorece la proliferación descontrolada de células tumorales (Ramazi, Dadzadi, Sahafnejad, & Allahverdi, 2023).

En cuanto a los mecanismos de resistencia, las células tumorales pueden activar vías de señalización alternas o adquirir nuevas mutaciones tras la exposición a terapias dirigidas; un ejemplo de esto es la mutación T790M en EGFR, que reduce la efectividad de los inhibidores de tirosina quinasa de primera y segunda generación, requiriendo el uso de terapias de tercera generación como osimertinib (Camidge, Doebele, & Kerr, 2019).

Diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón requiere un diagnóstico preciso para determinar la mejor estrategia terapéutica. La tomografía computarizada (TC) es el método recomendado para la detección temprana en poblaciones de alto riesgo, como fumadores crónicos o

exfumadores recientes; en casos sospechosos, el diagnóstico se confirma mediante citología de esputo, biopsia por aspiración con aguja fina, broncoscopia o mediastinoscopia, dependiendo de la localización del tumor y la accesibilidad para obtener muestras histológicas (Kim, Lee, & Huang, 2022).

El sistema TNM (Tumor, Nódulo, Metástasis) permite estadificar la enfermedad y definir la mejor estrategia terapéutica; en tumores localizados, la cirugía es el tratamiento de elección, con procedimientos como lobectomía o neumonectomía según la extensión de la lesión; en estadios más avanzados o inoperables, el manejo se basa en terapias sistémicas, incluyendo quimioterapia, inmunoterapia y terapias dirigidas (Centers for Disease Control and Prevention, 2024).

En el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), la presencia de mutaciones en EGFR, ALK o ROS1 permite el uso de terapias dirigidas con inhibidores de tirosina quinasa (TKIs), los cuales han mejorado la supervivencia en estos pacientes; para tumores sin alteraciones moleculares tratables, la inmunoterapia con inhibidores de PD-1/PD-L1 se ha convertido en una opción clave, ya sea sola o en combinación con quimioterapia (Kim, Lee, & Huang, 2022).

Por otro lado, en el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), el tratamiento estándar continúa siendo quimioterapia, acompañada de radioterapia en casos de enfermedad limitada; en enfermedad extensa, la incorporación de inmunoterapia ha mostrado beneficios en la respuesta al tratamiento y en la supervivencia global (Kim, Lee, & Huang, 2022).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

CONEXINAS

Definición y función de las conexinas

Las conexinas son una familia de proteínas transmembranales esenciales para la comunicación intercelular y la homeostasis tisular; estas proteínas están organizadas estructuralmente con un extremo amino citoplasmático, cuatro dominios transmembrana, dos asas extracelulares (EL1 y EL2), un asa citoplasmática y un extremo carboxilo intracelular, además, ensamblan canales de unión tipo gap junctions, permitiendo el intercambio directo de iones, metabolitos y señales secundarias entre células adyacentes (Zhou, et al., 2023). Cada canal está compuesto por dos hemicanales o conexones, cada uno formado por seis subunidades de conexina, lo que permite la transmisión bidireccional de moléculas con un peso menor a 1.2 kDa (Fig. 6) (Dbouk, Mroue, El-Sabban, & Talhouk, 2009).

Las conexinas desempeñan un papel fundamental en la regulación del crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis, funciones que pueden estar mediadas tanto por mecanismos dependientes como independientes de canal (Aasen, et al., 2019). Además de formar gap junctions, las conexinas pueden operar como hemicanales en la

membrana celular, permitiendo la liberación de ATP, NAD⁺ y otros mensajeros extracelulares, lo que modula procesos autocrinos y paracrinos (Zhou, et al., 2023). También han sido identificadas funciones no relacionadas con el transporte de moléculas, como su participación en la señalización intracelular mediante la regulación de interacciones con proteínas del citoesqueleto y otros factores de señalización (Aasen, et al., 2019).

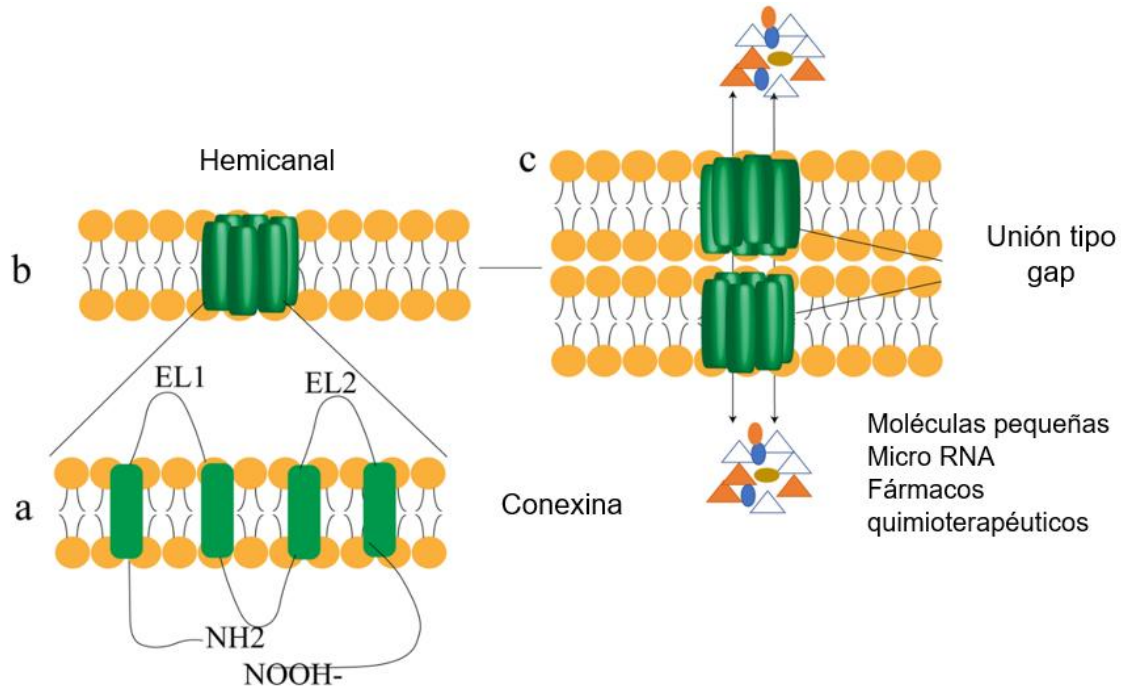


Figura 6. Estructura y función de las conexinas en la formación de gap junctions. (a) Organización estructural de las conexinas, compuestas por un extremo amino citoplasmático, cuatro dominios transmembrana, dos asas extracelulares (EL1 y EL2), un asa citoplasmática y un extremo carboxilo intracelular. (b) Seis conexinas se ensamblan para formar un hemicanal o conexón, creando una estructura hueca en la membrana plasmática. (c) Dos hemicanales en células adyacentes se conectan en una disposición head-to-head, dando lugar a los gap junctions, los cuales permiten el intercambio de moléculas entre células, un proceso denominado comunicación intercelular. Imagen tomada y modificada de (Zhou, et al., 2023)

Conexinas en cáncer

Las conexinas juegan un papel dual en la biología del cáncer, actuando tanto como supresores tumorales como facilitadores de la progresión tumoral, dependiendo del contexto celular y del tipo de tejido en el que se expresan (Aasen, et al., 2019). Su función principal se lleva a cabo a través de la comunicación intercelular mediada por gap junctions, que regulan procesos esenciales como la proliferación, diferenciación y apoptosis celular; sin embargo, alteraciones en su expresión o función pueden conducir a una proliferación descontrolada, invasión y metástasis de células cancerosas (Fig. 7) (Dbouk, Mroue, El-Sabban, & Talhouk, 2009).

En diversos tipos de cáncer, se ha observado una disminución en la expresión de conexinas, lo que resulta en la pérdida de comunicación intercelular y contribuye a un fenotipo más agresivo (Zhou, et al., 2023). Este fenómeno se ha asociado con mecanismos como la metilación del promotor de los genes de conexinas y la regulación

postranscripcional por microARNs específicos que inhiben su traducción (Kandouz & Batist, 2010). En particular, la pérdida de expresión de Cx43, una de las conexinas más estudiadas, se ha relacionado con una mayor proliferación tumoral y una menor capacidad de diferenciación celular (Naus & Laird, 2010).

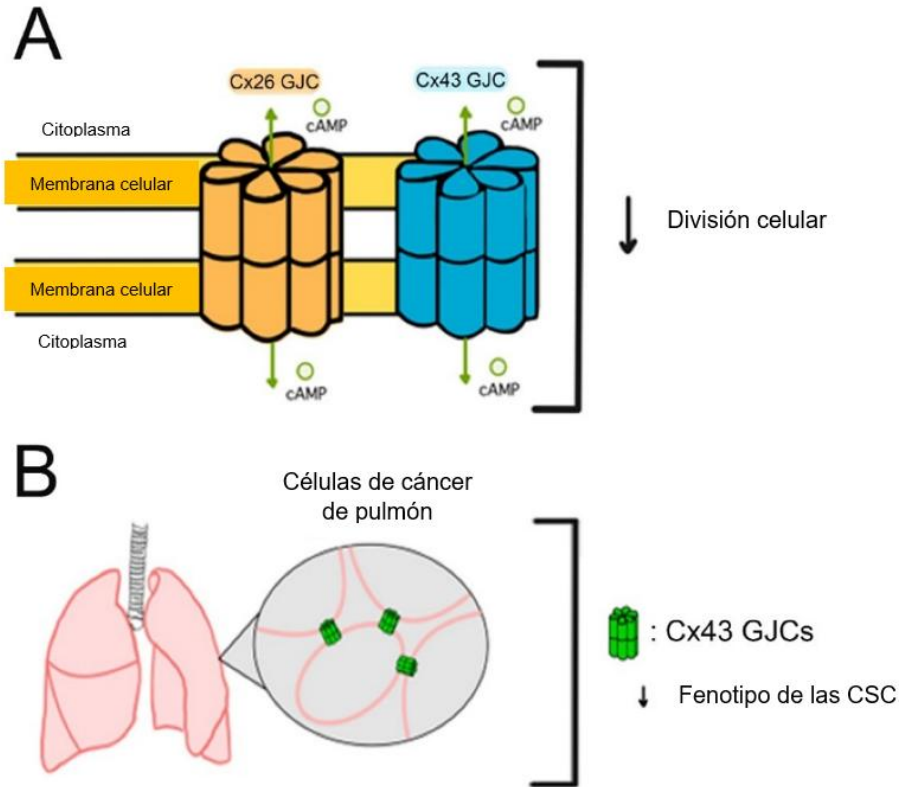


Figura 7. Papel de las gap junctions de conexinas (Cx-GJCs) en la regulación de la agresividad de las células cancerosas. **(A)** Relación entre el flujo de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) a través de Cx26 y Cx43, y su impacto en la división celular. **(B)** En el cáncer de pulmón, Cx43-GJCs inhiben el fenotipo de células madre cancerosas (CSC). Imagen tomada y modificada de (León-Fuentes, Salgado-Gil, Novoa, & Retamal, 2023).

A pesar de su función como supresores tumorales, ciertas conexinas pueden favorecer la progresión del cáncer al facilitar la invasión celular y la metástasis; se ha observado que las células de cáncer de pulmón pueden utilizar Cx43 para comunicarse con células del sistema nervioso central, facilitando la metástasis cerebral; esta interacción permite a las células tumorales atravesar la barrera hematoencefálica y establecerse en el cerebro, lo que conduce a una progresión más agresiva de la enfermedad (Luo, et al., 2020). Además, la sobreexpresión de Cx43 en células endoteliales pulmonares humanas puede inducir angiogénesis, promoviendo la proliferación y migración celular; este proceso está mediado por la fosforilación en el sitio Ser279 en el extremo C-terminal de Cx43, lo que sugiere que la fosforilación específica de Cx43 juega un papel crucial en la promoción de la angiogénesis en el cáncer de pulmón (Zhou, et al., 2022).

Este papel dual de las conexinas en el cáncer destaca su potencial como dianas terapéuticas. Algunas estrategias buscan restaurar su expresión para reactivar la comunicación intercelular y frenar el crecimiento tumoral, mientras que otras intentan

bloquear su función en contextos donde favorecen la progresión de la enfermedad (Kandouz & Batist, 2010). Comprender los mecanismos específicos mediante los cuales cada conexina influye en la progresión tumoral es fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas personalizadas (Naus & Laird, 2010).

Relación entre conexas y señalización de calcio

Las conexas desempeñan un papel clave en la regulación de la homeostasis del calcio y la comunicación intercelular a través de gap junctions y hemicanales; estos canales permiten el intercambio directo de iones, incluidas las señales de calcio, entre células adyacentes, lo que influye en la respuesta celular y en procesos fisiológicos como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis (Decrock, et al., 2011).

El calcio intracelular regula la apertura y cierre de los hemicanales de conexina a través de mecanismos que involucran la unión de iones divalentes a residuos específicos dentro del canal; por ejemplo, se ha descrito que en los hemicanales de conexina 32 (Cx32) la regulación por calcio ocurre mediante la interacción con un anillo de residuos de ácido aspártico en la región vestibular del poro, esta interacción impide la apertura completa del canal y bloquea la conducción iónica en condiciones fisiológicas, evitando efectos adversos como la fuga no controlada de metabolitos (Gómez-Hernández, de Miguel, Larrosa, González, & Barrio, 2003).

En el contexto del cáncer, la disrupción en la señalización de calcio mediada por conexas puede contribuir a la progresión tumoral; se ha observado que la expresión aberrante de Cx43 en células cancerígenas modifica la regulación del calcio intracelular, lo que impacta en la proliferación y la resistencia a la apoptosis; además, los hemicanales pueden facilitar la entrada de calcio extracelular, promoviendo respuestas celulares que favorecen la migración e invasividad de células tumorales (Schalper, Carvajal-Hausdorf, & Oyarzo, 2014).

La relación entre conexas y señalización de calcio también se extiende a la regulación de la apoptosis; se ha descrito que la activación de los hemicanales de conexina en condiciones de estrés celular permite la liberación de ATP y la entrada de calcio, lo que puede activar vías proapoptóticas o, en ciertos contextos, favorecer la supervivencia celular dependiendo de la intensidad y duración del estímulo (Decrock, Vinken, & De Vuyst, 2009).

Efecto bystander mediado por conexas

El efecto bystander es un fenómeno mediante el cual las células no expuestas directamente a un agente dañino pueden sufrir efectos secundarios debido a la transmisión de señales desde células adyacentes afectadas; en el contexto del cáncer y la terapia oncológica este efecto puede tener consecuencias tanto beneficiosas como perjudiciales, dependiendo del tipo de señal transmitida y la naturaleza de la comunicación intercelular (Wang, Zhou, Liu, & Zuo, 2018).

Las conexinas, al formar canales de unión tipo gap junction, desempeñan un papel crucial en la propagación de señales apoptóticas y en la regulación del microambiente tumoral (Ma, et al., 2018). A través de estos canales, pueden transferirse moléculas pequeñas, como iones de calcio, ATP, factores de estrés oxidativo y mediadores apoptóticos, permitiendo la sincronización de respuestas celulares y la activación de la muerte celular programada en células vecinas no expuestas directamente a un tratamiento (Edwards, et al., 2004). Esta comunicación intercelular puede amplificar los efectos de terapias como la radioterapia y la quimioterapia, facilitando la eliminación de células tumorales más allá del área tratada (Spray, et al., 2013).

Diversos estudios han demostrado que el efecto bystander mediado por conexinas puede depender del tipo de conexina expresada; por ejemplo, Cx43 y Cx26 han sido identificadas como moduladores claves en la propagación de señales apoptóticas en ciertos tipos de cáncer (Wang, Zhou, Liu, & Zuo, 2018). En células de cáncer de pulmón, se ha observado que la presencia de Cx43 puede potenciar el efecto bystander, aumentando la sensibilidad de las células tumorales a tratamientos radioterapéuticos al facilitar la propagación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros mediadores de daño celular (Fig.8) (Ma, et al., 2018). En contraste, algunos estudios sugieren que ciertos tipos de conexinas pueden conferir resistencia al efecto bystander al modular la actividad de las señales pro-apoptóticas y proteger a las células tumorales del daño inducido por radiación (Edwards, et al., 2004).

Además de la comunicación mediada por gap junctions, el efecto bystander también puede ocurrir a través de mecanismos paracrin, donde células afectadas liberan señales solubles como citoquinas y exosomas que inducen respuestas en células circundantes (Spray, et al., 2013). Sin embargo, la interacción entre ambos mecanismos sigue siendo objeto de investigación; se ha propuesto que la inhibición de gap junctions podría reducir la extensión del efecto bystander en ciertos contextos, lo que podría tener implicaciones en el diseño de terapias dirigidas para minimizar el daño a tejidos sanos durante el tratamiento oncológico (Edwards, et al., 2004).

En el contexto de la terapia fotodinámica (TFD), el efecto bystander ha sido vinculado a la producción de óxido nítrico (NO) en células tratadas; se ha demostrado que algunas células cancerosas expuestas a TFD aumentan la expresión del óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), lo que genera una señal de supervivencia en células no tratadas directamente; este mecanismo podría reducir la efectividad de la TFD al favorecer la proliferación y migración de células circundantes, en lugar de inducir su eliminación, además, el NO generado en células tratadas con TFD puede modular la respuesta de las células bystander al influir en la producción de ROS y en la activación de vías de señalización prosupervivencia (Bazak, Korytowski, & Girotti, 2019).

Efectos secundarios del óxido nítrico inducido por TFD

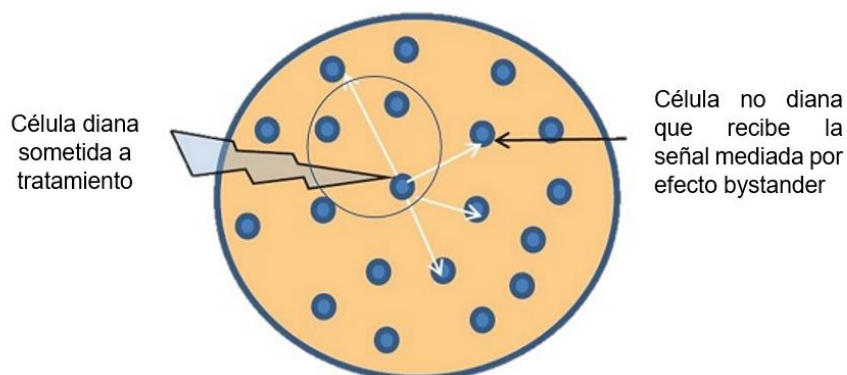


Figura 8. Efecto bystander inducido por óxido nítrico (NO) durante la terapia fotodinámica (TFD). La imagen muestra cómo una célula objetivo tratada con TFD genera señales que afectan a células circundantes no tratadas directamente, propagando efectos secundarios mediante la comunicación intercelular. Imagen tomada y modificada de (Bazak, Korytowski, & Girotti, 2019).

CALCIO

Papel del calcio en la fisiología celular

El calcio es un ion fundamental en la fisiología celular, actuando como un segundo mensajero clave en múltiples procesos biológicos, incluyendo la contracción muscular, la secreción de neurotransmisores y hormonas, la activación de enzimas y la regulación de la expresión génica (Fig. 9) (Prakriya, 2020). La homeostasis del calcio se mantiene a través de un delicado equilibrio entre su entrada, almacenamiento y eliminación de la célula, regulado por diversos transportadores y canales iónicos localizados en la membrana plasmática y en organelos intracelulares como el retículo endoplasmático (RE) y las mitocondrias (Cheng, Wei, Wei, & Verkhatsky, 2006).

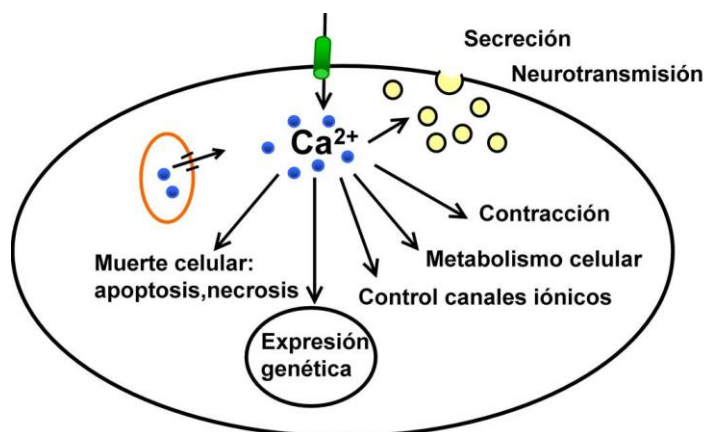


Figura 9. Funciones del calcio en la fisiología celular. El Ca^{2+} regula múltiples procesos celulares, incluyendo la neurotransmisión, secreción de hormonas, contracción muscular, metabolismo celular, control de canales iónicos, expresión genética y muerte celular mediante apoptosis o necrosis. Imagen tomada de (Camello & Camello, 2000).

El mantenimiento de una concentración baja de calcio en el citoplasma es esencial para evitar la activación no regulada de procesos celulares; para ello, las células utilizan

bombas de calcio como la SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase) y la PMCA (Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase), además del intercambiador sodio-calcio (NCX), que facilitan la eliminación del ion desde el citosol hacia compartimentos de almacenamiento o al exterior celular (Yu & Sharma, 2023).

Las señales de calcio pueden generarse a través de la apertura de canales de calcio en la membrana plasmática, como los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCCs) y los canales operados por depósitos de calcio (SOCE, Store-Operated Calcium Entry), que incluyen a las proteínas STIM y Orai (Prakriya & Lewis, 2015). Estas señales no solo controlan funciones inmediatas, como la exocitosis de neurotransmisores en neuronas, sino que también pueden regular respuestas de largo plazo, como la plasticidad sináptica y la activación de factores de transcripción (Verkhatsky & Toescu, 1998).

En el contexto celular, el retículo endoplasmático actúa como un reservorio de calcio, liberando el ión a través de receptores como el IP_3R (Inositol 1,4,5-trifosfato receptor) y los RyR (Receptores de rianodina), modulando así procesos como la activación de la apoptosis y la diferenciación celular (Dolmetsch, 2003). Además, las mitocondrias también desempeñan un papel crucial en la homeostasis del calcio, actuando como amortiguadores de la señalización cálcica y vinculando los cambios en los niveles de calcio con la producción de ATP y la generación de ROS (Nicholls, 2005).

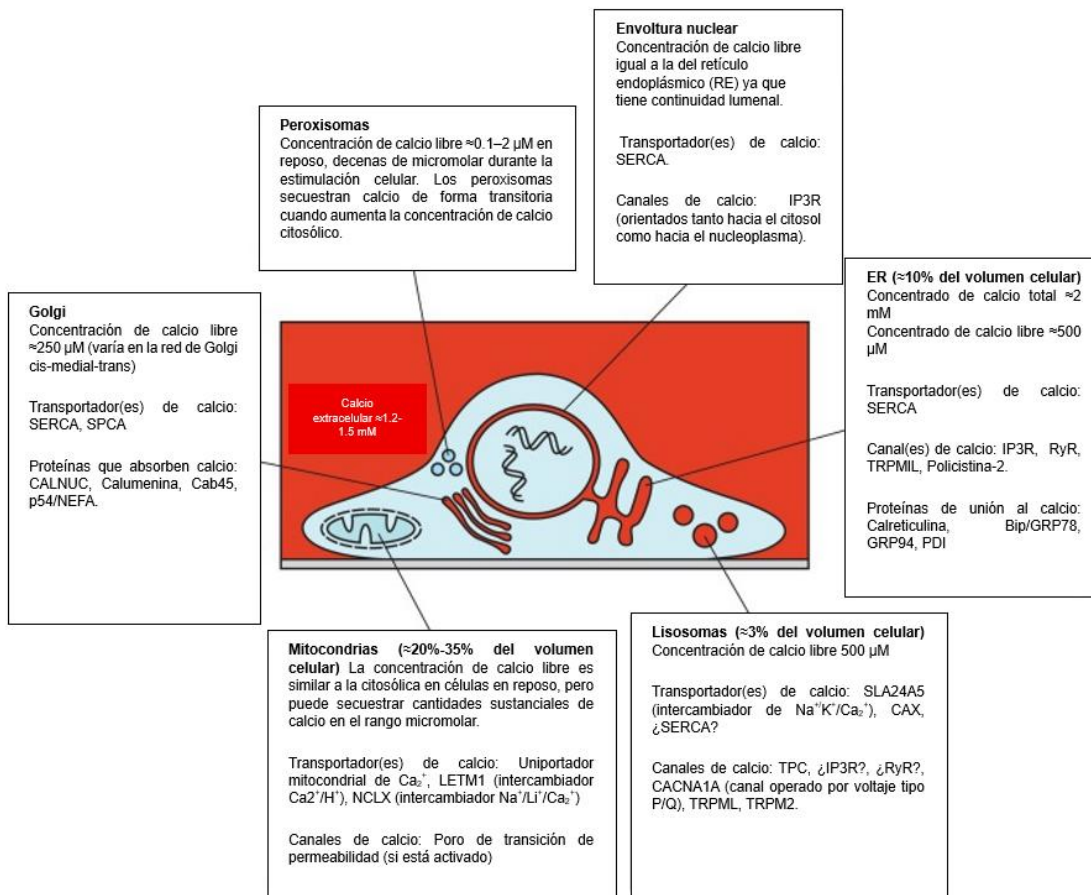


Figura 10. Distribución del calcio intracelular en diferentes orgánulos celulares. Los niveles de calcio varían según el compartimento celular, siendo el retículo endoplasmático (RE) y las mitocondrias los principales depósitos. El calcio citosólico se mantiene en niveles bajos en condiciones basales, mientras que los peroxisomas, el Golgi, los lisosomas y la envoltura nuclear contribuyen a la regulación de la homeostasis del calcio mediante transportadores y canales específicos. Imagen tomada y modificada de (Bootman & Bultynck, 2020).

Por lo tanto, la regulación del calcio es esencial para el correcto funcionamiento celular, y su desregulación puede estar implicada en diversas patologías, incluidas enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y el cáncer (Berridge, 2017).

Importancia del calcio en la señalización celular

El calcio (Ca^{2+}) es un mensajero intracelular crucial que regula múltiples procesos celulares como la proliferación, diferenciación y apoptosis; su concentración en el citoplasma es estrictamente regulada a través de diversos mecanismos de transporte, almacenamiento y liberación desde compartimentos intracelulares como el retículo endoplasmático, las mitocondrias y los lisosomas (Fig. 11) (Bootman & Bultynck, 2020).

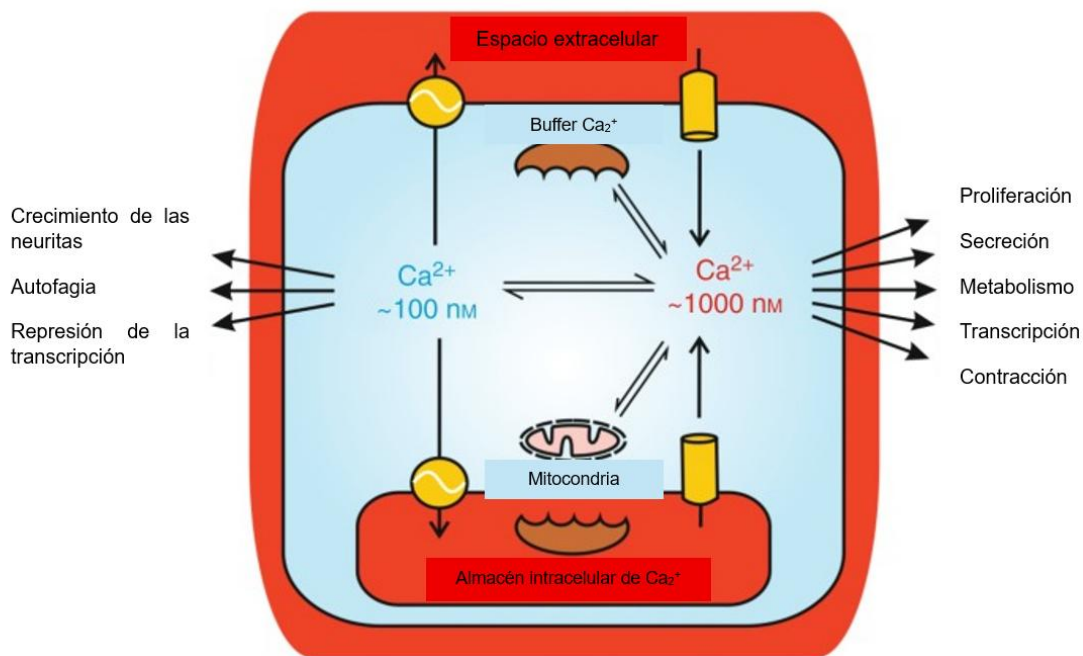


Figura 11. Señales de Ca^{2+} citosólico originadas por la liberación de Ca^{2+} desde orgánulos intracelulares y/o la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática. Durante la señalización fisiológica, la concentración de Ca^{2+} citosólico aumenta de ~100 nM a ~1 μM , dependiendo del estímulo y de factores como el almacenamiento en mitocondrias y la unión a proteínas buffer. El principal reservorio intracelular de Ca^{2+} es el retículo endoplasmático (RE), aunque otros compartimentos como la envoltura nuclear, el aparato de Golgi y lisosomas también actúan como depósitos de Ca^{2+} . Imagen tomada y modificada de (Bootman & Bultynck, 2020).

En la proliferación celular, las señales de Ca^{2+} modulan la activación de diversas quinasas y factores de transcripción involucrados en la progresión del ciclo celular; se ha demostrado que las oscilaciones en la concentración de Ca^{2+} participan en la activación de proteínas reguladoras como la calmodulina y las quinasas dependientes de Ca^{2+} , lo que impacta en la transición entre fases del ciclo celular (Clapham, 2007). La diferenciación celular también está influenciada por la señalización del Ca^{2+} , ya que modula vías específicas que determinan el destino celular y la especialización de tejidos,

mediante la regulación de factores de transcripción y cambios epigenéticos (Bootman & Bultynck, 2020).

En cuanto a la apoptosis, el Ca^{2+} desempeña un papel determinante en la activación de caspasas y otras proteasas que llevan a la muerte celular programada; un aumento descontrolado en la concentración intracelular de Ca^{2+} puede inducir la permeabilidad mitocondrial y la liberación de citocromo c, lo que desencadena la cascada apoptótica (Clapham, 2007). Asimismo, su regulación en lisosomas y retículo endoplasmático es esencial para evitar la sobrecarga de Ca^{2+} en el citoplasma y prevenir la activación de procesos de muerte celular no programada (Bootman & Bultynck, 2020).

La homeostasis del Ca^{2+} es indispensable para la correcta función celular, y su desregulación puede contribuir a enfermedades como el cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Clapham, 2007).

Por ello, comprender los mecanismos mediante los cuales este ion regula la señalización celular es fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a modular sus efectos en patologías asociadas como el cáncer.

Relación entre calcio y cáncer

En las células cancerosas la desregulación del calcio favorece la progresión tumoral mediante la activación de señales que promueven el crecimiento celular descontrolado y la resistencia a la apoptosis (Zheng, Wang, Zhao, Liu, & Hu, 2023). Se ha identificado una remodelación en la expresión y función de canales como los TRP (transient receptor potential), SOCE (store-operated calcium entry) y VGCCs (voltage-gated calcium channels), los cuales facilitan una entrada sostenida de calcio y activan vías oncogénicas clave en la proliferación celular (Wu, Lian, & Zhao, 2021). Por ejemplo, la sobreexpresión de ORAI1 y STIM1, componentes centrales de SOCE, se ha asociado con el crecimiento acelerado de diversos tipos de cáncer, incluyendo mama y próstata (Monteith, 2017).

El calcio también desempeña un papel crítico en la resistencia a la apoptosis; en condiciones normales, un aumento repentino de Ca^{2+} en la mitocondria activa la vía intrínseca de apoptosis, pero en células tumorales, la regulación anómala del uniportador mitocondrial de calcio (MCU) permite evitar este mecanismo, favoreciendo la supervivencia celular (Zheng, Wang, Zhao, Liu, & Hu, 2023). Además, el calcio está involucrado en la migración celular y la metástasis, procesos que dependen de su señalización para modular la transición epitelio-mesenquimatoso (EMT); se ha observado que canales como TRPM7 y TRPC6 facilitan la reestructuración del citoesqueleto, permitiendo una mayor movilidad celular y la invasión de tejidos distantes (Jones & Hazlehurst, 2021). Asimismo, el calcio regula la interacción de las células tumorales con su microambiente mediante la activación del receptor sensor de calcio (CaSR), el cual modula la adhesión celular y la angiogénesis, promoviendo la formación de nuevos vasos sanguíneos a través de la producción de factores como el VEGF (vascular endothelial growth factor) (Peterlik, Grant, & Cross, 2009).

A nivel molecular, el calcio interactúa con múltiples vías oncogénicas, influyendo en la progresión del cáncer; se ha demostrado que el calcio mitocondrial puede activar la proteína STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), promoviendo la transcripción de genes relacionados con la proliferación y la evasión inmune (Wu, Lian, & Zhao, 2021). Asimismo, su interacción con la vía MAPK (mitogen-activated protein kinase) activa ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases), lo que contribuye a la resistencia a terapias antitumorales (Zheng, Wang, Zhao, Liu, & Hu, 2023). Además, el calcio modula factores de transcripción como NFAT (nuclear factor of activated T-cells) y NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), los cuales generan un ambiente inflamatorio que favorece la supervivencia de las células tumorales y dificulta su eliminación por el sistema inmune (Monteith, 2017).

En el microambiente tumoral, el calcio juega un papel en la inmunosupresión, afectando la actividad de linfocitos T y células mieloides supresoras, lo que reduce la eficacia de la respuesta inmune contra el cáncer (Zheng, Wang, Zhao, Liu, & Hu, 2023). También se ha demostrado que, en condiciones de hipoxia, STIM1 regula la estabilidad de HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1-alpha), promoviendo la progresión tumoral al facilitar la adaptación de las células cancerosas a entornos con bajos niveles de oxígeno (Wu, Lian, & Zhao, 2021). Estos hallazgos han llevado a proponer la inhibición de la señalización de calcio como una estrategia terapéutica para restaurar la sensibilidad de las células cancerosas a la apoptosis y mejorar la respuesta a los tratamientos convencionales, sin embargo, la señalización del calcio cumple funciones clave en la homeostasis celular normal, por lo que su modulación terapéutica debe realizarse con precisión para evitar efectos adversos en células sanas. (Monteith, 2017).

Participación del calcio en la apoptosis

El calcio es un regulador clave en la apoptosis, actuando en diferentes vías de señalización que determinan el destino celular; su homeostasis es mantenida por un balance dinámico entre su almacenamiento en el retículo endoplásmico y la mitocondria, y su liberación en respuesta a estímulos apoptóticos (Guo, Lao, & Chang, 2009). En la vía mitocondrial de la apoptosis, la sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria desencadena la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP, mitochondrial permeability transition pore) lo que resulta en la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c, una señal clave para la activación de la cascada de caspasas (Sukumaran, et al., 2021). Además, las proteínas de la familia Bcl-2 regulan esta vía modulando la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la transferencia de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria, promoviendo o bloqueando la apoptosis según el contexto celular (Guo, Lao, & Chang, 2009).

El retículo endoplásmico es un almacén central de Ca^{2+} y participa en la apoptosis mediante la activación de receptores de inositol trifosfato (IP₃R, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor) y canales de rianodina (RyR, ryanodine receptor), que regulan la liberación de Ca^{2+} hacia el citoplasma y la mitocondria; se ha demostrado que la sobreexpresión de IP₃R₃ favorece la liberación de Ca^{2+} hacia la mitocondria,

sensibilizando a la célula a la apoptosis, mientras que su inhibición reduce la susceptibilidad a la muerte celular (Danese, et al., 2021). Por otro lado, el RE también puede inducir apoptosis en respuesta a estrés prolongado mediante la activación de la caspasa-12, localizada en su membrana, la cual inicia la cascada apoptótica de manera independiente de la vía mitocondrial (Guo, Lao, & Chang, 2009).

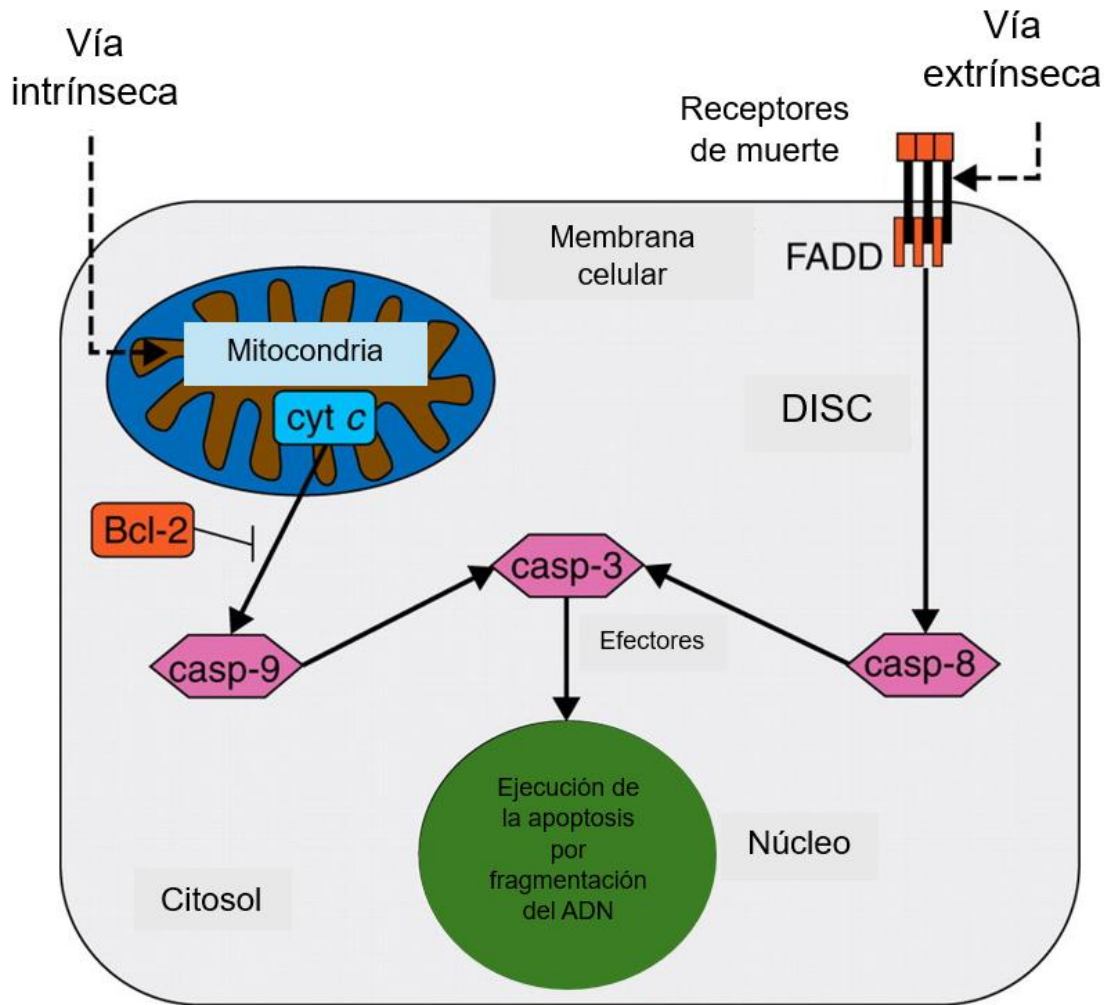


Figura 12. Principales vías de apoptosis. La vía intrínseca (izquierda) involucra disfunción mitocondrial, liberación de citocromo c (cyt c) y activación de caspasa-9 (casp-9) en el apoptosoma. La proteína antiapoptótica Bcl-2 inhibe la liberación de cyt c. La vía extrínseca (derecha) se activa por la unión de ligandos a los receptores de muerte, reclutando la proteína adaptadora FADD y caspasa-8 (casp-8) en el complejo DISC. Ambas vías convergen en la activación de caspasa-3 (casp-3), que desencadena la fragmentación del ADN y las características morfológicas de la apoptosis. Imagen tomada y modificada de (Braun, et al., 2010).

En el contexto del cáncer, la modulación del Ca^{2+} se ha convertido en un objetivo terapéutico, ya que su señalización puede ser explotada para inducir apoptosis en células tumorales resistentes a los tratamientos convencionales; por ejemplo, la activación de canales mitocondriales como el MCU (mitochondrial calcium uniporter) puede sensibilizar a las células tumorales a la apoptosis al aumentar la captación de Ca^{2+} en la mitocondria, mientras que la inhibición de IP3R3 puede reducir la progresión tumoral al limitar la señalización apoptótica dependiente del Ca^{2+} (Danese, et al., 2021).

Participación del calcio en la necrosis

Tradicionalmente, la necrosis se consideraba un proceso pasivo y no regulado, caracterizado por la pérdida de integridad de la membrana plasmática y la liberación descontrolada del contenido celular; sin embargo, investigaciones recientes han identificado formas reguladas de necrosis, como la necroptosis y la ferroptosis, en las cuales el Ca^{2+} participa activamente en su activación y ejecución (Pedrera, Ros, & García-Sáez, 2023).

Uno de los principales mecanismos mediante los cuales el Ca^{2+} induce **necrosis** es a través de la sobrecarga mitocondrial, lo que genera estrés oxidativo y agotamiento del ATP; normalmente la captación de Ca^{2+} en la mitocondria regula el metabolismo energético y la producción de ATP, no obstante, cuando la concentración citosólica de Ca^{2+} se mantiene elevada de forma sostenida se induce la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP, mitochondrial permeability transition pore) lo que lleva a la despolarización de la membrana mitocondrial, el colapso energético y, finalmente, la muerte celular por necrosis (Fig.13) (Criddle, et al., 2007).

Además, el Ca^{2+} activa proteasas como las calpaínas, que degradan proteínas del citoesqueleto y comprometen la estabilidad estructural de la célula, promoviendo la ruptura de la membrana plasmática; asimismo, la fosfolipasa A_2 dependiente de Ca^{2+} genera productos lipídicos que alteran la integridad de la membrana, favoreciendo la lisis celular (Zhivotovsky & Orrenius, 2011).

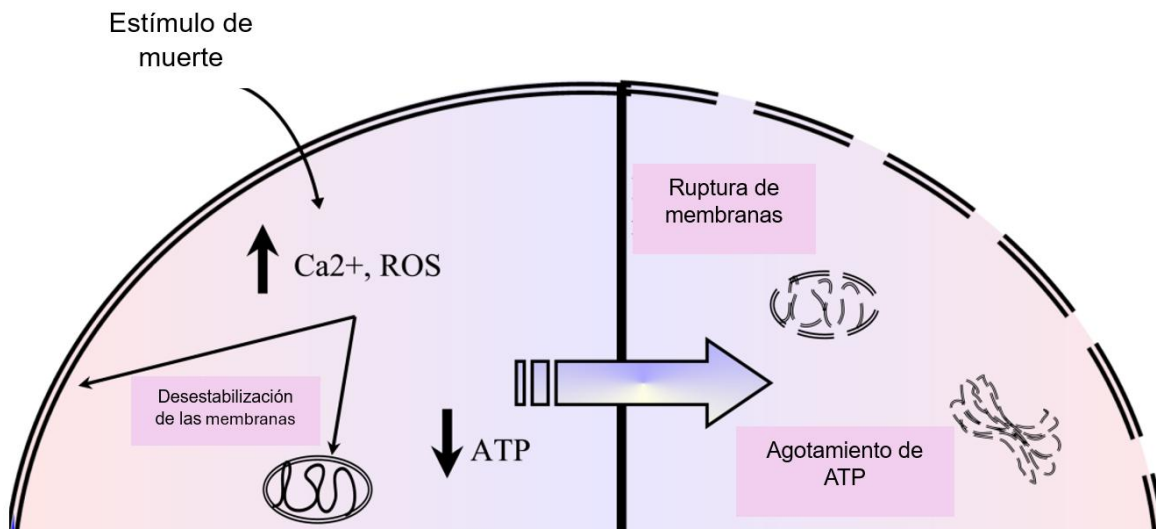


Figura 13. Cambios durante la necrosis celular. Se observa un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y calcio intracelular (Ca^{2+}). La acumulación sostenida de Ca^{2+} altera la permeabilidad de las membranas, provocando su disfunción y eventual ruptura. Durante la necrosis, ocurre un agotamiento de ATP, lo que contribuye al colapso celular. Imagen tomada y modificada de (Escobar, Olga, Echeverría, & Vázquez-Nin, 2015).

En la necroptosis el Ca^{2+} juega un papel importante en la activación de la quinasa RIP1 (receptor-interacting protein 1), que a su vez activa RIP3 y facilita la oligomerización de MLKL (mixed lineage kinase domain-like protein), promoviendo la permeabilización de la

membrana celular y la liberación de moléculas proinflamatorias; este mecanismo diferencia la necroptosis de la apoptosis, ya que genera una respuesta inflamatoria en el tejido circundante (Fig. 14) (Sun, et al., 2017).

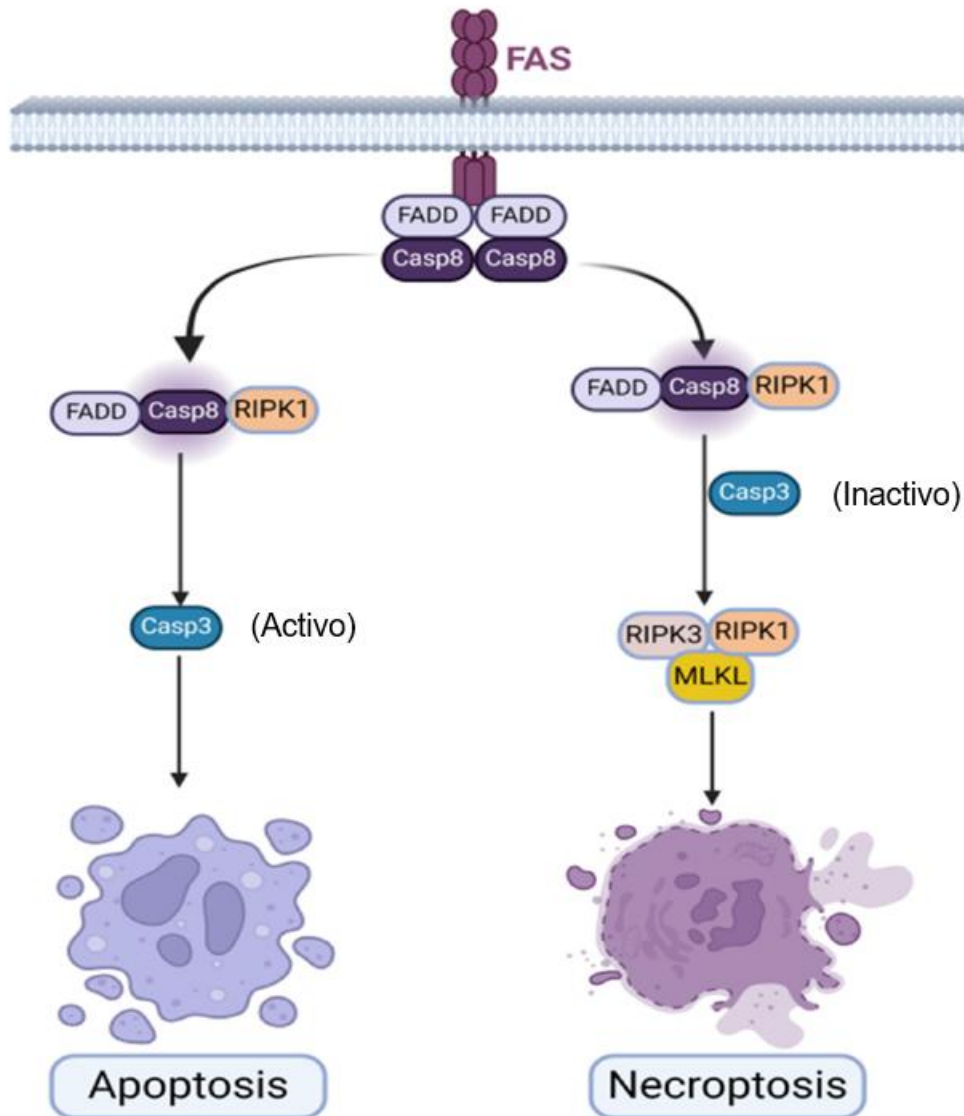


Figura 14. Vías de señalización de apoptosis y necroptosis a través del receptor de muerte FAS. La activación de FAS recluta FADD y caspasa-8 (Casp8). En la apoptosis (izquierda), Casp8 activa caspasa-3 (Casp3), lo que conduce a la fragmentación celular controlada. En la necroptosis (derecha), la inhibición de Casp8 impide la activación de Casp3, lo que permite la fosforilación de RIPK1 y RIPK3, activando MLKL y promoviendo la ruptura celular característica de la necroptosis. Imagen tomada y modificada de (Khaleque, Kim, Tanvir, Park, & Kim, 2024).

En la ferroptosis el Ca^{2+} contribuye a la peroxidación lipídica, un proceso que compromete la estabilidad de la membrana celular y facilita la muerte celular; se ha demostrado que el Ca^{2+} puede modular la actividad de la proteína transportadora de hierro transferrina, así como de enzimas antioxidantes como GPX4 (glutathione peroxidase 4), regulando la acumulación de ROS y determinando el destino final de la célula (Pedrera, Ros, & García-Sáez, 2023).

El papel del Ca^{2+} en la necrosis tiene implicaciones importantes en diversas enfermedades; en patologías isquémicas, como el infarto de miocardio y el accidente cerebrovascular, la sobrecarga de Ca^{2+} contribuye a la necrosis masiva del tejido afectado; en el contexto del cáncer, la inducción de necrosis mediada por Ca^{2+} se ha propuesto como una estrategia terapéutica alternativa a la apoptosis, ya que ciertas células tumorales pueden desarrollar resistencia a la muerte celular programada; no obstante, debido a la complejidad de la señalización del Ca^{2+} en la necrosis, su modulación terapéutica debe realizarse con precisión para evitar efectos adversos en células sanas (Criddle, et al., 2006).

TERAPIA FOTODINÁMICA (TFD)

Principios de la terapia fotodinámica

La terapia fotodinámica (TFD) es un tratamiento oncológico mínimamente invasivo que combina la administración de un fotosensibilizador con la exposición a luz de una longitud de onda específica para generar ROS, las cuales inducen daño celular y muerte en células tumorales (van Straten, Mashayekhi, de Bruijn, Oliveira, & Robinson, 2017). La TFD se basa en tres elementos fundamentales: el fotosensibilizador, la luz y el oxígeno molecular; el fotosensibilizador se acumula selectivamente en las células tumorales y, tras su activación por luz, transfiere energía al oxígeno molecular, generando ROS altamente reactivas que pueden inducir estrés oxidativo y alteraciones en componentes celulares clave (Correia, Rodrigues, Pimenta, Dong, & Yang, 2021).

El mecanismo de acción de la TFD implica la activación del fotosensibilizador desde su estado basal a un estado excitado tras la absorción de luz; a partir de este estado el fotosensibilizador puede reaccionar de dos maneras: en una reacción tipo I, transfiere electrones a biomoléculas cercanas, generando radicales libres altamente reactivos, mientras que en una reacción tipo II transfiere energía directamente al oxígeno molecular, formando oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), una de las ROS más citotóxicas (Correia, Rodrigues, Pimenta, Dong, & Yang, 2021). Estas especies reactivas pueden inducir daño en lípidos de membranas celulares, proteínas estructurales y ácidos nucleicos, lo que compromete la viabilidad celular y desencadena procesos de muerte celular (Fig. 15) (Dolmans, Fukumura, & Jain, 2003).

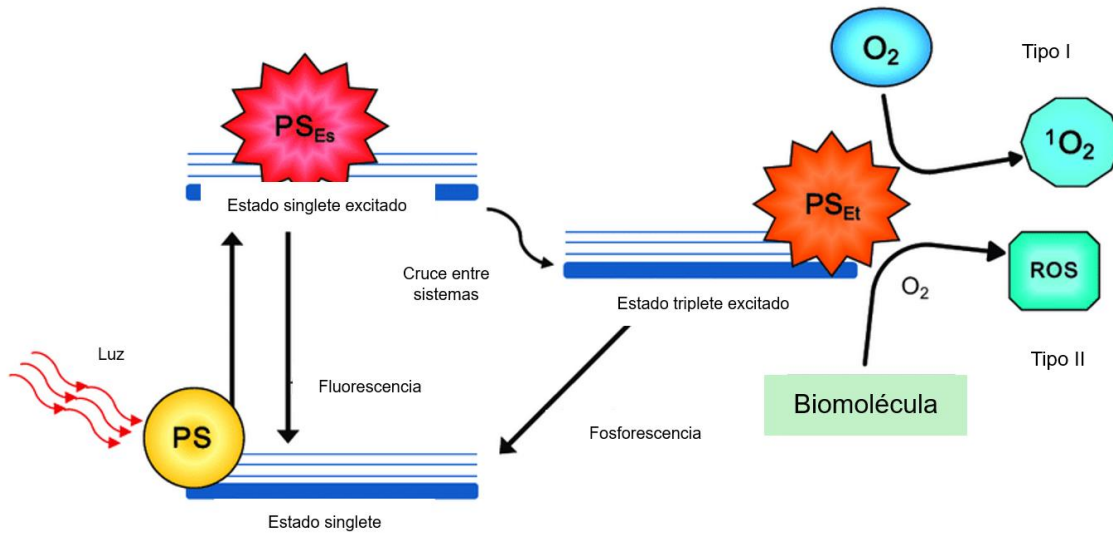


Figura 15. Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica (TFD). Tras la absorción de luz, el fotosensibilizador (PS) alcanza un estado singlete excitado (PSEs). Luego, a través de una conversión intersistema, pasa a un estado triplete excitado (PSEt), desde donde puede seguir dos rutas: en la reacción tipo I, el PS transfiere electrones o átomos de hidrógeno a biomoléculas, formando radicales que reaccionan con el oxígeno molecular y generan especies reactivas de oxígeno (ROS); en la reacción tipo II, el PS transfiere energía directamente al oxígeno molecular, generando oxígeno singlete (1O_2), altamente citotóxico. Imagen tomada de (Calixto, Bernegossi, de Freitas, Fontana, & Chorilli, 2016).

Dependiendo de la intensidad del daño oxidativo y la localización del fotosensibilizador en la célula, la TFD puede activar diferentes rutas de muerte celular; en muchos casos induce apoptosis a través de la vía mitocondrial, promoviendo la liberación de citocromo c y la activación de caspasas que culminan en la fragmentación controlada de la célula (Castano, Mroz, & Hamblin, 2006). En otros contextos, especialmente con altas concentraciones de ROS o daño celular severo, la TFD puede inducir necrosis, la cual es caracterizada por la pérdida de integridad de la membrana plasmática y la liberación de contenido citoplasmático al microambiente tumoral (Kessel & Luo, 1998). También se ha descrito la activación de la autofagia como un mecanismo de respuesta celular a la TFD, en el que la célula intenta degradar componentes dañados para sobrevivir, aunque en algunos casos esto puede llevar a la autodestrucción celular (Reiners, Agostinis, Berg, Oleinick, & Kessel, 2010).

Además de sus efectos citotóxicos directos, la TFD modula la respuesta inmune del organismo; se ha observado que induce la liberación de DAMPs (danger-associated molecular patterns), lo que promueve la activación de células presentadoras de antígenos y la infiltración de linfocitos en el tumor, favoreciendo una respuesta inmunitaria antitumoral; esta propiedad hace que la TFD tenga potencial no solo como un tratamiento localizado, sino también como un modulador del microambiente tumoral que podría potenciar la acción de otras terapias oncológicas. (Garg, et al., 2010).

La eficacia de la TFD depende de varios factores, entre ellos la selectividad del fotosensibilizador, la longitud de onda de la luz utilizada y la disponibilidad de oxígeno en el tejido; uno de los principales desafíos en su aplicación clínica es la hipoxia tumoral, ya que los niveles reducidos de oxígeno pueden limitar la formación de ROS y, por ende, la

efectividad del tratamiento. Estrategias como el uso de portadores de oxígeno, combinaciones con agentes que modulan la hipoxia y el desarrollo de fotosensibilizadores de segunda y tercera generación han sido propuestas para mejorar su efectividad en entornos hipóxicos (Henderson, et al., 1985).

La capacidad de la TFD para inducir múltiples formas de muerte celular y modular la respuesta inmunológica la convierte en una alternativa atractiva para el tratamiento del cáncer, sin embargo, su éxito clínico depende de la optimización de sus parámetros y de la comprensión de los mecanismos celulares involucrados, lo que sigue siendo un área activa de investigación (Allison & Moghissi, 2013).

Fotosensibilizadores y sus mecanismos de acción

Los fotosensibilizadores (PS, photosensitizers) son el pilar fundamental de la TFD, ya que su activación mediante luz de una longitud de onda específica genera ROS desencadenando estrés oxidativo y muerte celular en tejidos tumorales (Zhao, et al., 2024). Estos compuestos han evolucionado desde la primera hasta la tercera generación con el objetivo de mejorar su solubilidad, selectividad y eficiencia fotodinámica (Aebisher, Przygórzewska, & Bartusik-Aebisher, 2024).

Los PS de primera generación, como el porfímero sódico (Photofrin®), fueron los primeros en ser aprobados para uso clínico y están basados en derivados de hematoporfirina; sin embargo, su limitada solubilidad y su acumulación prolongada en tejidos sanos generan efectos adversos como fotosensibilidad cutánea (Kwiatkowski, y otros, 2018). En respuesta a estas limitaciones, los PS de segunda generación, como la clorina e6 y las ftalocianinas, fueron desarrollados con estructuras químicas más definidas, lo que les confiere mejor absorción de luz cercano al rojo lejano (600–800 nm) y mayor eficiencia en la generación de $^1\text{O}_2$ (Kubrak, et al., 2022).

Los PS de tercera generación han sido diseñados para mejorar su biodistribución y acumulación en tejidos tumorales mediante estrategias de direccionamiento molecular; estos incluyen conjugados con anticuerpos, péptidos y nanopartículas que facilitan la localización específica del fármaco en el tumor, minimizando su efecto en células sanas (Zhao, et al., 2024). Un enfoque innovador en esta generación es el uso de nanopartículas que encapsulan los PS, aumentando su estabilidad y permitiendo su activación en condiciones de hipoxia tumoral, lo cual supera una de las principales limitaciones de la TFD (Mariño-Ocampo, et al., 2023).

En la actualidad los PS continúan siendo optimizados para mejorar su especificidad y respuesta terapéutica; la combinación de la TFD con estrategias como la liberación controlada de fármacos y la inmunoterapia ha demostrado ser prometedora para potenciar su eficacia antitumoral (Mariño-Ocampo, et al., 2023). Con el desarrollo continuo de PS de tercera generación y el uso de plataformas nanotecnológicas, la TFD se perfila como una herramienta cada vez más precisa y eficiente en la oncología clínica (Zhao, et al., 2024).

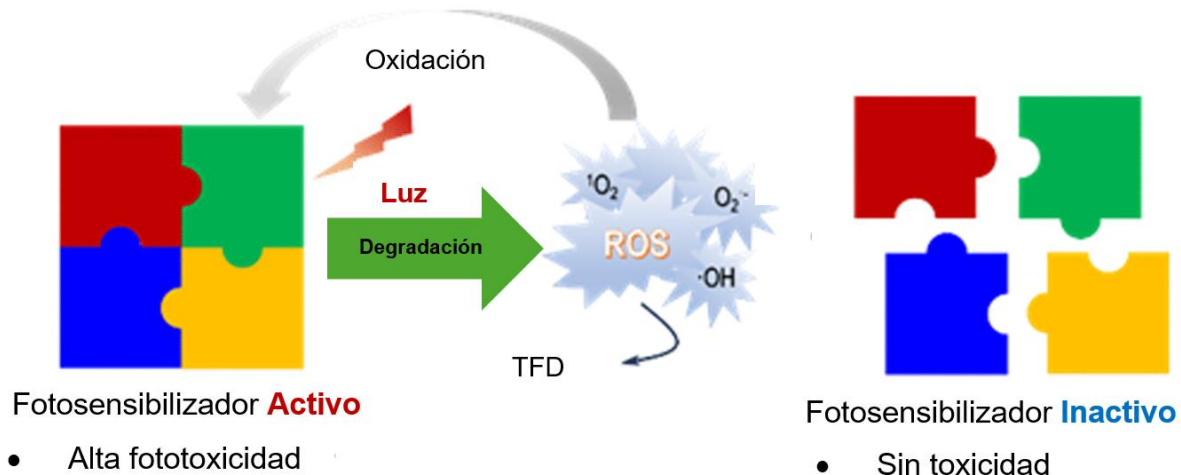


Figura 16. Mecanismo de activación de fotosensibilizadores en terapia fotodinámica (TFD). Mientras el fotosensibilizador (PS) permanece inactivo, no es tóxico y no genera daño en los tejidos. Al ser activado por la luz, el PS induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como oxígeno singlete (1O_2) y radicales hidroxilo ($\cdot OH$), desencadenando citotoxicidad selectiva en las células tumorales. Posteriormente, la degradación del PS reduce su toxicidad y minimiza los efectos secundarios en tejidos sanos. Imagen tomada y modificada de (Wu, Zhang, Jiang, & Huang, 2025).

AICIPc como fotosensibilizador

El cloroaluminio ftalocianina (AICIPc) es un fotosensibilizador de segunda generación ampliamente utilizado en TFD debido a su alta absorción en el espectro de 650 a 700 nm, lo que permite una penetración profunda en los tejidos y minimiza la fototoxicidad en células sanas (Calori & Tedesco, 2016). Su mecanismo de acción en TFD implica la generación de ROS, como el oxígeno singlete (1O_2), que inducen estrés oxidativo en células tumorales, lo que puede desencadenar apoptosis, necrosis o autofagia según la intensidad del tratamiento (Giannakopoulos, Katopodi, Rallis, Politopoulos, & Alexandratou, 2024).

A pesar de sus ventajas, la hidrofobicidad del AICIPc limita su solubilidad en medios acuosos, lo que puede reducir su eficacia en TFD al favorecer su agregación y disminuir la producción de ROS (Carobeli, et al., 2021). Para mejorar su biodisponibilidad, se han desarrollado formulaciones basadas en liposomas y nanopartículas, lo que permite una mejor estabilidad del fotosensibilizador y una mayor captación en células tumorales (Mariño-Ocampo, et al., 2023). Estudios han demostrado que la encapsulación de AICIPc en vesículas lipídicas facilita su disociación en su forma monomérica activa y potencia su actividad fotodinámica (Calori & Tedesco, 2016).

La localización intracelular del AICIPc es un factor clave en su mecanismo de acción; se ha observado que se acumula preferentemente en membranas celulares, mitocondrias y lisosomas, donde la producción de ROS genera daño estructural y activa vías de muerte celular (Giannakopoulos, Katopodi, Rallis, Politopoulos, & Alexandratou, 2024). En células cancerosas, la activación del AICIPc mediante irradiación con luz roja induce daño oxidativo en la membrana mitocondrial, promoviendo la liberación de citocromo c y la activación de caspasas, lo que lleva a la apoptosis (Carobeli, et al., 2021).

Investigaciones recientes han mostrado que la combinación de AICIPc con nanomateriales mejora su estabilidad y su selectividad hacia tejidos tumorales, en particular, la conjugación con nanopartículas metálicas o poliméricas permite una mayor captación en el microambiente tumoral, reduciendo su eliminación sistémica y mejorando la eficiencia terapéutica (Mariño-Ocampo, et al., 2023). Con estos avances, la optimización de formulaciones basadas en AICIPc sigue siendo un área clave en la investigación biomédica para potenciar su uso clínico en TFD (Giannakopoulos, Katopodi, Rallis, Politopoulos, & Alexandratou, 2024).

Uso de la TFD en cáncer de pulmón

La TFD ha demostrado ser una opción efectiva en el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas, especialmente en pacientes con tumores endobronquiales o en aquellos que no son candidatos a cirugía o radioterapia convencional (Shafirstein, et al., 2016).

El uso de broncoscopia en la TFD ha sido clave para mejorar la precisión en la administración de la luz láser en lesiones endobronquiales superficiales menores de 1 cm de grosor; a través de la fibra óptica insertada en el broncoscopio se puede localizar la irradiación en las lesiones malignas, minimizando el daño a los tejidos circundantes y mejorando los resultados clínicos (Sun, et al., 2024). En estudios clínicos, la TFD aplicada mediante broncoscopia ha mostrado tasas de respuesta completa en pacientes con lesiones endoluminales tempranas, proporcionando una mejora significativa en la función respiratoria y una reducción en la obstrucción bronquial (Usuda, et al., 2006).

A nivel experimental, se han explorado nuevas estrategias para mejorar la eficacia de la TFD en cáncer de pulmón; la broncoscopia de navegación electromagnética ha permitido administrar la TFD en tumores periféricos difíciles de alcanzar, ampliando su aplicabilidad más allá de las lesiones endobronquiales (Fig. 17) (Usuda, et al., 2020). Asimismo, la combinación de TFD con otras modalidades terapéuticas, como la inmunoterapia y la quimioterapia, ha mostrado potencial en la potenciación de la respuesta antitumoral, mejorando la eficacia global del tratamiento (Kim & Chang, 2023).

En la práctica clínica, la TFD continúa evolucionando con el desarrollo de nuevas técnicas y fotosensibilizadores que buscan optimizar su seguridad y efectividad en el manejo del cáncer de pulmón; su combinación con técnicas broncoscópicas avanzadas y su integración en tratamientos multimodales han consolidado su rol como una alternativa viable en el tratamiento de pacientes seleccionados (Steinfort & Herth, 2020).

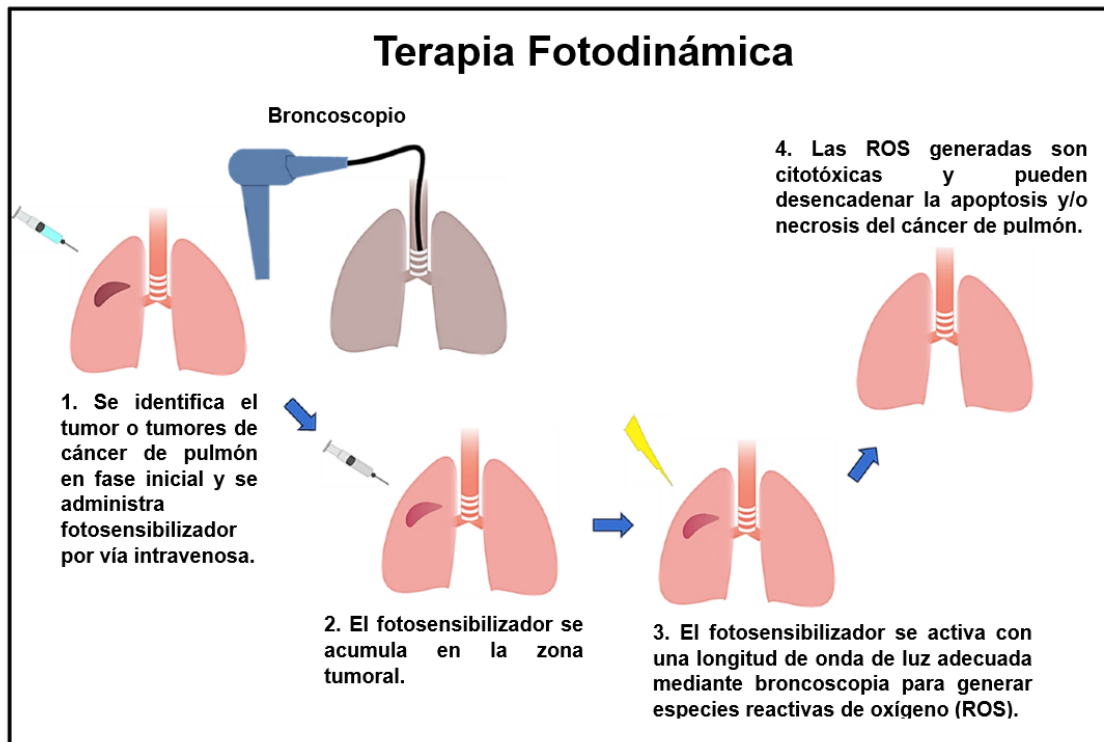


Figura 17. Proceso de aplicación de la terapia fotodinámica (TFD) en cáncer de pulmón. 1) Se identifica un tumor pulmonar en etapa temprana y se administra el fotosensibilizador por vía intravenosa. 2) El fotosensibilizador se acumula selectivamente en el sitio tumoral. 3) A través de un broncoscopio, se expone el tumor a una fuente de luz con una longitud de onda específica, lo que activa el fotosensibilizador y genera especies reactivas de oxígeno (ROS, reactive oxygen species). 4) Los ROS inducen citotoxicidad, promoviendo la muerte celular apoptótica y/o necrótica en las células tumorales. Imagen tomada y modificada de (La'ah & Chiou, 2024).

Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la TFD y su impacto en la muerte celular

La TFD basa su efectividad en la generación de ROS, que inducen daño celular y la posterior muerte de células tumorales; este proceso se inicia con la activación del PS por luz de una longitud de onda específica, llevando al PS a un estado excitado que permite la transferencia de energía a moléculas de oxígeno, a partir de esta activación pueden ocurrir dos mecanismos distintos: el mecanismo tipo I, donde se generan radicales libres altamente reactivos, como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}); y el mecanismo tipo II, donde se produce oxígeno singlete (1O_2), una forma altamente citotóxica de oxígeno molecular (Fig. 18) (Sai, Lee, Nguyen, & Kim, 2021).

La capacidad de los ROS generados por la TFD para inducir muerte celular depende de varios factores, como la localización intracelular del PS, la concentración de oxígeno y la intensidad de la irradiación; en términos generales, la producción de ROS provoca daño a biomoléculas esenciales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que desencadena procesos de apoptosis, necrosis y autofagia en las células tumorales (Dąbrowski & Arnaut, 2015). En particular, el estrés oxidativo generado por la TFD compromete la integridad mitocondrial, lo que puede activar la vía intrínseca de apoptosis

mediante la liberación de citocromo c y la activación de caspasas efectoras (Castano, Mroz, & Hamblin, 2006).

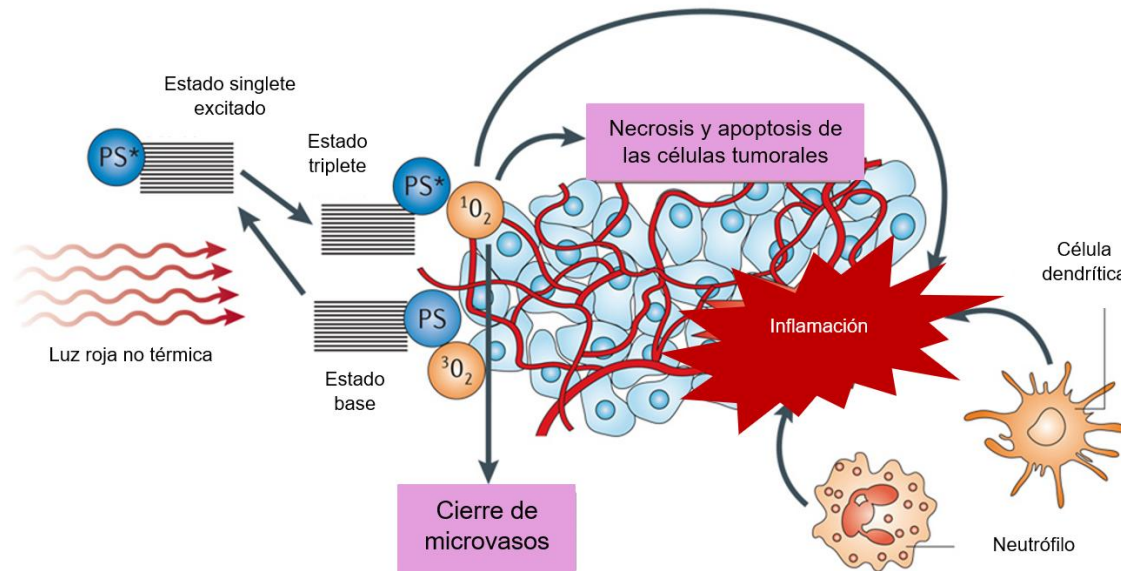


Figura 18. Esquema del mecanismo de acción de la terapia fotodinámica (TFD). El fotosensibilizador (PS) absorbe la luz y transita a un estado excitado singlete, seguido de una conversión al estado triplete. En esta fase, el PS transfiere energía al oxígeno molecular en estado triplete (3O_2), generando oxígeno singlete (1O_2), una especie altamente reactiva que induce la muerte celular por necrosis y/o apoptosis. Además, la TFD provoca la destrucción de la vasculatura tumoral y una respuesta inflamatoria aguda, facilitando el reclutamiento de células inmunitarias como neutrófilos y células dendríticas. Imagen tomada y modificada de (Castano, Mroz, & Hamblin, 2006).

Sin embargo, la efectividad de la TFD puede verse limitada por la hipoxia del microambiente tumoral, ya que el oxígeno es un componente esencial en la generación de ROS. Para superar esta limitación, se han desarrollado estrategias que optimizan la producción de ROS mediante el diseño de PSs con mayor afinidad por el oxígeno o mediante el uso de sistemas de liberación de oxígeno en el sitio tumoral; además, la inhibición del sistema antioxidante de las células tumorales, como la reducción de los niveles de glutatión (GSH), ha demostrado aumentar la eficacia de la TFD al potenciar la acumulación de ROS y promover un daño irreversible en las células malignas (Ming, Cheng, Chen, Yang, & Chen, 2021).

La modulación del microambiente tumoral y el desarrollo de estrategias para incrementar la generación de ROS han permitido mejorar la eficacia de la TFD en el tratamiento del cáncer, optimizando su capacidad para inducir daño selectivo en células tumorales sin afectar tejidos sanos (Sai, Lee, Nguyen, & Kim, 2021).

Papel de la señalización de calcio en la TFD

La efectividad de la TFD no se limita únicamente a la producción de ROS, ya que la señalización del calcio juega un papel crucial en la modulación de la respuesta celular y en la propagación del daño en células tumorales y sus vecinas (Yang, Chang, Zhang, & Gao F, 2023).

El Ca^{2+} es un mensajero intracelular esencial que participa en múltiples procesos celulares, incluyendo la activación de rutas apoptóticas y la disrupción de la homeostasis celular; tras la TFD, se ha observado un aumento en la concentración citosólica de Ca^{2+} , que puede originarse tanto por la entrada desde el medio extracelular como por la liberación desde depósitos internos como el retículo endoplásmico y las mitocondrias; este incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular ha sido vinculado con la apertura de los poros de transición de permeabilidad mitocondrial, facilitando la liberación de citocromo c y la activación de caspasas, favoreciendo la apoptosis (Wu R. , Chu, Kwok, & Huang, 2023).

Diferentes fotosensibilizadores pueden inducir respuestas variables en la homeostasis del Ca^{2+} , dependiendo de su localización celular; por ejemplo, los fotosensibilizadores dirigidos a la mitocondria pueden inducir una liberación masiva de Ca^{2+} desde este orgánulo, exacerbando el estrés oxidativo y desencadenando apoptosis rápida; por otro lado, aquellos que se acumulan en el retículo endoplásmico pueden afectar la bomba SERCA, reduciendo la recaptación de Ca^{2+} y contribuyendo a la sobrecarga citosólica (Hoorelbeke, Decrock, Van Haver, De Bock, & Leybaert, 2018).

Además de su papel en la apoptosis, el Ca^{2+} también está implicado en la propagación del efecto bystander tras la TFD; se ha sugerido que los cambios en los niveles de Ca^{2+} pueden transmitirse a células vecinas a través de canales de conexina y la liberación de ATP, amplificando el daño más allá de las células expuestas directamente a la TFD; este mecanismo puede potenciar la eficacia del tratamiento al inducir la muerte de células tumorales no iluminadas, pero también podría contribuir a efectos adversos si se afectan tejidos sanos circundantes (Wu R. , Chu, Kwok, & Huang, 2023).

La modulación de la señalización del Ca^{2+} podría representar una estrategia terapéutica para optimizar la TFD; estudios recientes han sugerido que la sensibilización de las células tumorales a la TFD mediante la regulación de los niveles de Ca^{2+} intracelular puede mejorar la respuesta al tratamiento; por ejemplo, el uso de fármacos que aumentan la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico o que bloquean su eliminación por mitocondrias podría potenciar la apoptosis inducida por la TFD (Yang, Chang, Zhang, & Gao F, 2023).

LÍNEA CELULAR A549

Origen y características de la línea celular A549

Número ATCC: CCL-185

Designación: A549

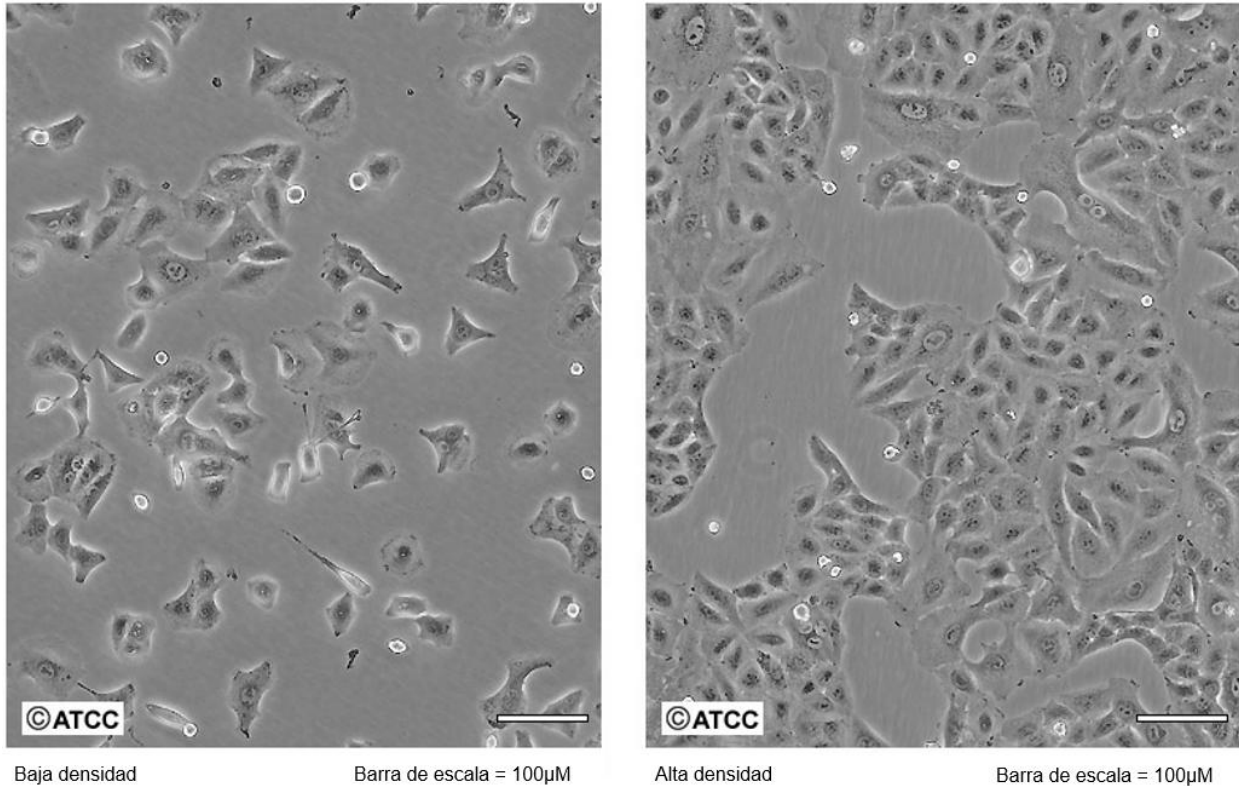


Figura 19. Micrografías de la línea celular A549 en cultivo a diferentes densidades. A la izquierda, células A549 en baja densidad, mostrando una morfología epitelial dispersa. A la derecha, células A549 en alta densidad, formando una monocapa más confluyente. Barra de escala = 100 µm. Imagen tomada de (American Type Culture Collection (ATCC), s.f.).

La línea celular A549 fue establecida en 1972 a partir de tejido pulmonar de un paciente masculino de 58 años diagnosticado con adenocarcinoma pulmonar (American Type Culture Collection (ATCC), s.f.). Estas células se derivan de neumocitos tipo II y han sido ampliamente utilizadas como modelo in vitro en estudios sobre cáncer de pulmón y biología pulmonar (Swain, Kemp, Goldstraw, Tetley, & Stevens, 2010).

Las células A549 presentan una morfología epitelial y crecen de manera adherente, formando monocapas en condiciones de cultivo in vitro (Fig. 19); se caracterizan por ser hipotriploides, con un número modal de cromosomas de 66 en aproximadamente el 24% de las células analizadas, aunque también se han observado otras variantes con 64, 65 y 67 cromosomas (American Type Culture Collection (ATCC), s.f.). Esta línea celular mantiene la capacidad de sintetizar fosfolípidos esenciales para la producción de surfactante pulmonar, utilizando la vía de la citidina difosfocolina (Swain, Kemp, Goldstraw, Tetley, & Stevens, 2010).

Desde su establecimiento, la línea A549 se ha convertido en un modelo de referencia en la investigación biomédica, especialmente en estudios sobre la toxicidad de compuestos inhalados, metabolismo de fármacos y desarrollo de terapias dirigidas contra el cáncer de pulmón (Sundararajan, et al., 2014). Además, estas células contienen cuerpos multilamelares en su citoplasma, una característica de los neumocitos tipo II, responsables de la producción de surfactante pulmonar (Swain, Kemp, Goldstraw, Tetley, & Stevens, 2010).

A pesar de compartir algunas características con los neumocitos tipo II, se ha cuestionado su idoneidad como modelo exacto de estas células debido a diferencias en la expresión de ciertos marcadores específicos y en sus propiedades de barrera epitelial, no obstante, su facilidad de cultivo y su estabilidad genética han permitido su uso extensivo en estudios de señalización celular, viabilidad y respuesta a tratamientos oncológicos (Sundararajan, et al., 2014).

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y representa un reto significativo en la investigación oncológica debido a su alta agresividad, resistencia a los tratamientos convencionales y baja tasa de supervivencia en estadios avanzados. Dentro de las estrategias terapéuticas emergentes, la terapia fotodinámica (TFD) ha demostrado ser una alternativa prometedora, ya que combina la acción de un fotosensibilizador con la irradiación de luz para generar especies reactivas de oxígeno (ROS), induciendo muerte celular selectiva en células tumorales.

Uno de los elementos clave en la regulación de la respuesta celular a la TFD es el calcio (Ca^{2+}), un segundo mensajero fundamental que participa en múltiples procesos celulares, incluyendo la proliferación, apoptosis y necrosis. La alteración en la homeostasis del calcio es una característica distintiva de las células tumorales y ha sido relacionada con mecanismos de resistencia a la muerte celular. En este contexto, las conexinas, proteínas de unión intercelular que forman canales de comunicación tipo gap junctions, desempeñan un papel crucial en la propagación de señales de Ca^{2+} entre células adyacentes, lo que podría influir en la respuesta del tumor a la TFD y en el efecto bystander, una propagación del daño que puede potenciar o limitar la eficacia del tratamiento.

La línea celular A549, derivada de un adenocarcinoma pulmonar humano, es ampliamente utilizada en la investigación del cáncer de pulmón debido a sus características morfológicas y funcionales. Este modelo *in vitro* permite evaluar la dinámica del calcio y el papel de las conexinas en la respuesta a la TFD, proporcionando información valiosa sobre los mecanismos que regulan dicha estrategia terapéutica.

Comprender cómo la comunicación intercelular influye en la respuesta tumoral permitirá proponer estrategias para maximizar el daño selectivo en células malignas, minimizando el impacto en tejidos sanos. Por lo tanto, este estudio contribuye a la búsqueda de enfoques terapéuticos más eficaces para el tratamiento del cáncer de pulmón, con el potencial de mejorar la respuesta a la TFD y su aplicación en el ámbito clínico.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La alta tasa de mortalidad en el cáncer de pulmón se debe en gran medida al diagnóstico tardío y a la resistencia que desarrollan las células tumorales frente a los tratamientos convencionales. A pesar de los avances en la cirugía, quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia, la supervivencia de los pacientes sigue siendo baja, especialmente en estadios avanzados de la enfermedad. Esto ha impulsado la búsqueda de estrategias terapéuticas alternativas que mejoren la eficacia del tratamiento y reduzcan los efectos adversos en los tejidos sanos.

La terapia fotodinámica (TFD) ha emergido como una opción prometedora, ya que permite la eliminación selectiva de células tumorales mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tras la activación de un fotosensibilizador por luz de una longitud de onda específica. Por lo que, es fundamental comprender los mecanismos celulares que regulan la respuesta de las células tumorales a la TFD para optimizar su aplicación y mejorar sus resultados clínicos.

Actualmente, no se ha definido con precisión cómo la interacción entre la señalización de calcio y las conexinas influye en la respuesta de las células tumorales a la TFD. En particular, en la línea celular A549, modelo ampliamente utilizado para estudiar el cáncer de pulmón, se desconoce el impacto que tienen estos mecanismos en la propagación del daño y en la eficacia del tratamiento. La falta de información sobre estos procesos representa una limitante en el diseño de estrategias que optimicen la TFD como alternativa terapéutica.

Por lo anterior, es necesario investigar cómo la señalización de calcio y la comunicación mediada por conexinas modulan la respuesta de las células A549 debida a la TFD, para contribuir al desarrollo de terapias coadyuvantes contra el cáncer de pulmón.

HIPÓTESIS

La interacción entre las células tumorales A549, mediada por conexinas, regula la transmisión de señales que influyen en la respuesta a la terapia fotodinámica (TFD). En este proceso, el calcio (Ca^{2+}) actúa como un mediador esencial, facilitando la comunicación intercelular a través de las uniones gap. La alteración en la homeostasis del $(\text{Ca}^{2+})_i$ inducida por la TFD modula la propagación del daño mediante el efecto bystander, lo que podría potenciar la muerte celular y aumentar la eficacia del tratamiento en cáncer de pulmón.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto de la comunicación intercelular mediada por conexinas en la transmisión de señales de calcio (Ca^{2+}) y su influencia en la muerte celular inducida por la terapia fotodinámica (TFD) en la línea celular tumoral A549, con el fin de comprender cómo estos mecanismos modulan la eficacia del tratamiento en cáncer de pulmón.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la presencia de las conexinas 26, 32, 43 y 46 en las células A549 mediante inmunofluorescencia indirecta, evaluando su localización y expresión basal.
2. Analizar la transmisión de la señal de $(\text{Ca}^{2+})_i$ generada por la terapia fotodinámica (TFD) en las células A549 en condiciones normales y en ausencia de calcio extracelular, evaluando la propagación de la señal a las células adyacentes.
3. Analizar la participación de las conexinas en la transmisión de la señal de $(\text{Ca}^{2+})_i$ generada por la TFD mediante bloqueo farmacológico con ácido flufenámico (AFF), evaluando su efecto en la propagación de la señal.
4. Evaluar el tipo de muerte celular inducida por la TFD en las células A549, determinando la proporción de apoptosis y necrosis mediante el uso de Anexina V-FITC y yoduro de propidio.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cultivo celular

Las células de la línea A549, derivadas de un adenocarcinoma pulmonar humano, fueron cultivadas en frascos T25 bajo condiciones controladas. El medio utilizado fue DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB) para proporcionar factores de crecimiento y nutrientes esenciales. Adicionalmente, se incorporó un 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina) para prevenir contaminaciones microbianas. Los cultivos se mantuvieron en un ambiente de incubación a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ para favorecer un pH fisiológico estable.

2. Preparación de solución extracelular

Para los experimentos de TFD, TFD con bloqueo farmacológico (TFD + AFF) y la determinación de muerte celular, se preparó una solución extracelular, adecuada para mantener la viabilidad de las células durante la adquisición de imágenes por microscopía confocal. La solución fue preparada utilizando reactivos de grado analítico, conforme a las concentraciones descritas en la Tabla 1. Todos los componentes fueron disueltos en agua desionizada y el pH fue ajustado a 7.4 utilizando NaOH o HCl. Adicionalmente, se midió la osmolaridad de la solución final, asegurando que se encontrara dentro de un rango fisiológico entre 290 y 310 mOsm/kg. La solución se preparó fresca antes de cada experimento.

Reactivo	Peso molecular (g/mol)
NaCl	58.44
Dextrosa	180.16
KCl	74.55
HEPES	238.30
CaCl ₂	110.98
MgCl ₂	95.21

Tabla 1. Composición de la solución extracelular utilizada en los experimentos de TFD, TFD + AFF y evaluación de muerte celular en células A549.

3. Determinación de la presencia de conexinas en la línea celular A549 por inmunofluorescencia indirecta

Para evaluar la expresión basal de distintas isoformas de conexinas en la línea celular A549, se realizó inmunofluorescencia indirecta utilizando cubreobjetos redondos de 12 mm previamente sembrados con células. Inicialmente, las muestras se lavaron con DPBS 1X durante 5 minutos con el fin de eliminar residuos del medio de cultivo. Posteriormente, las células se fijaron añadiendo 100 a 120 µL de paraformaldehído (PFA) al 4% y se dejaron incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación, se realizaron dos lavados consecutivos con PBS 1X y un tercer lavado con PBS-Tritón al 0.3%, cada uno con una duración de 5 minutos, para lograr una adecuada permeabilización de las membranas celulares.

Para bloquear uniones inespecíficas, se aplicaron 90 μ L de suero fetal bovino (SFB) al 10% y se incubaron las muestras durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS-Tritón al 0.3% durante 5 minutos cada uno. Las muestras se incubaron durante toda la noche en oscuridad con 90 μ L del anticuerpo primario correspondiente, diluido previamente en PBS-Tritón al 0.3%. Al día siguiente, se realizaron tres lavados más con PBS-Tritón al 0.3%, cada uno de 5 minutos, para eliminar el exceso de anticuerpo primario.

Posteriormente, se aplicaron 90 μ L del anticuerpo secundario fluorescente, también diluido en PBS-Tritón al 0.3%, e incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en completa oscuridad. Para complementar la visualización de las células, se procedió al marcaje del citoesqueleto con faloidina. Para ello, se preparó una solución 0.5X de faloidina, y se incubaron 90 μ L de esta solución en oscuridad.

Después del marcaje del citoesqueleto, se realizó un lavado adicional con PBS-Tritón al 0.3% durante 5 minutos, seguido por la contratinción nuclear utilizando DAPI.

Finalmente, se colocaron cuidadosamente 5 μ L de medio de montaje (DAKO) sobre cada muestra, que se conservaron a 4 °C protegidas de la luz hasta su observación mediante microscopía confocal. Las conexinas evaluadas incluyeron Cx26 (Abcam, Cat. No. 65969), Cx32 (anticuerpo anti-GJB1, host: rabbit), Cx43 (AB11370) y Cx46 (Invitrogen, Cat. No. 388300, Rabbit IgG).

4. Análisis de la transmisión de la señal de $(Ca^{2+})_i$ generada por la TFD en condiciones con y sin calcio extracelular

Se utilizó AICIPc como fotosensibilizador, disolviendo la cantidad requerida en DMSO a una proporción de 1 mL por cada 1.14 mg de compuesto. La mezcla fue homogeneizada mediante agitación en vórtex durante 2 minutos. La concentración final utilizada de AICIPc fue de 10 μ M.

Seguidamente, se llevó a cabo una primera incubación al aplicar una solución diluida de AICIPc, compuesta por 99 μ L de solución extracelular y 1 μ L de la solución stock de fotosensibilizador, sobre vidrios de cultivo de 12 mm de diámetro. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 1 hora.

Posteriormente, se realizó una segunda incubación empleando un cóctel compuesto por AICIPc, Fluo-4 FF AM (un fluoróforo que permite la detección de Ca²⁺ intracelular, con una concentración final de 10 μ M), ácido plurónico para mejorar la permeabilidad celular, y sulfinpirazona como inhibidor de eflujo. Esta mezcla se aplicó a los vidrios previamente tratados y se dejó incubar durante 1 hora adicional bajo condiciones estándar.

Tras la 2da incubación, las muestras se sometieron a microscopía confocal para llevar a cabo la fotoestimulación y la captura de imágenes. Se seleccionó un campo que contenía una célula central rodeada por otras células, estableciendo una región de interés (ROI) sobre esta célula específica, la cual fue estimulada de manera puntual. La adquisición de imágenes se llevó a cabo durante un periodo total de 15 minutos, con una fase de

adquisición continua de 16 segundos y una estimulación puntual de 983.4 milisegundos, permitiendo el monitoreo preciso de los cambios en la señal de calcio durante la TFD.

Los experimentos se llevaron a cabo en presencia y ausencia de Ca^{2+} en la solución extracelular para evaluar el papel de las conexinas en la propagación de la señal de $(\text{Ca}^{2+})_i$, manifestada como fluorescencia a través del Fluo-4. Finalmente, las imágenes capturadas se analizaron utilizando el software Image J para cuantificar y procesar de manera precisa las variaciones en la señal de fluorescencia.

5. Análisis de la participación de las conexinas en la transmisión de la señal de $(\text{Ca}^{2+})_i$ generada por la TFD mediante bloqueo farmacológico

Para evaluar la participación de las conexinas en la propagación de la señal de calcio inducida por la TFD, se realizó un bloqueo farmacológico de las *gap junctions* mediante la aplicación de ácido flufenámico (AFF). La solución del bloqueador se preparó disolviendo AFF en solución extracelular para obtener una concentración final de 100 μM , asegurando su homogeneización mediante agitación en vórtex.

Una vez aplicada la fotoestimulación puntual utilizando los parámetros previamente establecidos, las células fueron incubadas con AFF durante 20 minutos, tras lo cual se repitió la fotoestimulación para analizar el efecto del bloqueo en la propagación de la señal de $(\text{Ca}^{2+})_i$. Posteriormente, se realizó un lavado con solución extracelular sin bloqueador y se permitió un periodo de recuperación celular de 20 minutos, seguido de una tercera fotoestimulación para evaluar si la señal de calcio recuperaba su propagación original tras la eliminación del inhibidor.

El análisis de las imágenes obtenidas se realizó con el software Image J, comparando la propagación de la señal de Ca^{2+} antes, durante y después del bloqueo de las conexinas.

6. Determinación del tipo de muerte celular generada por la TFD

Las células fueron tratadas con AICIPc disuelto en DMSO, utilizando una proporción de 1 mL de DMSO por cada 1.14 mg de fotosensibilizador. La mezcla fue homogeneizada mediante vórtex durante 2 minutos. La concentración final utilizada de AICIPc fue de 10 μM . La solución diluida de AICIPc, compuesta por 99 μL de solución extracelular y 1 μL de la solución stock, se aplicó sobre vidrios de cultivo de 12 mm de diámetro, incubándose a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO_2 durante 1 hora.

Posteriormente, tras retirar la solución de la primera incubación, se añadió un cóctel que contenía AICIPc, sulfinpirazona y ácido plurónico en solución extracelular. Este cóctel fue incubado con las células durante 1 hora adicional bajo las mismas condiciones, con el fin de mejorar la permeabilidad celular y potenciar la efectividad del fotosensibilizador.

Finalizada esta etapa, las muestras fueron trasladadas a un microscopio confocal, donde se realizó una fotoestimulación puntual utilizando los parámetros previamente establecidos. Este procedimiento permitió activar el fotosensibilizador, desencadenando los efectos de la TFD en las células.

Posterior a la fotoestimulación, las células fueron incubadas durante 10 minutos con una solución de Anexina V-FITC y yoduro de propidio (IP) para evaluar la viabilidad celular mediante marcadores fluorescentes. Se procedió a la captura de imágenes utilizando microscopía confocal con la técnica de z-stack, lo que permitió obtener múltiples planos focales para un análisis detallado de las células. Las imágenes se capturaron en intervalos de 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 3 horas después de la estimulación. Antes de cada intervalo de captura, las células fueron nuevamente incubadas con la solución de Anexina V-FITC y IP durante 10 minutos para garantizar una detección precisa de los cambios en la viabilidad celular.

7. Características de los reactivos y criterios de análisis

	Aplicación experimental	λ de excitación (nm)	λ de emisión (nm)	Peso molecular (g/mol)	Mecanismo de acción
Fluo-4 AM	Detección de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$)	494	516	1118.89	Se une a Ca^{2+} libre en el citoplasma, aumentando su fluorescencia
AICIPc	Fotosensibilizador para terapia fotodinámica (TFD)	640	685	577.96	Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) al activarse con luz, induciendo muerte celular
Anexina V – FITC	Marcador de células en etapa temprana de apoptosis	488	519	Variable (conjugado)	Se une a fosfatidilserina expuesta en la membrana externa durante la apoptosis
Yoduro de Propidio (IP)	Marcador de células con membrana plasmática comprometida (necrosis)	581	617	668.4	Intercalación en el ADN de células con membrana comprometida; no atraviesa membranas intactas

Tabla 2. Propiedades ópticas, peso molecular y mecanismos de acción de los compuestos fluorescentes utilizados en este estudio. Se incluyen Fluo-4 AM, AICIPc, Anexina V-FITC y Yoduro de Propidio (IP). Se indican sus longitudes de onda (λ) de excitación y emisión, así como sus mecanismos de acción específicos en cada aplicación experimental.

	Aplicación experimental	Peso molecular (g/mol)	IC₅₀ (μM)	Mecanismo de acción
Ácido Flufenámico (AFF)	Bloqueo farmacológico de canales tipo gap (conexinas)	281.23	18.5	Inhibición de canales tipo gap formados por conexinas.

Tabla 3. Propiedades del ácido flufenámico (AFF). Se indica su aplicación experimental, peso molecular, concentración inhibitoria media (IC₅₀) y mecanismo de acción.

Anexina V	Yoduro de Propidio (IP)	Tipo de muerte celular
Positivo (+)	Positivo (+)	Necrosis
Positivo (+)	Negativo (-)	Apoptosis

Tabla 4. Interpretación de los patrones de tinción para la determinación del tipo de muerte celular.

RESULTADOS

Determinación de la presencia de conexinas en la línea celular A549 por inmunofluorescencia indirecta

Estos resultados permitieron visualizar el patrón de distribución de las conexinas en condiciones basales, lo que nos permite entender su posible papel en la comunicación intercelular y la señalización de calcio durante la terapia fotodinámica. A continuación, se muestran algunas imágenes representativas obtenidas mediante microscopía confocal. Se realizaron tres protocolos de inmunofluorescencia en diferentes pasajes celulares de la línea A459 y se identificó la presencia de Cx26, Cx32, Cx43 y Cx46. Cada protocolo se desarrolló por duplicado y en cada muestra se analizaron de tres a cuatro campos (Figura 20-23).

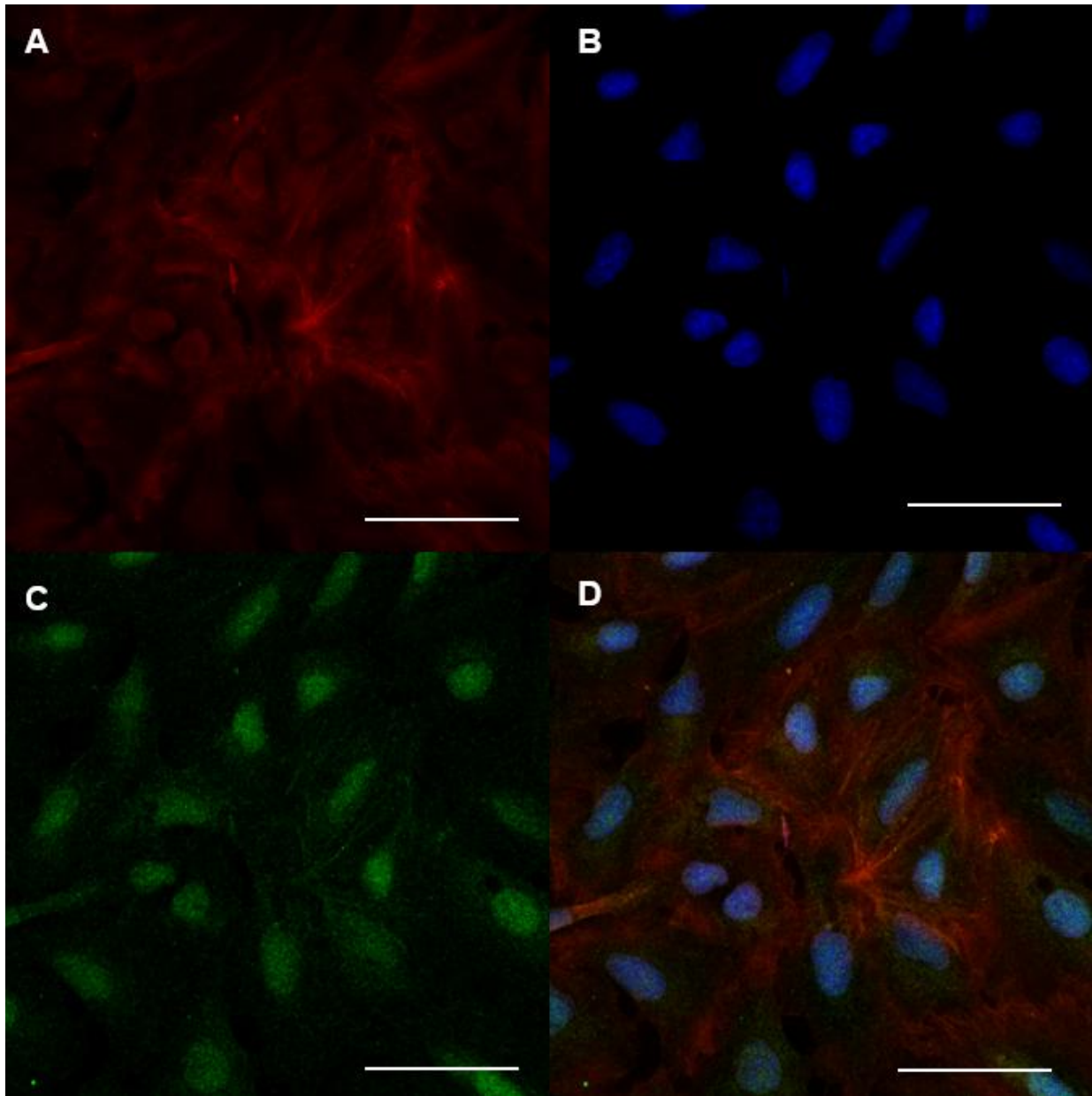


Figura 20. Inmunofluorescencia indirecta de conexina 26 (Cx26) en células A549. (A) La tinción con **faloidina** permitió delimitar el citoesqueleto de actina. (B) La tinción con **DAPI** marcó los núcleos celulares. (C) La señal correspondiente a **Cx26** se observa en el canal verde. (D). La imagen compuesta integra los tres canales, permitiendo visualizar la localización de Cx26, sin evidencia clara de acumulación en la membrana plasmática. Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo de 40X mediante microscopía confocal. Barra de escala 50 μm .

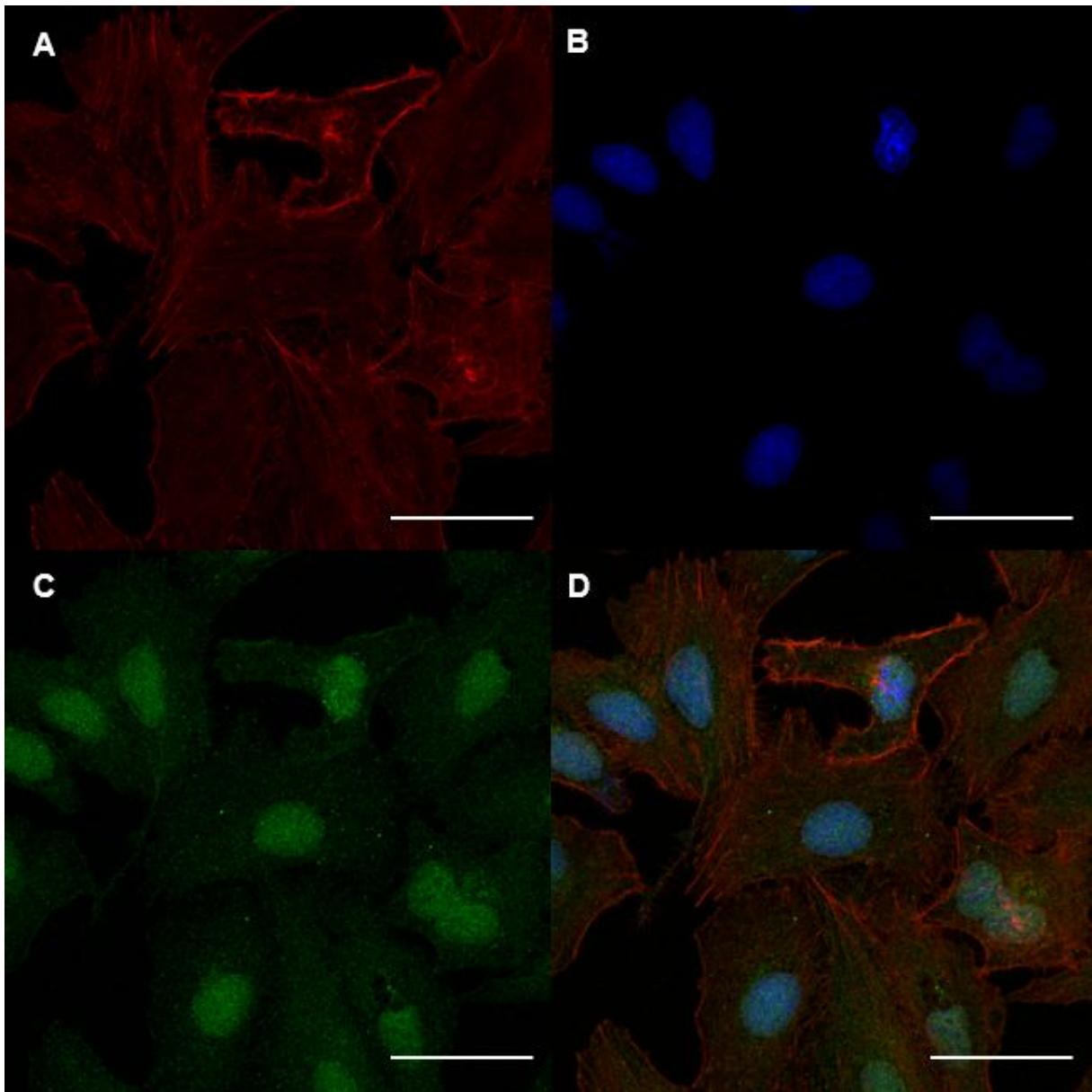


Figura 21. Inmunofluorescencia indirecta de conexina 32 (Cx32) en células A549. (A) La tinción con **faloïdina** permitió delimitar el citoesqueleto de actina. (B) La tinción con **DAPI** marcó los núcleos celulares. (C) La señal correspondiente a **Cx32** se observa en el canal verde. (D) La imagen compuesta integra los tres canales, permitiendo visualizar la localización de Cx32, sin evidencia clara de acumulación en la membrana plasmática. Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo de 40X mediante microscopía confocal. Barra de escala 50 μm .

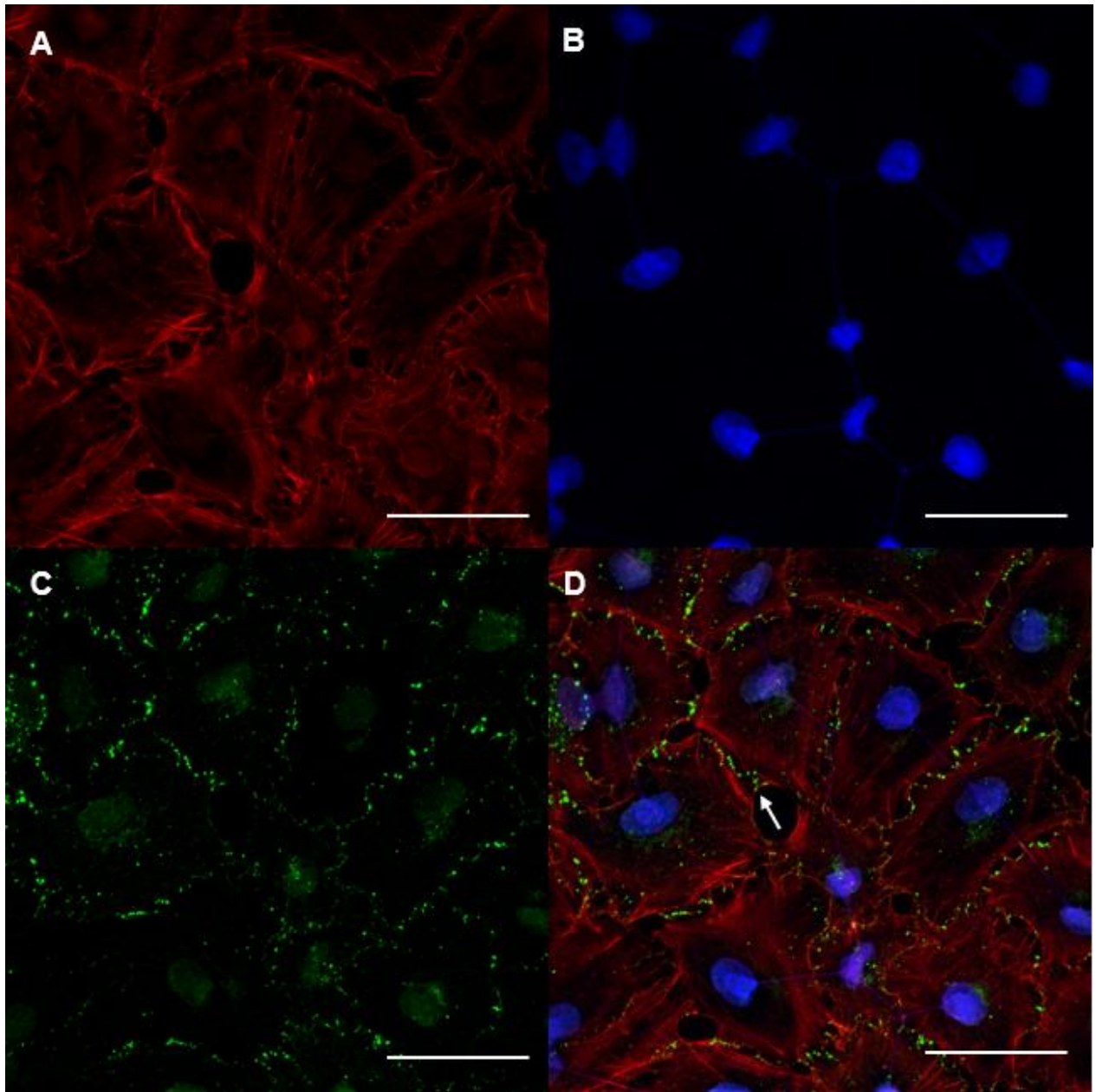


Figura 22. *Inmunofluorescencia indirecta de conexina 43 (Cx43) en células A549. (A) La tinción con **faloïdina** permitió delimitar el citoesqueleto de actina. (B) La tinción con **DAPI** marcó los núcleos celulares. (C) La señal correspondiente a **Cx43** se observa en el canal verde, evidenciando una localización predominante en la membrana plasmática. (D) La imagen compuesta integra los tres canales, mostrando una distribución clara de Cx43 en las regiones de contacto intercelular; en este panel se incluye una flecha que indica la presencia de Cx43 en dichas regiones, lo cual sugiere su participación en la formación de uniones tipo gap. Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo de 40X mediante microscopía confocal. Barra de escala 50 μ m.*

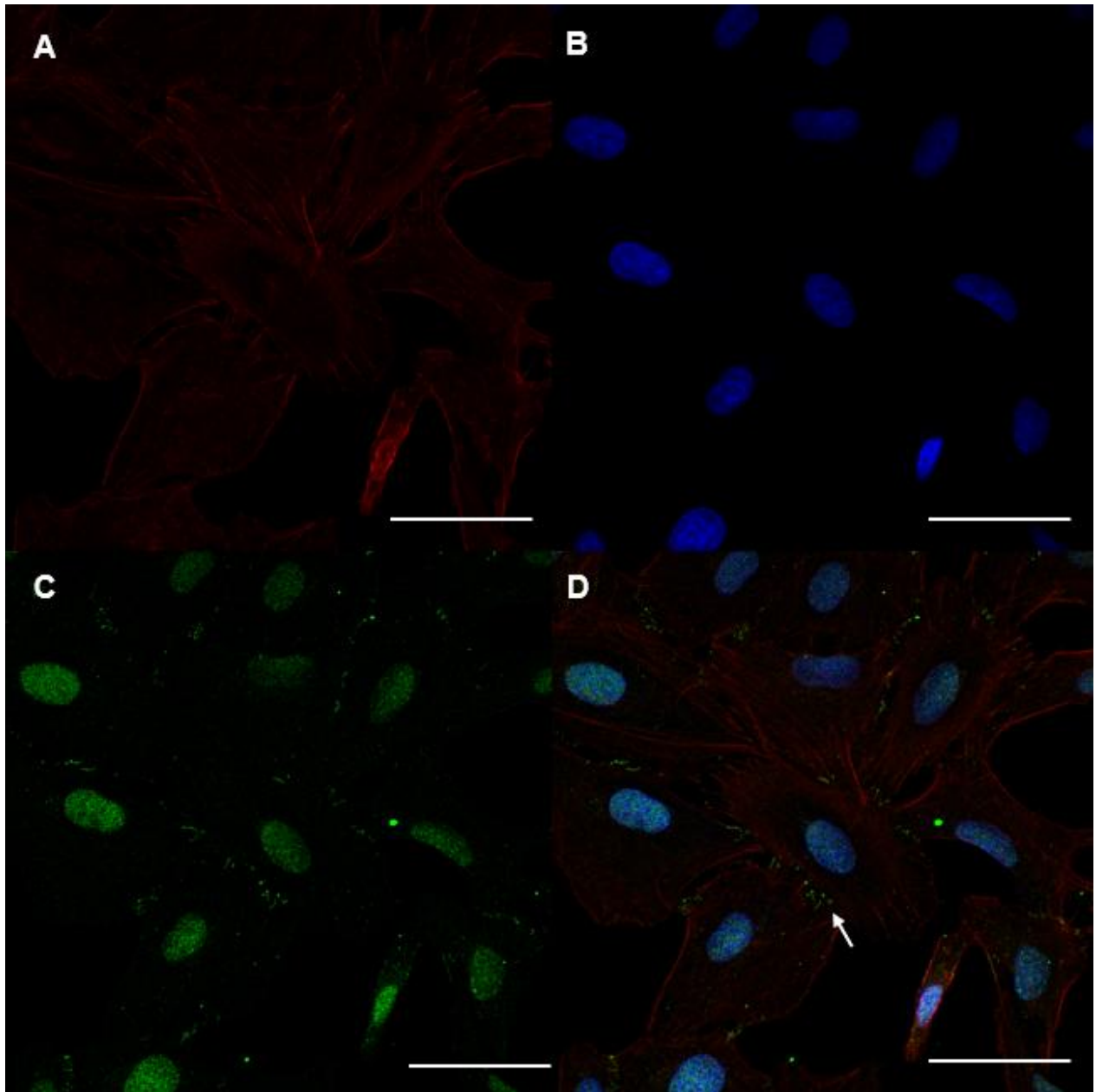


Figura 23. *Inmunofluorescencia indirecta de conexina 46 (Cx43) en células A549. (A) La tinción con **faloidina** permitió delimitar el citoesqueleto de actina. (B) La tinción con **DAPI** marcó los núcleos celulares. (C) La señal correspondiente a **Cx46** se observa en el canal verde, se detecta un marcaje tenue en membrana plasmática. (D) La imagen compuesta integra los tres canales, permitiendo visualizar la localización de Cx46 y su leve presencia en zonas de contacto intercelular; en este panel se incluye una flecha que señala la presencia de Cx46. Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo de 40X mediante microscopía confocal. Barra de escala 50 μ m.*

Con base en las imágenes obtenidas por inmunofluorescencia indirecta se observó que la línea celular A549 expresa diversas isoformas de conexas, cada una con un patrón de localización particular. La Cx26 (Figura 20) presentó una señal predominante a nivel nuclear y citoplasmático, sin marcaje evidente en membrana plasmática, al igual que la Cx 32 (Figura 21). La Cx43 (Figura 22) mostró un patrón de localización claramente asociado a la membrana plasmática, especialmente en las zonas de contacto entre

células, lo que sugiere su participación en la formación de uniones tipo gap. Finalmente, en la Cx46 (Figura 23) también se detectó su presencia en la membrana plasmática, aunque con una señal de menor intensidad en comparación con Cx43, utilizando la misma configuración confocal. Para evaluar su posible rol en el efecto bystander, se analizaron todas las imágenes obtenidas para cada conexina, y los datos se resumen en la Tabla 5. Esta tabla no solo señala el compartimento principal donde se localizó el marcaje, sino que también indica la probabilidad de que cada conexina participe en el efecto bystander.

	Presencia en A549	Localización principal	Marcaje en membrana	Probabilidad de participar en el efecto bystander
Cx 26	Sí	Citoplasma / núcleo	No evidente	Baja
Cx 32	Sí	Citoplasma / núcleo	No evidente	Baja
Cx 43	Sí	Membrana plasmática	Evidente	Alta
Cx 46	Sí	Membrana plasmática / núcleo	Difuso	Media

Tabla 5. Comparación de la expresión y localización celular de distintas isoformas de conexinas en la línea celular A549. La presencia de marcaje en membrana plasmática sugiere un posible rol en la formación de uniones tipo gap, lo que podría facilitar la propagación de señales intercelulares como el calcio durante la terapia fotodinámica (TFD), favoreciendo un efecto bystander asociado a muerte celular.

Análisis de la transmisión de la señal de $(Ca^{2+})_i$ generada por la TFD en condiciones con y sin calcio extracelular

Se llevaron a cabo experimentos comparativos en dos condiciones experimentales: un grupo tratado en solución extracelular con calcio y otro en solución libre de calcio. La señal de $(Ca^{2+})_i$ fue registrada mediante microscopía confocal y extrapolada a partir de los cambios en la fluorescencia del indicador Fluo-4 AM FF, permitiendo visualizar la dinámica intracelular de Ca^{2+} en respuesta a la fotoestimulación. Mediante microscopía confocal, se irradió una sola célula preincubada con el fotosensibilizador AICIPc utilizando un láser de 640 nm, localizado en una región de interés (ROI) durante 90 segundos. La adquisición de imágenes se realizó cada 16 segundos y la estimulación se aplicó cada 983.51 milisegundos. Posteriormente, se registró la respuesta tanto de la célula fotoestimulada como de ocho células adyacentes durante un periodo total de 15 minutos.

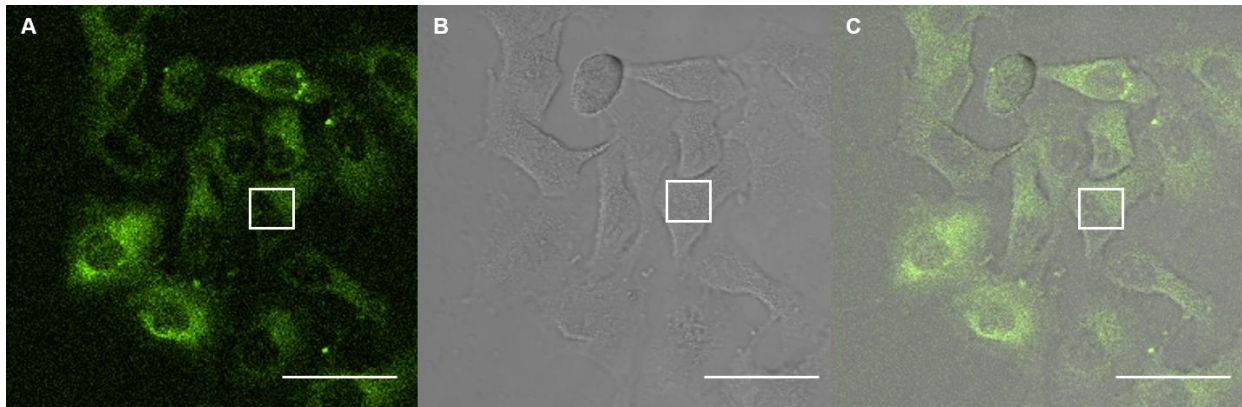


Figura 24. Disposición celular y selección de región de interés (ROI) antes de la fotoestimulación. Las células fueron cargadas con *Fluo-4* para monitorizar cambios en la intensidad de fluorescencia correspondientes a la señal de Ca^{2+} inducida por TFD. El recuadro indica la región de interés (ROI) seleccionada para la fotoestimulación puntual. (A) Canal FITC que muestra la fluorescencia de *Fluo-4*, (B) imagen en campo claro y (C) fusión de ambos canales. Las imágenes se adquirieron mediante microscopía confocal con un objetivo de 40X. Barra de escala: 50 μm .

TFD en A549 con Ca^{2+}

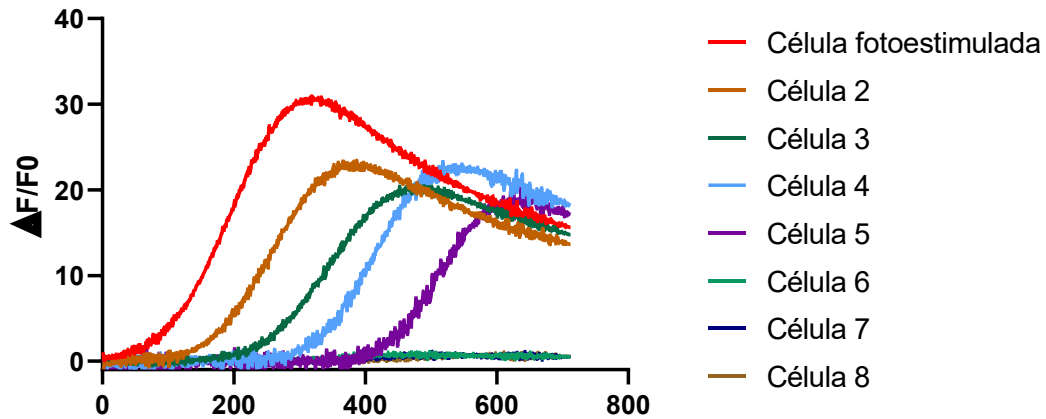


Figura 25. Curva de propagación de la señal de calcio ($\Delta F/F_0$) en células A549 durante la terapia fotodinámica (TFD) en solución extracelular con Ca^{2+} . La gráfica muestra la respuesta de la célula fotoestimulada y de las células adyacentes (2–8) a lo largo de 15 minutos (713 imágenes adquiridas con un intervalo de 16 s). El eje X corresponde al número de imágenes adquiridas. Se observa una propagación gradual de la señal de Ca^{2+} desde la célula fotoestimulada hacia las células vecinas, reflejando la dinámica de señalización inducida por la TFD. Estas gráficas reflejan el incremento de fluorescencia registrado en cada célula, el cual se traspoló como señal de calcio mediante el uso del indicador fluorescente Fluo-4.

Para el segundo objetivo específico, se realizó estimulación puntual en cultivos celulares con medio extracelular sin calcio. Se identificó que el calcio extracelular participa en el incremento de la señal de calcio intracelular tras la fotoestimulación con 640 nm en células preincubadas con AICIPc. A continuación, se muestra una gráfica representativa de un experimento bajo estas condiciones.

TFD en A549 sin Ca^{2+}

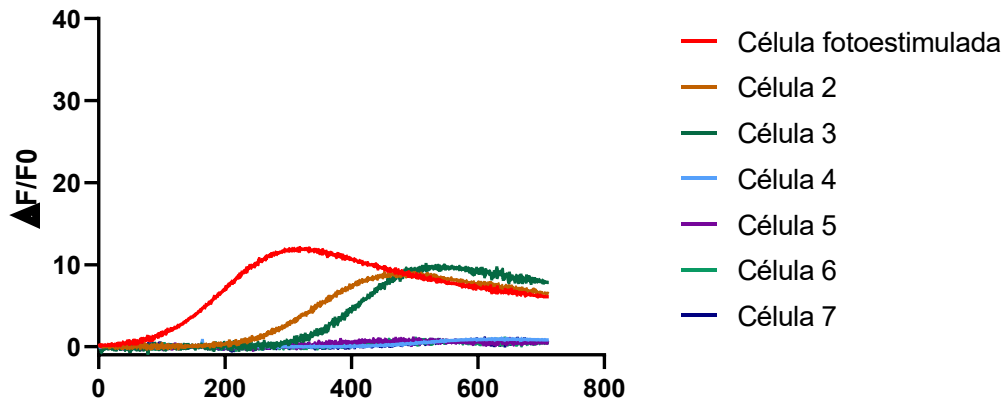


Figura 26. Curva de propagación de la señal de calcio ($\Delta F/F_0$) en células A549 durante la terapia fotodinámica (TFD) en solución extracelular sin Ca^{2+} . La gráfica muestra la respuesta de la célula fotoestimulada y de las células adyacentes (2–7) a lo largo de 15 minutos (713 imágenes adquiridas con un intervalo de 16 s). El eje X corresponde al número de imágenes adquiridas. Se observa una propagación más limitada de la señal de Ca^{2+} en ausencia de calcio externo, reflejando una menor transmisión de la señal en comparación con las condiciones con Ca^{2+} . Estas gráficas reflejan el incremento de fluorescencia registrado en cada célula, el cual se traspoló como señal de calcio mediante el uso del indicador fluorescente Fluo-4.

Para comparar la participación del calcio extracelular en el incremento de la señal de calcio intracelular, se analizó el área bajo la curva (ABC) de la señal obtenida durante 15 minutos. Se comparó la señal de calcio generada por la TFD entre los grupos *Con Calcio* y *Sin Calcio*, cada uno con un tamaño de muestra de $N = 6$ ($n \approx 60$). Para confirmar la distribución de los datos, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk, y ambos grupos mostraron una distribución normal ($p = 0.8302$ para el grupo *Con Calcio*; $p = 0.4661$ para el grupo *Sin Calcio*), permitiendo el uso de pruebas paramétricas.

El grupo *Con Calcio* presentó una media de 6440 ± 1704 , mientras que el grupo *Sin Calcio* tuvo una media de 1850 ± 500.5 . Esta diferencia fue estadísticamente significativa según la prueba t de Student, con un valor de ($p < 0.0001$; ****), considerando un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. La diferencia entre las medias fue de -4590 ± 725.0 , con un intervalo de confianza del 95% que va de -6206 a -2975 , lo cual indica una reducción significativa en la señal de calcio intracelular en ausencia de Ca^{2+} extracelular.

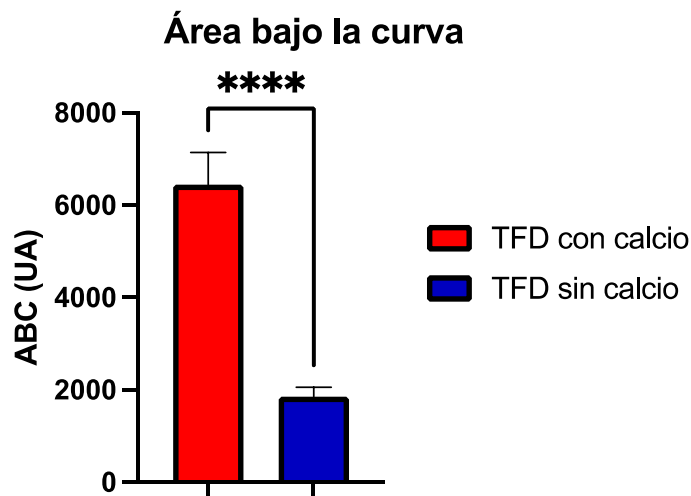


Figura 27. Comparación del Área Bajo la Curva (ABC) en células A549 durante la terapia fotodinámica (TFD) en solución extracelular con y sin Ca^{2+} . Los resultados muestran un aumento significativo de la señal de Ca^{2+} en condiciones con calcio en comparación con aquellas sin calcio, evidenciado por un valor de $p < 0.0001$ (****), indicando que la presencia de calcio favorece la propagación de la señal. Estas mediciones corresponden al total de células estudiadas ($N = 6$, $n \approx 60$).

En el análisis de la máxima intensidad de fluorescencia, se evaluaron los valores pico de la señal de calcio inducida por la TFD en condiciones *Con Calcio* y *Sin Calcio*, con un tamaño de muestra de $N = 6$ por grupo. Para verificar la normalidad de los datos, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk, obteniéndose un valor de $p = 0.6539$ para el grupo *Con Calcio* y $p = 0.3859$ para el grupo *Sin Calcio*. En ambos casos, p fue mayor que 0.05, lo que indica que los datos presentan una distribución normal y permiten el uso de pruebas paramétricas.

El grupo *Con Calcio* presentó una media de 31.25 ± 1.588 , mientras que el grupo *Sin Calcio* mostró una media de 12.23 ± 2.444 . Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.0001$; ****), considerando un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. La diferencia entre las medias fue de -19.02 ± 1.190 , con un intervalo de confianza del 95% entre -21.67 y -16.37 .

Estos resultados evidencian que la máxima intensidad de fluorescencia, como reflejo de la señal intracelular de Ca^{2+} inducida por la TFD, se ve drásticamente disminuida en ausencia de calcio extracelular, lo que resalta su papel esencial como segundo mensajero en este proceso.

Intensidad Máxima de Fluorescencia

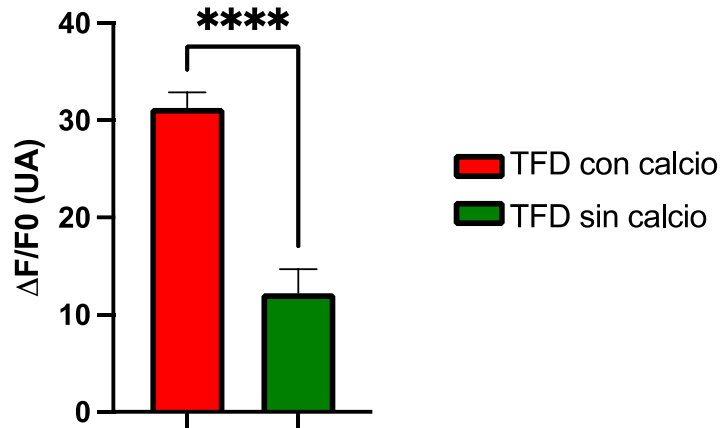


Figura 28. Comparación de la máxima intensidad de fluorescencia en células A549 durante la terapia fotodinámica (TFD) en solución extracelular con y sin Ca^{2+} . Los resultados muestran un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia en la condición con calcio, lo que refleja una mayor activación y propagación de la señal de Ca^{2+} . El análisis estadístico indica un valor de $p < 0.0001$ (****). Estas mediciones corresponden al total de células estudiadas ($N = 6$, $n \approx 60$).

Análisis de la participación de las conexinas en la transmisión de la señal de $(Ca^{2+})_i$ generada por la TFD mediante bloqueo farmacológico

Para evaluar el papel funcional de las conexinas en la propagación de la señal de $(Ca^{2+})_i$ inducida por la TFD, se empleó un enfoque de bloqueo farmacológico. Las células A549 fueron tratadas con ácido flufenámico (AFF), un inhibidor no selectivo de canales tipo gap, con el fin de interferir en la comunicación intercelular mediada por conexinas. Se registró la señal de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en presencia de calcio extracelular a 2 mM (Figura 29). Posteriormente, tras el bloqueo con AFF, se capturó la señal en un campo diferente (Figura 30). Luego, la muestra fue perfundida con solución extracelular durante 20 minutos para eliminar el bloqueo, y se realizó un nuevo registro en otro campo distinto (Figura 31). A continuación, se presenta un registro representativo de este procedimiento.

TFD en A549 antes del tratamiento con AFF

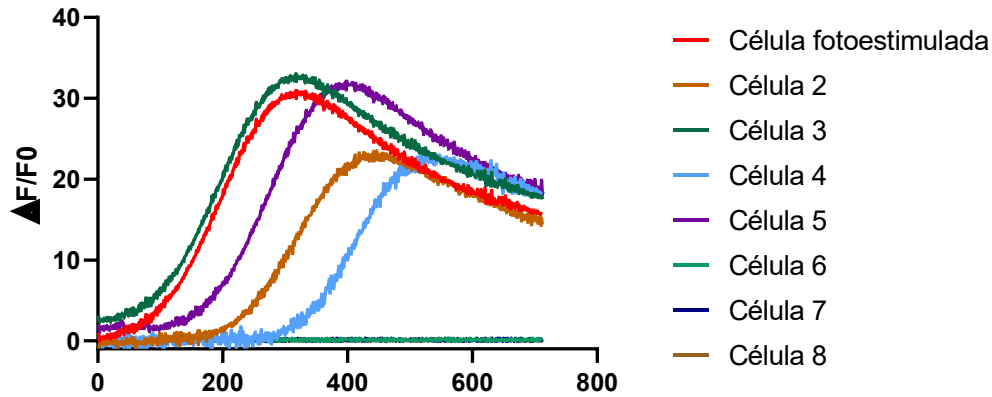


Figura 29. Curva de propagación de la señal de calcio ($\Delta F/F_0$) en células A549 durante la terapia fotodinámica (TFD) antes del tratamiento con ácido flufenámico (AFF). La gráfica muestra la respuesta de la célula fotoestimulada y de las células adyacentes (2–8) a lo largo de 15 minutos (713 imágenes adquiridas con un intervalo de 16 s). El eje X corresponde al número de imágenes adquiridas. Estas gráficas reflejan el incremento de fluorescencia registrado en cada célula, el cual se traspoló como señal de calcio mediante el uso del indicador fluorescente Fluo-4.

La estimulación puntual con láser provocó un incremento significativo en la señal de calcio únicamente en la célula estimulada. Las células adyacentes no mostraron aumento en la señal de calcio durante el periodo de registro. Este resultado indica que la respuesta de calcio fue específica de la célula fotoestimulada, sin propagación detectable a las células vecinas bajo las condiciones experimentales empleadas.

TFD en A549 con el tratamiento de AFF

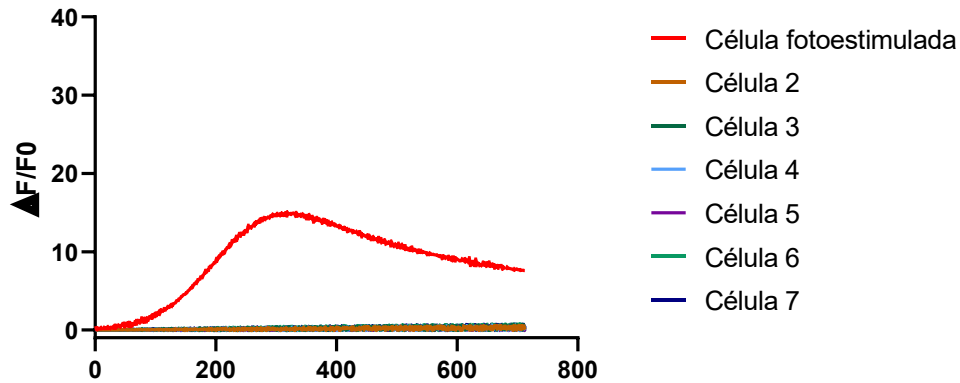


Figura 30. Curva de propagación de la señal de calcio ($\Delta F/F_0$) en células A549 durante la terapia fotodinámica (TFD) en presencia de ácido flufenámico (AFF). La gráfica muestra que tras la aplicación del bloqueador de conexinas la célula fotoestimulada genera una respuesta de Ca^{2+} , pero no se observa propagación hacia las células adyacentes (2–7) cuyas señales permanecen prácticamente basales. El registro corresponde a 15 minutos de adquisición (713 imágenes obtenidas con un intervalo de 16 s) y el eje X representa el número de imágenes adquiridas. Esta gráfica refleja el incremento de fluorescencia registrado en cada célula, el cual se traspoló como señal de calcio mediante el uso del indicador fluorescente Fluo-4.

TFD en A549 después del tratamiento con AFF

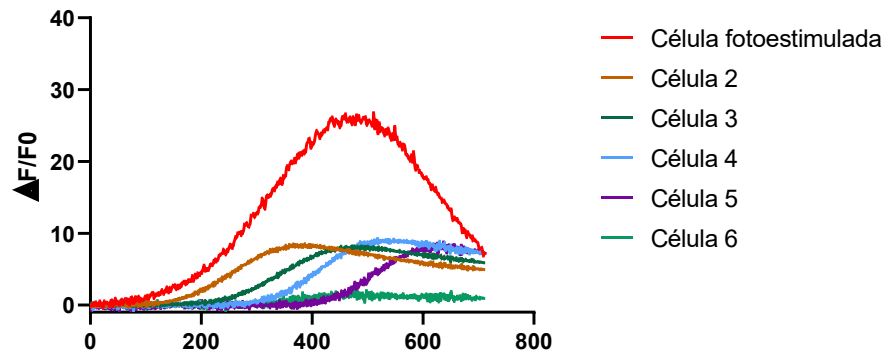


Figura 31. Curva de propagación de la señal de calcio ($\Delta F/F_0$) en células A549 durante la terapia fotodinámica (TFD) después del tratamiento con ácido flufenámico (AFF). Tras el retiro del bloqueador, la célula fotoestimulada vuelve a generar una señal clara de Ca^{2+} y se observa una recuperación parcial de la propagación hacia las células adyacentes (2–6). El registro corresponde a 15 minutos de adquisición (713 imágenes obtenidas con un intervalo de 16 s), y el eje X representa el número de imágenes adquiridas. Las células fueron incubadas 20 min con el bloqueador antes de la fotoestimulación y, tras el lavado con solución extracelular durante 20 min, se repitió la fotoestimulación para evaluar la recuperación de la señal. Estas gráficas reflejan el incremento de fluorescencia registrado en cada célula, el cual se traspoló como señal de calcio mediante el uso del indicador fluorescente Fluo-4.

Se analizaron tres grupos experimentales: *Control*, *Con AFF* y *Lavado*, cada uno con $N = 3$ ($n \approx 30$).

Para verificar la normalidad de los datos, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk, obteniéndose valores de $p = 0.3331$ para el grupo *Control*, $p = 0.6091$ para el grupo *Con AFF* y $p = 0.6779$ para el grupo *Lavado*. En los tres casos, los valores de p fueron mayores a 0.05, lo que indicó que los datos presentaban una distribución normal y permitían el uso de pruebas paramétricas. La homogeneidad de varianzas se confirmó mediante la prueba de Brown-Forsythe ($p = 0.8662$), lo que validó el uso del ANOVA.

El grupo *Control* presentó una media de 6424 ± 458.1 , el grupo *Con AFF* una media de 1252 ± 272.7 , y el grupo *Lavado* una media de 3832 ± 440.2 . El análisis mediante ANOVA de una vía mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0.0001$; ****), considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

Posteriormente, se realizó una prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey, en la cual se identificaron diferencias significativas entre el grupo *Control* y el grupo *Con AFF* ($p < 0.0001$), con una diferencia de medias de 5172 ± 325.9 e intervalo de confianza del 95% entre 4172 y 6172. Asimismo, se encontró diferencia significativa entre el grupo *Control* y el grupo *Lavado* ($p = 0.0005$), con una diferencia de 2592 ± 325.9 e intervalo de confianza entre 1592 y 3592, y también entre el grupo *Con AFF* y el grupo *Lavado* ($p = 0.0005$), con una diferencia de -2580 ± 325.9 e intervalo de confianza entre -3580 y -1580.

Estos resultados evidencian que la inhibición de las conexinas mediante AFF reduce significativamente la señal intracelular de Ca^{2+} inducida por la TFD. Además, la recuperación parcial observada tras el lavado del bloqueador sugiere que la función de las conexinas es determinante en la transmisión de la señal de calcio en este modelo celular.

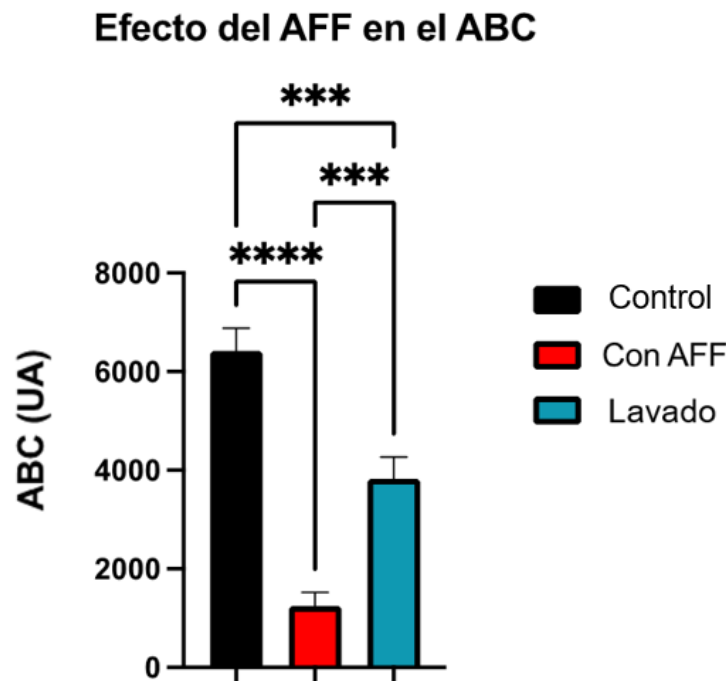


Figura 32. Efecto del bloqueo farmacológico de conexinas sobre el área bajo la curva (ABC) de la señal de Ca^{2+} durante la TFD. El tratamiento con AFF redujo significativamente el ABC en comparación con el grupo Control, mientras que el grupo Lavado mostró una recuperación parcial. Estas mediciones corresponden al total de células estudiadas ($N = 3$, $n \approx 30$).

Los resultados derivados del análisis del ABC indican que el bloqueador AFF ejerce una inhibición sustancial sobre la señal de calcio, reduciendo su magnitud en un 80.51%. A pesar de esta marcada inhibición, el proceso de lavado implementado demostró ser

efectivo para revertir parcialmente este efecto, logrando recuperar aproximadamente la mitad de la señal inhibida (49.87%). Estos hallazgos sugieren que el efecto del bloqueador AFF sobre las conexinas es, al menos en parte, reversible bajo las condiciones experimentales establecidas, según lo evidenciado por las variaciones en el ABC de la señal de calcio.

Del mismo modo, se evaluó la intensidad máxima de la señal de $(Ca^{2+})_i$ inducida por la TFD en tres grupos experimentales: *Control*, *Con AFF* y *Lavado*, con un tamaño de muestra de $N = 3$ ($n \approx 30$) por grupo.

La distribución de los datos fue evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk, la cual mostró que el grupo *Con AFF* no presentó una distribución normal ($p = 0.0223$), mientras que los grupos *Lavado* y *Control* sí cumplieron con este criterio ($p = 0.2321$ y $p = 0.5679$, respectivamente). Dado que al menos uno de los grupos no cumplió con la normalidad, se optó por un análisis no paramétrico.

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p = 0.0036$), considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ y un intervalo de confianza del 95%. El grupo *Control* presentó una media de 31.00 ± 1.715 , el grupo *Con AFF* una media de 18.95 ± 2.722 , y el grupo *Lavado* una media de 25.42 ± 1.570 .

Posteriormente, se realizó una prueba post hoc de Dunn para comparaciones múltiples. Se identificó una diferencia significativa entre el grupo *Con AFF* y el grupo *Control* ($p = 0.0219$). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos *Control* y *Lavado* ($p = 0.5391$) ni entre *Con AFF* y *Lavado* ($p = 0.5391$).

El análisis de la máxima intensidad de fluorescencia reveló que la aplicación del bloqueador AFF produce una reducción considerable en la señal de calcio, disminuyéndola en un 80.07%. Sin embargo, tras el proceso de lavado, se observó una recuperación parcial de la intensidad de la señal, recuperando cerca del 60.86%.

Estos resultados indican que el tratamiento con AFF disminuye significativamente la intensidad máxima de fluorescencia generada por la TFD, reflejando una inhibición en el pico de señal intracelular de calcio. Tras el lavado del bloqueador, la señal muestra una recuperación parcial, aunque sin alcanzar niveles estadísticamente equivalentes a los del grupo *Control*.

Intensidad Máxima de Fluorescencia

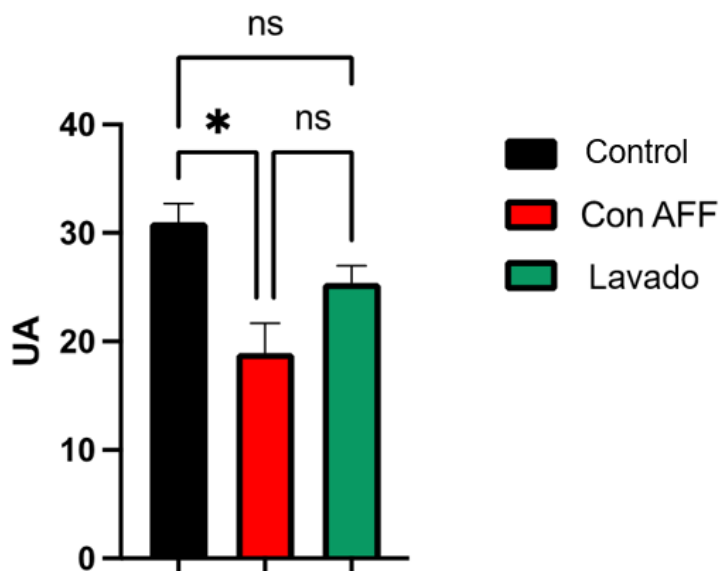


Figura 33. Efecto del bloqueo farmacológico de conexinas sobre la máxima intensidad de fluorescencia durante la TFD. El grupo tratado con AFF mostró una disminución significativa en la señal máxima de Ca^{2+} intracelular. Estas mediciones corresponden al total de células estudiadas ($N = 3$, $n \approx 30$).

Medida	Disminución con AFF (%)	Recuperación Lavado (%)
Área Bajo la Curva (ABC)	80.51	49.87
Máxima Intensidad de Fluorescencia	80.07	60.86

Tabla 6. Comparación de porcentajes de disminución y recuperación de la señal de calcio, medidos mediante el Área Bajo la Curva (ABC) y la Máxima Intensidad de Fluorescencia, tras la aplicación del bloqueador AFF y el proceso de lavado.

No se realizaron experimentos en ausencia de calcio extracelular en este grupo, ya que previamente se confirmó que la presencia de calcio extracelular es indispensable para que ocurra una propagación significativa de la señal de $(Ca^{2+})_i$ inducida por la TFD. Por lo tanto, la evaluación del efecto del bloqueo de conexinas en condiciones sin calcio se consideró innecesaria, dado que carecería de validez experimental.

Determinación del tipo de muerte celular generada por la TFD

Los resultados obtenidos evidencian que la TFD indujo muerte celular en la línea A549. En todos los vidrios analizados se observó un incremento progresivo en el número de células muertas conforme avanzaba el tiempo, aunque con variaciones en la magnitud del efecto. El tipo de muerte celular se determinó mediante el análisis de fluorescencia en los canales correspondientes a los marcadores Anexina V-FITC y yoduro de propidio (IP), cuantificando las apoptóticas y necróticas con base en el patrón de tinción descrito en la Tabla 4.

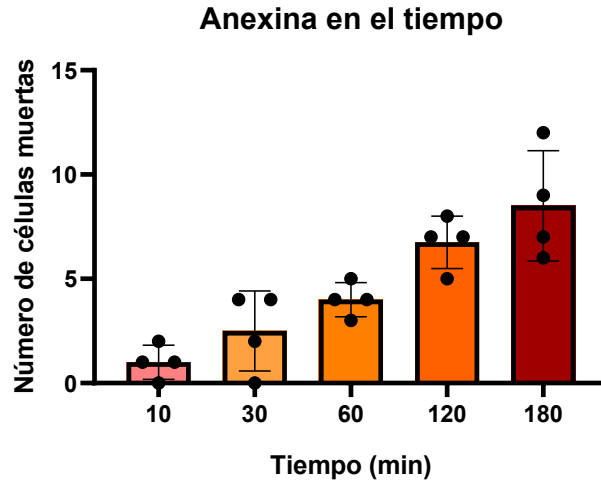


Figura 34. Evolución temporal de la muerte celular en la línea A549 tratada con TFD, evaluada mediante tinción con Anexina V-FITC/IP. Se muestra el promedio \pm desviación estándar del número de células muertas cuantificadas a 10, 30, 60, 120 y 180 minutos posteriores a la fotoestimulación ($N = 4$, $n \approx 40$). Los datos revelan un incremento progresivo en la muerte celular conforme avanza el tiempo, alcanzando valores máximos a los 180 minutos.

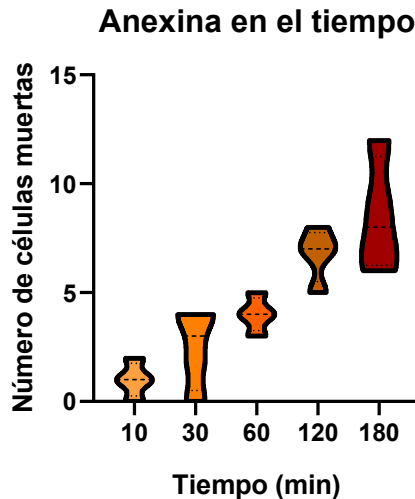


Figura 35. Distribución temporal de la muerte celular en la línea A549 tratada con TFD, evaluada mediante tinción con Anexina V-FITC/IP. El gráfico de violín muestra la variabilidad en el número de células muertas cuantificadas a 10, 30, 60, 120 y 180 minutos posteriores a la fotoestimulación ($N = 4$, $n \approx 40$). Se observa un incremento progresivo en la muerte celular a lo largo del tiempo, junto con una mayor variabilidad en las mediciones.

En las Figuras 34 y 35 se presenta la evolución de la muerte celular en el tiempo para cada vidrio analizado, con un tamaño muestral de $N = 4$ ($n \approx 40$). A partir de los datos obtenidos, se calculó el promedio y la desviación estándar del número de células muertas en cada punto temporal. A los 10 minutos, el promedio de células muertas fue de 1.0 ± 0.816 ; este valor se incrementó a 2.5 ± 1.915 a los 30 minutos. Posteriormente, a los 60 minutos, se registró un promedio de 4.0 ± 0.816 células muertas. A los 120 minutos, el número aumentó a 6.8 ± 1.258 , y finalmente, a los 180 minutos, alcanzó un promedio de 8.5 ± 2.646 , lo que evidencia una tendencia progresiva en el incremento de la muerte celular inducida por la TFD. Estos resultados sugieren que la TFD desencadena un proceso de muerte celular dependiente del tiempo, reflejando la acumulación progresiva del daño celular tras la fotoestimulación.

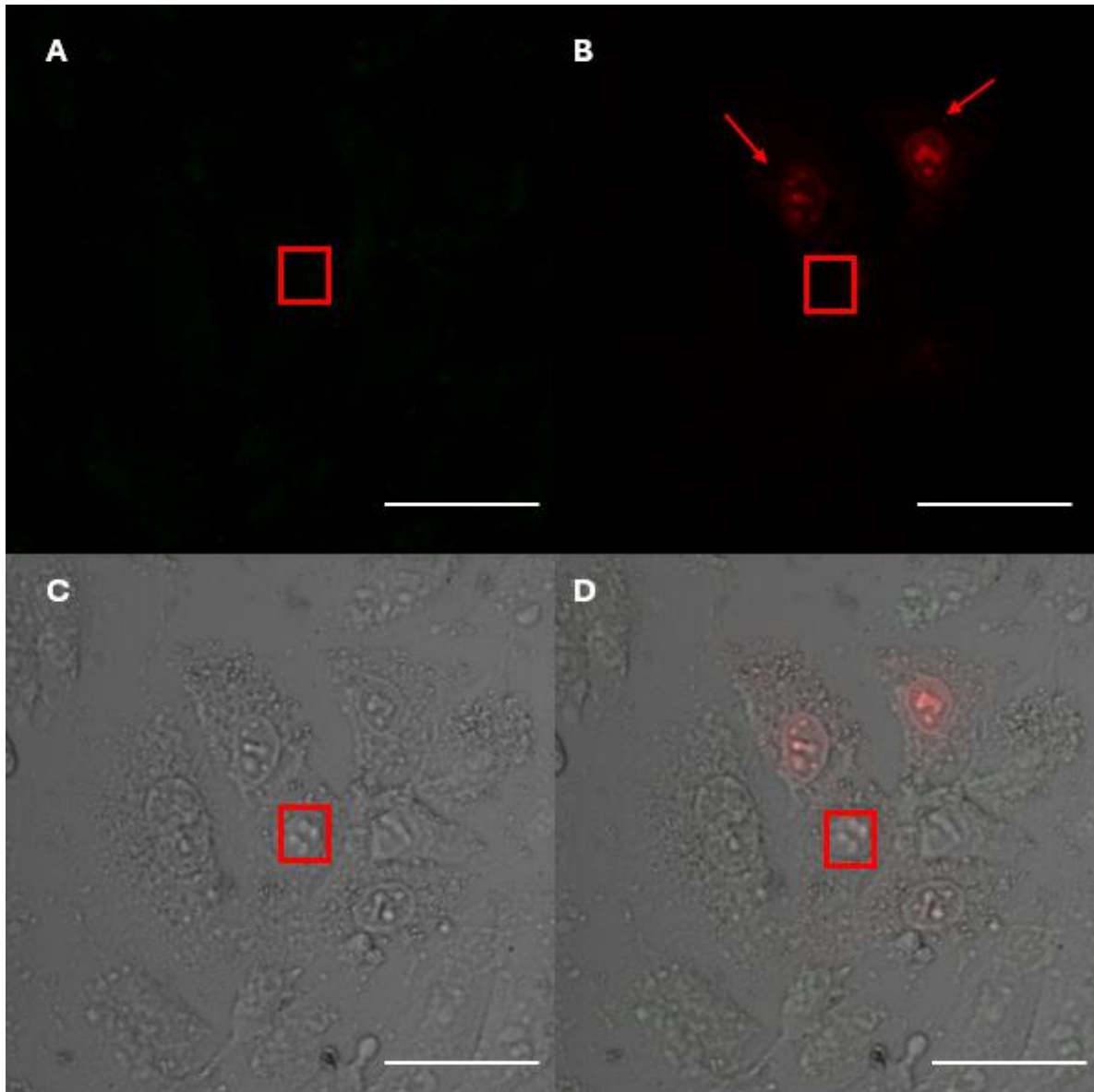


Figura 36. Detección de necrosis celular en células A549 tratadas con TFD mediante tinción con Anexina V/IP, 10 minutos después de la estimulación. (A) Canal de **Anexina V**, sin señal detectable en las células. (B) Canal de **Yoduro de Propidio (IP)**, donde las flechas indican células teñidas. (C) Imagen en campo claro mostrando la morfología celular. (D) Fusión de los tres canales (Anexina V/IP/Campo claro), resaltando la localización de las células necróticas. El cuadro rojo indica la célula que fue fotoestimulada puntualmente. Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo de 40X mediante microscopía confocal. Barra de escala 50 μ m.

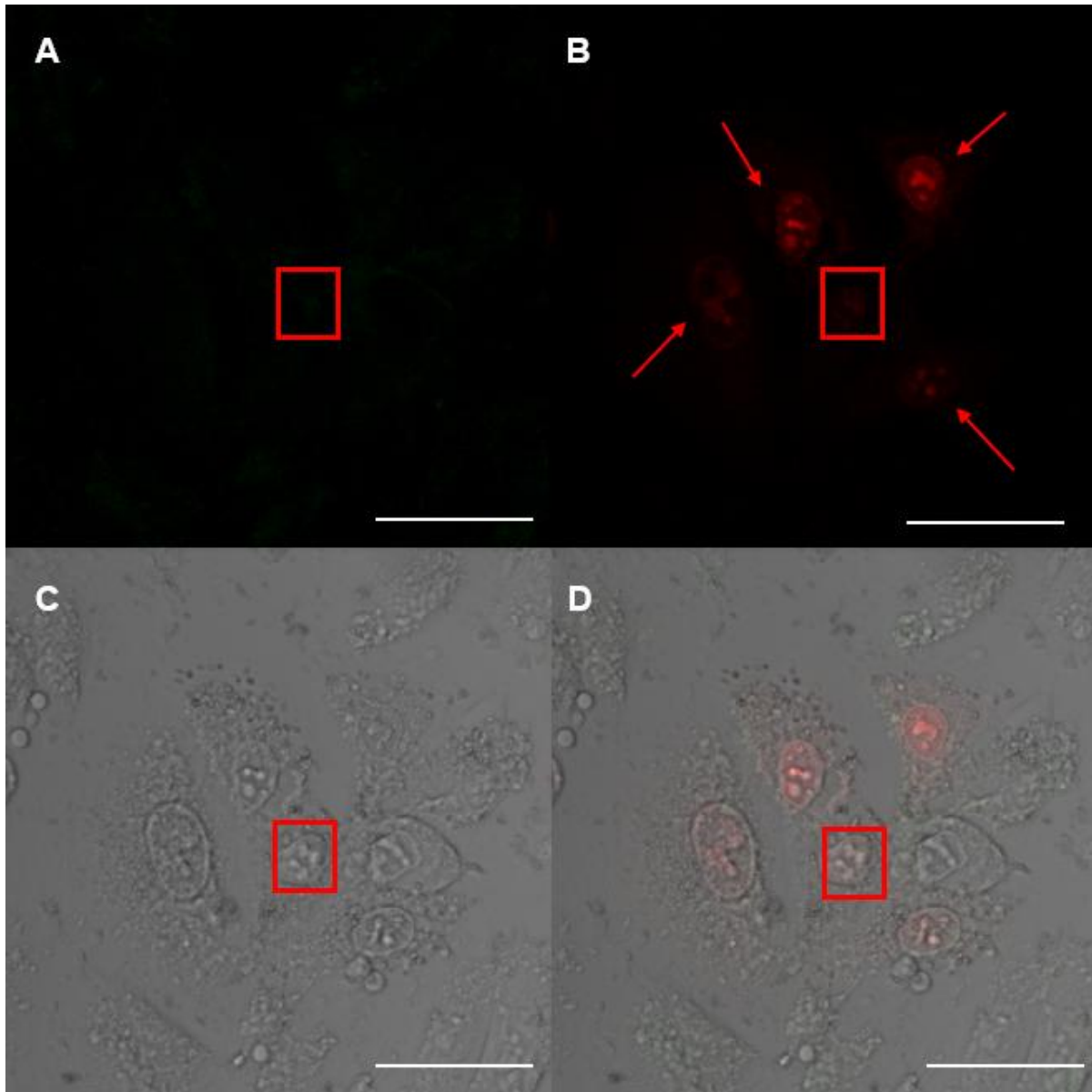


Figura 37. Detección de necrosis celular en células A549 tratadas con TFD mediante tinción con Anexina V/IP, 30 minutos después de la estimulación. (A) Canal de **Anexina V**, sin señal detectable en las células. (B) Canal de **Yoduro de Propidio (IP)**, donde las flechas indican células teñidas. (C) Imagen en campo claro mostrando la morfología celular. (D) Fusión de los tres canales (Anexina V/IP/Campo claro), resaltando la localización de las células necróticas. El cuadro rojo indica la célula que fue fotoestimulada puntualmente. Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo de 40X mediante microscopía confocal. Barra de escala 50 μ m.

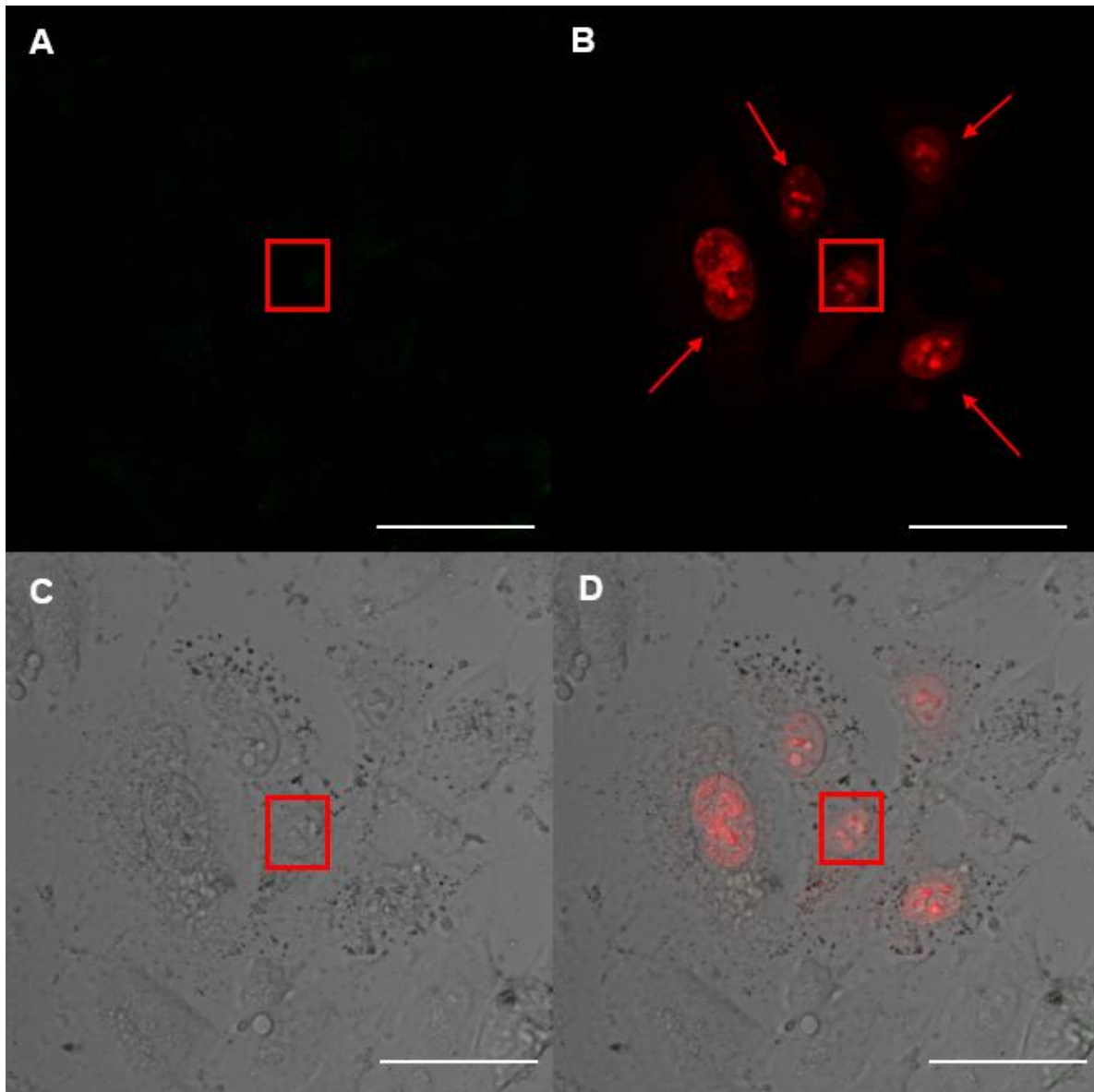


Figura 38. Detección de necrosis celular en células A549 tratadas con TFD mediante tinción con Anexina V/IP, 60 minutos después de la estimulación. (A) Canal de **Anexina V**, sin señal detectable en las células. (B) Canal de **Yoduro de Propidio (IP)**, donde las flechas indican células teñidas. (C) Imagen en campo claro mostrando la morfología celular. (D) Fusión de los tres canales (Anexina V/IP/Campo claro), resaltando la localización de las células necróticas. El cuadro rojo indica la célula que fue fotoestimulada puntualmente. Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo de 40X mediante microscopía confocal. Barra de escala 50 μm .

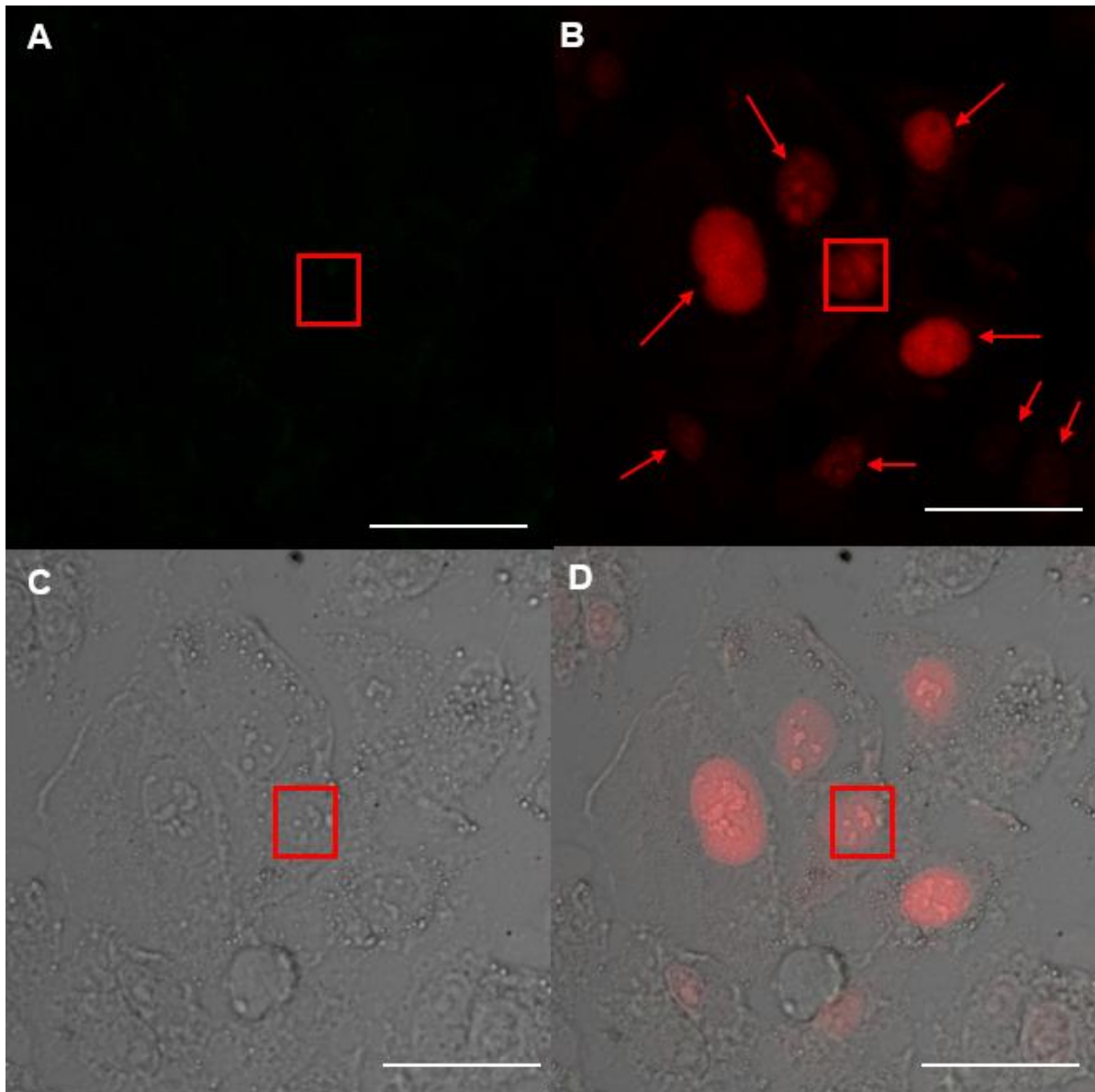


Figura 39. Detección de necrosis celular en células A549 tratadas con TFD mediante tinción con Anexina V/IP, 120 minutos después de la estimulación. (A) Canal de Anexina V, sin señal detectable en las células. (B) Canal de Yoduro de Propidio (IP), donde las flechas indican células teñidas. (C) Imagen en campo claro mostrando la morfología celular. (D) Fusión de los tres canales (Anexina V/IP/Campo claro), resaltando la localización de las células necróticas. El cuadro rojo indica la célula que fue fotoestimulada puntualmente. Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo de 40X mediante microscopía confocal. Barra de escala 50 μ m.

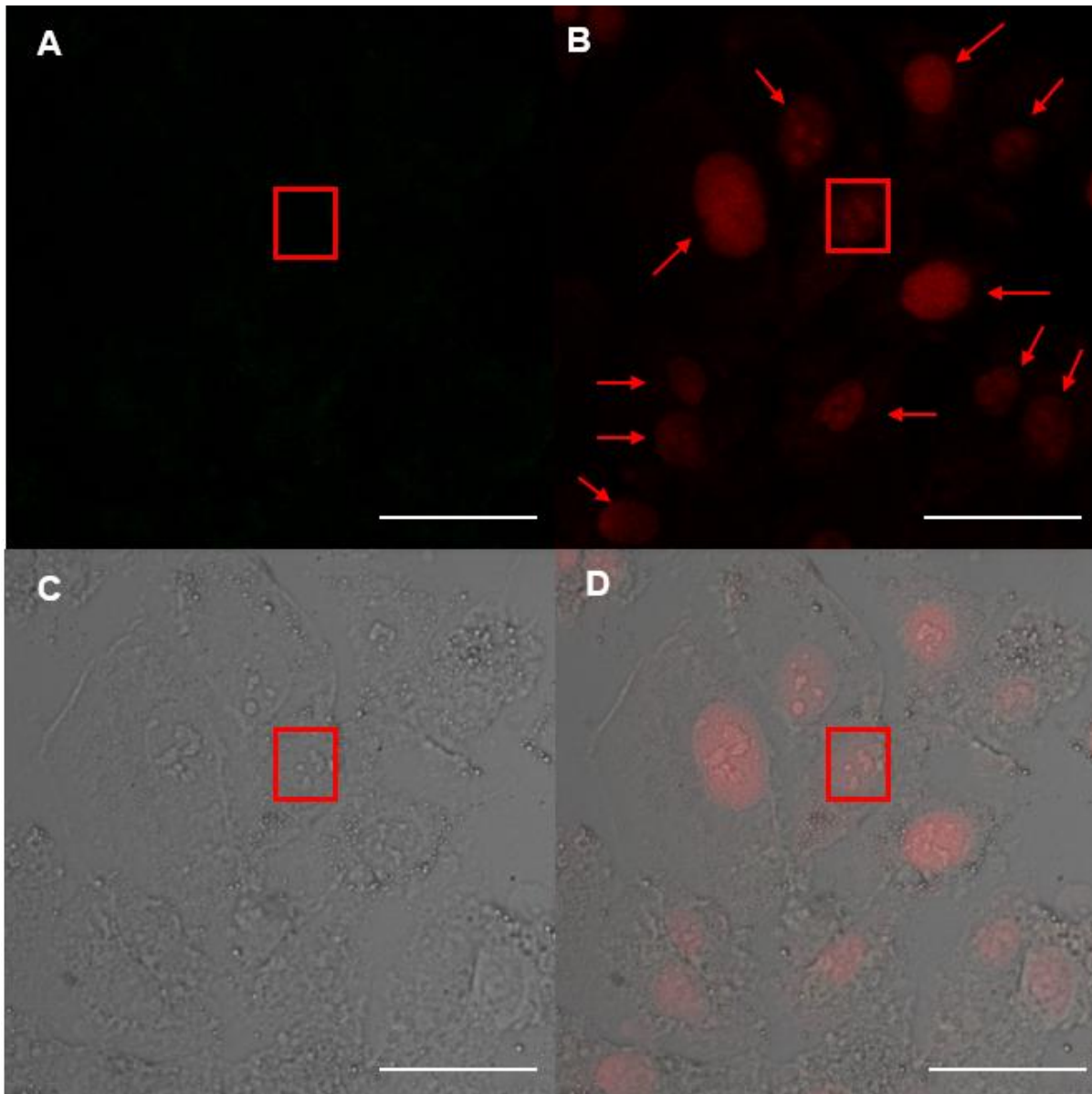


Figura 40. Detección de necrosis celular en células A549 tratadas con TFD mediante tinción con Anexina V/IP, 180 minutos después de la estimulación. (A) Canal de **Anexina V**, sin señal detectable en las células. (B) Canal de **Yoduro de Propidio (IP)**, donde las flechas indican células teñidas. (C) Imagen en campo claro mostrando la morfología celular. (D) Fusión de los tres canales (Anexina V/IP/Campo claro), resaltando la localización de las células necróticas. El cuadro rojo indica la célula que fue fotoestimulada puntualmente. Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo de 40X mediante microscopía confocal. Barra de escala 50 μ m.

DISCUSIÓN

Determinación de la presencia de conexinas en la línea celular A549 por inmunofluorescencia indirecta

La inmunofluorescencia indirecta realizada en la línea celular A549 permitió evidenciar la expresión diferencial de distintas isoformas de conexinas, destacando patrones específicos de localización que permiten inferir su posible funcionalidad en la comunicación intercelular. En las micrográficas obtenidas se identificó una clara señal de Cx43 en la membrana plasmática, particularmente en las zonas de contacto entre células, lo cual sugiere su participación en la formación de uniones tipo gap (Figura 22). Esta observación resulta relevante, ya que la localización en membrana es un requisito estructural para que las conexinas ensamblen conexones funcionales y, posteriormente, canales intercelulares de comunicación (Dbouk, Mroue, El-Sabban, & Talhouk, 2009). La disposición de Cx43 en los bordes celulares apoya su papel como principal mediadora de la comunicación iónica y de moléculas pequeñas en este modelo tumoral, como lo es el Ca^{2+} .

En contraste, las isoformas Cx26 y Cx32 mostraron una distribución predominantemente citoplasmática y nuclear, sin una señal definida en la membrana plasmática (Figuras 20 y 21). Esto sugiere una baja probabilidad de que estas isoformas participen activamente en la formación de uniones gap funcionales en las condiciones basales del experimento. Si bien su expresión está presente, su localización celular limita su funcionalidad como canales de comunicación intercelular, lo cual ha sido reportado en diversos modelos tumorales donde las conexinas se encuentran retenidas en compartimentos intracelulares o sujetas a procesos de regulación postraduccional que impiden su tráfico hacia la membrana (Aasen, et al., 2019). Así, su presencia no implica necesariamente un papel activo en la propagación de señales intercelulares.

Por otro lado, la conexina 46 presentó una señal tenue localizada parcialmente en la membrana y en el núcleo (Figura 23), lo que sugiere una participación moderada en la comunicación intercelular, aunque no tan definida como la observada para Cx43. Cabe destacar que, en ciertos tipos celulares, Cx46 puede desempeñar funciones tanto dependientes como independientes de la comunicación entre células, incluyendo regulación de la supervivencia celular y mantenimiento de la homeostasis tumoral (León-Fuentes, Salgado-Gil, Novoa, & Retamal, 2023). No obstante, como su señal en membrana es débil y no está bien definida, no es posible asegurar con certeza que esta conexina esté funcionando activamente en la comunicación intercelular en condiciones basales, es decir, en ausencia de cualquier estímulo experimental o tratamiento, como la TFD o modificaciones en el medio extracelular.

En conjunto, estos resultados permiten establecer que la Cx43 es la isoforma con mayor probabilidad de participar activamente en la formación de uniones tipo gap en la línea A549, debido a su clara localización en membrana. Esta observación cobra relevancia en el contexto de la señalización de calcio inducida por la TFD, ya que su distribución

sugiere un rol central en la propagación de señales iónicas como el $(Ca^{2+})_i$, contribuyendo al posible efecto bystander observado en los experimentos.

Análisis de la transmisión de la señal de $(Ca^{2+})_i$ generada por la TFD en condiciones con y sin calcio extracelular

La propagación de la señal de calcio intracelular $[(Ca^{2+})_i]$ generada por la terapia fotodinámica (TFD) mostró una fuerte dependencia del calcio extracelular. Bajo condiciones con Ca^{2+} , la célula fotoestimulada exhibió un incremento sostenido de fluorescencia que se propagó hacia las células vecinas, sugiriendo un mecanismo de comunicación intercelular activo y coordinado (Fig. 25). Este patrón se redujo drásticamente en ausencia de calcio extracelular, donde la señal quedó confinada a la célula estimulada, sin evidencia de propagación significativa (Fig. 26). Las mediciones cuantitativas mostraron una disminución significativa en el área bajo la curva (ABC) y en la máxima intensidad de fluorescencia cuando se omitió el Ca^{2+} del medio (Fig. 27 y 28), lo que demuestra que la entrada de calcio del medio externo es indispensable para sostener y propagar la señal inducida por la TFD.

Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Tajiri et al. (1998), quienes observaron que la TFD induce un aumento leve en $(Ca^{2+})_i$ a los 30 minutos, seguido de un incremento marcado entre 1 y 2 horas postratamiento. Así, el aumento de $(Ca^{2+})_i$ representa un evento temprano clave en la cascada de muerte celular desencadenada por la TFD (Tajiri, Hayakawa, Matsumoto, Yokoyama, & Yoshida, 1998).

Además, estudios recientes han demostrado que una sobrecarga de Ca^{2+} intracelular puede potenciar la eficacia de la TFD al inducir estrés oxidativo y daño mitocondrial en células tumorales. Mo et al. (2024) desarrollaron una nanoplataforma que libera peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y Ca^{2+} de manera controlada, lo que resultó en una acumulación significativa de Ca^{2+} en el citosol y mitocondrias de células de cáncer pulmonar; esta acumulación provocó una disfunción mitocondrial y aumentó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), amplificando el efecto citotóxico de la TFD (Mo, Phan, Nguyen, & Kim, 2024).

Finalmente, los resultados obtenidos son coherentes con lo descrito en modelos de carcinoma nasofaríngeo, tratados clínicamente con estrategias que modulan vías de muerte celular dependientes de Ca^{2+} . Esta evidencia clínica reciente ha subrayado que alteraciones en la homeostasis de calcio intracelular pueden potenciar la respuesta antitumoral, particularmente cuando se combinan con fármacos que sensibilizan al estrés oxidativo inducido por la TFD (Wu R. , Chu, Kwok, & Huang, 2023).

Así, la presencia de Ca^{2+} extracelular no solo permite la propagación eficiente de la señal, sino que también potencia la eficacia terapéutica del tratamiento al facilitar la inducción de muerte celular a través de mecanismos dependientes de calcio.

Análisis de la participación de las conexinas en la transmisión de la señal de $(Ca^{2+})_i$ generada por la TFD mediante bloqueo farmacológico

Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con ácido flufenámico (AFF), un bloqueador de canales formados por conexinas, redujo significativamente la propagación de la señal de calcio inducida por la TFD. En presencia de AFF, la señal de fluorescencia en las células vecinas a la célula estimulada se redujo de manera notoria (Fig. 30), lo cual indica una interrupción en la comunicación intercelular. Esta disminución fue cuantificada mediante el análisis del área bajo la curva (ABC) y de la máxima intensidad de fluorescencia, en donde se observó una caída estadísticamente significativa en comparación con la condición sin bloqueador (Fig. 32 y 33). Posteriormente, al retirar el AFF mediante un lavado, se evidenció una recuperación parcial de la señal (Fig. 31), lo cual sugiere que las conexinas retomaron su funcionalidad como canales intercelulares una vez eliminado el inhibidor.

Estos hallazgos sustentan que las conexinas juegan un papel activo en la propagación de la señal de $(Ca^{2+})_i$ generada por la TFD. Esto concuerda con estudios previos que han demostrado que los canales formados por conexinas, en especial Cx43, son responsables de la difusión intercelular de señales como el calcio y el inositol trifosfato (IP_3), permitiendo la transmisión de respuestas apoptóticas entre células adyacentes (Hoorelbeke, Decrock, Van Haver, De Bock, & Leybaert, 2018). La interrupción de estos canales con AFF afecta directamente el paso de iones y segundos mensajeros, limitando la propagación del estímulo inicial inducido por la TFD.

Además, este fenómeno puede interpretarse en el contexto del efecto bystander, entendido como la respuesta observada en células no tratadas directamente pero que reciben señales de muerte celular desde células afectadas por la TFD. Se ha demostrado que este efecto puede estar mediado por ROS, NO y, particularmente, por ondas de Ca^{2+} que se propagan a través de uniones gap (Moloudi, Sarbadhikary, Abrahamse, & George, 2023). Con estos resultados podemos deducir que la activación localizada de un fotosensibilizador puede generar una señal de calcio que se disemina radialmente a través de conexinas, induciendo muerte celular en células vecinas no irradiadas; este mecanismo depende del estado funcional de las conexinas, lo que se vio claramente en el experimento al observar la pérdida de propagación bajo AFF y su recuperación tras el lavado.

La señal de Ca^{2+} no solo funciona como un mensajero intracelular, sino que actúa como mediador entre células para amplificar el efecto citotóxico de la TFD. De hecho, se ha propuesto que la transmisión de calcio a través de canales formados por conexinas puede inducir la producción secundaria de especies reactivas en células vecinas, desencadenando vías apoptóticas incluso en células no fotoestimuladas directamente (Moloudi, Sarbadhikary, Abrahamse, & George, 2023). En este sentido, el restablecimiento de la señal después del lavado del AFF (Fig. 31) confirma que las conexinas no solo participan en la propagación, sino que su función es reversible y esencial para sostener el efecto bystander durante la TFD.

Por lo tanto, los datos obtenidos permiten concluir que las conexinas son componentes funcionales clave en la propagación intercelular de la señal de $(Ca^{2+})_i$ inducida por la TFD. Su inhibición farmacológica bloquea este proceso, y su remoción restaura la comunicación, lo cual no solo refuerza su papel en la señalización de muerte celular, sino que también valida experimentalmente el efecto bystander como un mecanismo dependiente de la comunicación célula a célula.

Determinación del tipo de muerte celular generada por la TFD

La evaluación del tipo de muerte celular inducida por la terapia fotodinámica (TFD) en células A549 se realizó mediante tinción con Anexina V-FITC y Yoduro de Propidio (IP), marcadores clásicos para distinguir apoptosis y necrosis, respectivamente. Según el patrón de fluorescencia, la señal verde (Anexina V+) indica exposición de fosfatidilserina, característica de apoptosis, mientras que la doble positividad (Anexina V+ / IP+) corresponde típicamente a necrosis. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron una tinción positiva únicamente para IP, sin detección de fluorescencia verde, lo cual sugiere una pérdida de integridad de membrana sin exposición significativa de fosfatidilserina (Fig. 40). Este perfil no corresponde con apoptosis clásica ni con necrosis secundaria, por lo que se propone que la muerte celular inducida por la TFD bajo estas condiciones podría corresponder a necroptosis.

La variabilidad observada entre los distintos vidrios puede estar relacionada con factores como la densidad celular inicial, la distribución del fotosensibilizador o ligeras diferencias en la exposición a la fotoestimulación.

La necroptosis es una forma de muerte celular programada, morfológicamente similar a la necrosis, pero regulada por señales intracelulares específicas, entre las que destacan la activación de RIPK1, RIPK3 y la fosforilación de MLKL (Hanson, 2016). A diferencia de la apoptosis, la necroptosis no requiere la activación de caspasas, lo cual concuerda con la ausencia de señal de Anexina V en este modelo experimental. Además, se ha descrito que la necroptosis puede desencadenarse por estrés oxidativo y por disfunción mitocondrial, eventos comúnmente inducidos por la TFD debido a la producción de ROS en respuesta a la activación del fotosensibilizador (de Souza, Mencialha, Fonseca, & de Paoli, 2024).

En estudios previos, como el realizado por de Melo Gomes et al. (2023), se demostró que la TFD con azul de metileno en células tumorales de próstata no indujo activación significativa de caspasa-3 ni elevación de Bcl-2, pero sí generó un aumento en la fosforilación de MLKL, confirmando la participación de la necroptosis como vía principal de muerte celular. Asimismo, los autores observaron que la inhibición de la autofagia no revertía la pérdida de viabilidad celular (de Melo Gomes, et al., 2023), lo que apoya la hipótesis de que otro tipo de muerte programada, como la necroptosis, es la vía predominante en ese contexto.

Por otro lado, Chilakamarthi et al. (2022) discuten que la necroptosis inducida por TFD puede ocurrir en ausencia de caspasa-3 activa y en presencia de señales de daño como

ROS y disfunción mitocondrial, elementos todos compatibles con la fisiología inducida por TFD.

Aunque la ferroptosis también puede culminar con la pérdida de integridad de la membrana plasmática, este evento no ocurre de forma temprana ni abrupta como en la necrosis o necroptosis; por el contrario, se trata de un proceso regulado que se caracteriza por la acumulación progresiva de peroxidación lipídica, dependiente de hierro, como consecuencia del estrés oxidativo generado por la terapia fotodinámica (Chang, Wang, Zeng, & Wang, 2024).

En este estudio, las células A549 tratadas con TFD mostraron tinción exclusiva con yoduro de propidio, sin señal de Anexina V, lo que indica una pérdida inmediata de la membrana sin exposición detectable de fosfatidilserina. Este perfil no es característico de ferroptosis, ya que dicha modalidad de muerte celular requiere la acumulación de lípidos oxidados, reducción de GPX4 y agotamiento de glutatión (Chang, Wang, Zeng, & Wang, 2024), condiciones que no fueron evaluadas en el presente trabajo.

En la ferroptosis, la pérdida de integridad de membrana ocurre en etapas tardías, como consecuencia del daño acumulado por peroxidación lipídica extrema, y suele ser un evento final, no temprano; en cambio, la necroptosis sí causa una ruptura activa de membrana desde etapas tempranas, mediada por MLKL fosforilado, que forma poros directamente en la membrana plasmática (Mishchenko, Balalaeva, Gorokhova, Vedunova, & Krysko, 2022).

Además, la ferroptosis suele confirmarse mediante inhibidores específicos como ferostatina-1 o mediante análisis morfológicos que detectan mitocondrias densificadas y reducidas en tamaño (Huang, et al., 2023), elementos que tampoco formaron parte de la metodología. Por tanto, y considerando la cinética rápida de la pérdida de integridad de membrana observada, los resultados no son compatibles con ferroptosis, y refuerzan la hipótesis de que la TFD en estas condiciones induce una forma de muerte celular regulada y lítica como la necroptosis.

Esta forma de muerte puede representar una ventaja terapéutica en modelos tumorales resistentes a la apoptosis, ya que no depende de la vía apoptótica clásica. En conjunto, los hallazgos experimentales observados en este estudio, junto con la literatura disponible, permiten proponer que la muerte celular inducida por TFD en células A549 bajo las condiciones evaluadas no se corresponde con apoptosis clásica, y es más compatible con un proceso de necroptosis, posiblemente favorecido por el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la ausencia de caspasas activas. Este tipo de muerte celular puede tener implicaciones importantes en la eficacia terapéutica de la TFD, al contribuir a la eliminación de células tumorales que evaden rutas apoptóticas tradicionales.

CONCLUSIONES

La presente investigación demostró que la terapia fotodinámica (TFD) induce una señal significativa de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en la línea celular A549, un modelo de adenocarcinoma pulmonar humano, y que esta señal depende directamente de la presencia de calcio extracelular. El uso de Fluo-4 como indicador permitió visualizar mediante microscopía confocal una señal fluorescente en la célula fotoestimulada, la cual fue interpretada como la propagación de $(Ca^{2+})_i$ hacia células vecinas, en función de los cambios en la intensidad de fluorescencia observados tras la estimulación con el fotosensibilizador AICIPc.

Asimismo, se evidenció que las conexinas desempeñan un papel esencial en la propagación de esta señal de calcio entre células vecinas, dado que el bloqueo farmacológico con ácido flufenámico (AFF) redujo de forma significativa la intensidad de la señal. Tras el retiro del bloqueador, se observó una recuperación parcial de la propagación, lo que sugiere un efecto reversible y confirma la participación activa de las uniones tipo gap en este proceso.

Por otro lado, la evaluación del tipo de muerte celular mediante tinción con Anexina V y Yoduro de Propidio indicó que, bajo las condiciones evaluadas, la TFD no indujo apoptosis ni necrosis. En cambio, se detectó una señal exclusiva con IP, lo que sugiere la pérdida temprana de la integridad de membrana plasmática. Esta observación, junto con la evidencia bibliográfica, permite proponer que la muerte celular inducida por TFD en estas condiciones es compatible con necroptosis, una forma de muerte celular regulada, lítica y proinflamatoria, que podría ser aprovechada terapéuticamente frente a tumores resistentes a la apoptosis.

En conjunto, los resultados obtenidos permiten concluir que la TFD genera una respuesta de señalización de $(Ca^{2+})_i$ dependiente de Ca^{2+} extracelular como de la comunicación intercelular mediada por conexinas, y que dicha señal podría contribuir a inducir necroptosis como mecanismo de muerte celular. Estos hallazgos fortalecen el entendimiento de la respuesta celular a la TFD y abren nuevas perspectivas para mejorar su eficacia como tratamiento alternativo al cáncer de pulmón.

PERSPECTIVAS

A partir de los hallazgos obtenidos en esta investigación, se abren diversas líneas de estudio que permitirían profundizar en los mecanismos celulares implicados en la respuesta a la terapia fotodinámica (TFD) y validar las hipótesis propuestas.

En primer lugar, se sugiere confirmar experimentalmente la activación de necroptosis como tipo de muerte celular inducida por la TFD. Para ello, podrían emplearse metodologías específicas como la detección por western blot de proteínas asociadas a esta vía, tales como RIPK1, RIPK3 y MLKL fosforilado. Además, el análisis por inmunofluorescencia de la translocación de MLKL a la membrana permitiría corroborar su activación y localización funcional.

Por otro lado, sería relevante trasladar este modelo experimental a sistemas más representativos del entorno tumoral, como esferoides tumorales. Estos sistemas permitirían evaluar la propagación de la señal de calcio y la efectividad de la TFD en condiciones más cercanas a la fisiología tumoral real, incluyendo la heterogeneidad celular y la complejidad del microambiente.

Finalmente, considerando el papel clave de las conexinas en la propagación de señales proapoptóticas, podría explorarse la combinación de TFD con moduladores de uniones gap o agentes que favorezcan la expresión de Cx43, con el objetivo de potenciar el efecto terapéutico mediante una mayor propagación del daño a través del efecto bystander.

A largo plazo, la validación de estos mecanismos podría contribuir al diseño de estrategias terapéuticas combinadas y personalizadas que mejoren la eficacia clínica de la TFD como tratamiento alternativo o complementario en pacientes con cáncer de pulmón.

REFERENCIAS

- Aasen, T., Leithe, E., Graham, S., Kameritsch, P., Mayán, M., Mesnil, M., . . . Tabernero, A. (2019, Junio). Connexins in cancer: bridging the gap to the clinic. *Oncogene*, 38(23), 4429-4451. doi:10.1038/s41388-019-0741-6
- Aebisher, D., Przygórzewska, A., & Bartusik-Aebisher, D. (2024). Natural Photosensitizers in Clinical Trials. *Applied Sciences*, 14(18), 8436. doi:10.3390/app14188436
- Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. (2025). Obtenido de Global Cancer Observatory (GLOBOCAN): <https://gco.iarc.fr/en>
- Allison, R., & Moghissi, K. (Enero de 2013). Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc*, 46(1), 24-9. doi:10.5946/ce.2013.46.1.24
- American Cancer Society. (2023). Obtenido de What Is Lung Cancer?: <https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/about/what-is.html>
- American Cancer Society. (2023). Obtenido de Lung Cancer Risk Factors: <https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>
- American Type Culture Collection (ATCC). (s.f.). Obtenido de A549: <https://www.atcc.org/products/ccl-185>
- Arrieta, O., Zatarain-Barrón, Z., Aldaco, F., Barrón, F., Báez-Saldaña, R., Campos-Gómez, S., . . . De la Garza, J. (2019, Octubre). Lung Cancer in Mexico. *J Thorac Oncol*, 14(10), 1695-1700. doi:10.1016/j.jtho.2019.05.018
- Barta, J., Powell, C., & Wisnivesky, J. (22 de Enero de 2019). Global Epidemiology of Lung Cancer. *Ann Glob Health*, 85(1), 8. doi:10.5334/aogh.2419
- Bazak, J., Korytowski, W., & Girotti, A. (28 de Octubre de 2019). Bystander Effects of Nitric Oxide in Cellular Models of Anti-Tumor Photodynamic Therapy. *Cancers (Basel)*, 11(11), 1674. doi:10.3390/cancers11111674
- Berridge, M. (25 de Marzo de 2017). Calcium signalling in health and disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 485(1), 5. doi:10.1016/j.bbrc.2017.01.098
- Bootman, M., & Bultynck, G. (2 de Enero de 2020). Fundamentals of Cellular Calcium Signaling: A Primer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 12(1), a038802. doi:10.1101/cshperspect.a038802
- Brau-Figueroa, H., Palafox-Parrilla, E., & Mohar-Betancourt, A. (2020). El Registro Nacional de Cáncer en México, una realidad. *Gaceta mexicana de oncología*, 19(3), 107-108. doi:10.24875/j.gamo.20000030
- Braun, S., Gaza, N., Werdehausen, R., Hermanns, H., Bauer, I., Durieux, M., . . . Stevens, M. (2010, Septiembre). Ketamine induces apoptosis via the mitochondrial pathway

- in human lymphocytes and neuronal cells. *Br J Anaesth*, 105(3), 347-54. doi:10.1093/bja/aeq169
- Calixto, G., Bernegossi, J., de Freitas, L., Fontana, C., & Chorilli, M. (2016). Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. *Molecules*, 21(3), 342. doi:10.3390/molecules21030342
- Calori, I., & Tedesco, A. (Julio de 2016). Lipid vesicles loading aluminum phthalocyanine chloride: Formulation properties and disaggregation upon intracellular delivery. *J Photochem Photobiol B*, 160, 240-7. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.03.050
- Camello, C., & Camello, P. (2000). El ion calcio: un lenguaje celular. *Ciencia al Día*, 3(2). Obtenido de <https://www.ciencia.cl/CienciaAlDia/volumen3/numero2/articulos/articulo1.html>
- Camidge, D., Doebele, R., & Kerr, K. (Junio de 2019). Comparing and contrasting predictive biomarkers for immunotherapy and targeted therapy of NSCLC. *Nat Rev Clin Oncol*, 16(6), 341-355. doi:10.1038/s41571-019-0173-9
- Cancer Research UK. (s.f.). Obtenido de What is cancer?: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer>
- Cancer Research UK. (2023). Obtenido de Types of cancer: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer>
- Cancer Research UK. (2023). Retrieved from Types of Lung Cancer: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/lung-cancer/stages-types-grades/types>
- Cancer Research UK. (2023). Obtenido de Risks and causes of lung cancer : <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/lung-cancer/risks-causes>
- Carbone, A. (15 de Abril de 2020). Cancer Classification at the Crossroads. *Cancers (Basel)*, 12(4). doi:10.3390/cancers12040980
- Carobeli, L., Meirelles, L., Damke, G., Damke, E., Souza, M., Mari, N., . . . Consolaro, M. (2021, Diciembre 2). Phthalocyanine and Its Formulations: A Promising Photosensitizer for Cervical Cancer Phototherapy. *Pharmaceutics*, 13(12), 2057. doi:10.3390/pharmaceutics13122057
- Castano, A., Mroz, P., & Hamblin, M. (Julio de 2006). Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer*, 6(7), 535-45. doi:10.1038/nrc1894
- Centers for Disease Control and Prevention. (2024). Obtenido de Lung Cancer Treatment : <https://www.cdc.gov/lung-cancer/treatment/index.html>

- Chang, Q., Wang, P., Zeng, Q., & Wang, X. (31 de Marzo de 2024). A review on ferroptosis and photodynamic therapy synergism: Enhancing anticancer treatment. *Heliyon*, 10(7). doi:10.1016/j.heliyon.2024.e28942
- Cheng, H., Wei, S., Wei, L., & Verkhratsky, A. (Julio de 2006). Calcium signaling in physiology and pathophysiology. *Acta Pharmacol Sin*, 27(7), 767-772. doi:10.1111/j.1745-7254.2006.00399.x
- Chilakamarthi, U., Singu, P., & Giribabu, L. (2022). Photodynamic Therapy-Induced Oxidative Stress for Cancer Treatment. En *Handbook of Oxidative Stress in Cancer: Therapeutic Aspects*. Springer. doi:10.1007/978-981-16-5422-0_58
- Clapham, D. (14 de Diciembre de 2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6). doi:10.1016/j.cell.2007.11.028
- Correia, J., Rodrigues, J., Pimenta, S., Dong, T., & Yang, Z. (25 de Agosto de 2021). Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics*, 13(9), 1332. doi:10.3390/pharmaceutics13091332
- Criddle, D., Gerasimenko, J., Baumgartner, H., Jaffar, M., Voronina, S., Sutton, R., . . . Gerasimenko, O. (2007, Julio). Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? *Cell Death Differ*, 14(7), 1285-94. doi:10.1038/sj.cdd.4402150
- Criddle, D., Murphy, J., Fistetto, G., Barrow, S., Tepikin, A., Neoptolemos, J., . . . Petersen, O. (2006, Marzo). Fatty acid ethyl esters cause pancreatic calcium toxicity via inositol trisphosphate receptors and loss of ATP synthesis. *Gastroenterology*, 130(3), 781-93. doi:10.1053/j.gastro.2005.12.031
- Dąbrowski, J., & Arnaut, L. (Octubre de 2015). Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment. *Photochem Photobiol Sci*, 14(10), 1765-80. doi:10.1039/c5pp00132c
- Danese, A., Leo, S., Rimessi, A., Wieckowski, M., Fiorica, F., Giorgi, C., & Pinton, P. (2021, Julio). Cell death as a result of calcium signaling modulation: A cancer-centric prospective. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1868(8), 119061. doi:10.1016/j.bbamcr.2021.119061
- Dbouk, H., Mroue, R., El-Sabban, M., & Talhouk, R. (12 de Marzo de 2009). Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell Commun Signal*, 7. doi:10.1186/1478-811X-7-4
- de Melo Gomes, L., de Oliveira Cunha, A., Peixoto, L., Zanon, R., Botelho, F., Silva, M., . . . Ribeiro, D. (2023, Junio). Photodynamic therapy reduces cell viability, migration and triggers necroptosis in prostate tumor cells. *Photochem Photobiol Sci*, 22(6), 1341-1356. doi:10.1007/s43630-023-00382-9

- de Souza, Á., Mencialha, A., Fonseca, A., & de Paoli, F. (1 de Noviembre de 2024). Necroptosis as a consequence of photodynamic therapy in tumor cells. *Lasers Med Sci*, 39(1), 267. doi:10.1007/s10103-024-04218-5
- Decrock, E., Vinken, M., & De Vuyst, E. (2009). Connexin-related signaling in cell death: to live or let die? . *Cell Death Differ*, 16, 524–536. doi:10.1038/cdd.2008.196
- Decrock, E., Vinken, M., Bol, M., D'Herde, K., Rogiers, V., Vandenabeele, P., . . . Leybaert, L. (2011, Septiembre). Calcium and connexin-based intercellular communication, a deadly catch? *Cell Calcium*, 50(3), 310-21. doi:10.1016/j.ceca.2011.05.007
- Dolmans, D., Fukumura, D., & Jain, R. (Mayo de 2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*, 3(5), 380-7. doi:10.1038/nrc1071
- Dolmetsch, R. (21 de Enero de 2003). Excitation-transcription coupling: signaling by ion channels to the nucleus. *Sci STKE*, 2003(166), PE4. doi:10.1126/stke.2003.166.pe4
- Edwards, G., Botchway, S., Hirst, G., Wharton, C., Chipman, J., & Meldrum, R. (2004). Gap junction communication dynamics and bystander effects from ultrasoft X-rays. *Br J Cancer*, 90(7), 1450-1456. doi:10.1038/sj.bjc.6601686
- Escobar, M. L., Olga, M., Echeverría, & Vázquez-Nin, G. H. (2015). Necrosis as Programmed Cell Death. En T. Ntuli, *Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis*. IntechOpen. doi:10.5772/61483
- Garg, A., Nowis, D., Golab, J., Vandenabeele, P., Krysko, D., & Agostinis, P. (2010, Enero). Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim Biophys Acta*, 1805(1), 53-71. doi:10.1016/j.bbcan.2009.08.003
- Giannakopoulos, E., Katopodi, A., Rallis, M., Politopoulos, K., & Alexandratou, E. (Septiembre de 2024). The effect of low-dose photodynamic therapy using the photosensitizer chloroaluminum phthalocyanine on a scratch wound model in skin fibroblasts. *J Biophotonics*, 17(9), e202400033. doi:10.1002/jbio.202400033
- Gómez-Hernández, J., de Miguel, M., Larrosa, B., González, D., & Barrio, L. (2003). Molecular basis of calcium regulation in connexin-32 hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(26), 16030-16035. doi:10.1073/pnas.2530348100
- Guo, J., Lao, Y., & Chang, D. (2009). Calcium and Apoptosis. En A. Lajtha, K. Mikoshiba, A. Lajtha, & K. Mikoshiba (Edits.), *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology* (págs. 597–622). Springer. doi:10.1007/978-0-387-30370-3_33
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (Marzo de 2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hanson, B. (Septiembre de 2016). Necroptosis: A new way of dying? *Cancer Biol Ther*, 17(9), 899-910. doi:10.1080/15384047.2016.1210732

- Henderson, B., Waldow, S., Mang, T., Potter, W., Malone, P., & Dougherty, T. (1985, Febrero). Tumor destruction and kinetics of tumor cell death in two experimental mouse tumors following photodynamic therapy. *Cancer Res*, 45(2), 572-6. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3967232/>
- Hoorelbeke, D., Decrock, E., Van Haver, V., De Bock, M., & Leybaert, L. (Noviembre de 2018). Calcium, a pivotal player in photodynamic therapy? *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1865(11 Pt B), 1805-1814. doi:10.1016/j.bbamcr.2018.07.022
- Huang, Y., Li, X., Zhang, Z., Xiong, L., Wang, Y., & Wen, Y. (2023, Octubre 19). Photodynamic Therapy Combined with Ferroptosis Is a Synergistic Antitumor Therapy Strategy. *Cancers (Basel)*, 15(20), 5043. doi:10.3390/cancers15205043
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía . (2024). Obtenido de Estadísticas a propósito del Día Mundial contra el Cáncer: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2024/EAP_CANCER24.pdf
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (30 de Enero de 2025). *Comunicado de prensa 39/25*. Obtenido de Estadísticas a propósito del Día Mundial contra el Cáncer: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2025/EAP_DMvsCancer25.pdf
- Instituto Nacional del Cáncer. (s.f.). Obtenido de ¿Qué es el cáncer?: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2023). Obtenido de Definición de apoptosis - Diccionario de cáncer: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/apoptosis>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2023). Obtenido de Definición de angiogénesis - Diccionario de cáncer: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/angiogenesis>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2023). Obtenido de Hoja informativa sobre inhibidores de la angiogénesis: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia/hoja-informativa-inhibidores-angiogenesis>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2023). Obtenido de Definición de metástasis - Diccionario de cáncer: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/metastasis>

- Instituto Nacional del Cáncer. (2023). Obtenido de Estadísticas del cáncer: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/estadisticas>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2023). Obtenido de Diagnóstico y estadificación: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2023). Obtenido de Estadificación del cáncer: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2023). Obtenido de Tipos de tratamiento del cáncer: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2023). Obtenido de Quimioterapia para tratar el cáncer: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/chemotherapy>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2023). Obtenido de Radioterapia para tratar el cáncer: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2023). Obtenido de Terapia dirigida para tratar el cáncer: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2023). Obtenido de Inmunoterapia para tratar el cáncer: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2023). *Factores de riesgo del cáncer*. Obtenido de Factores de riesgo del cáncer: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2025). Obtenido de Prevención, detección del cáncer y diagnóstico precoz: <https://healthcaredelivery.cancer.gov/prevention/>
- Jones, C., & Hazlehurst, L. (11 de Septiembre de 2021). Role of Calcium Homeostasis in Modulating EMT in Cancer. *Biomedicines*, 9(9), 1200. doi:10.3390/biomedicines9091200
- Kandouz, M., & Batist, G. (Julio de 2010). Gap junctions and connexins as therapeutic targets in cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 14(7), 681-92. doi:10.1517/14728222.2010.487866
- Kessel, D., & Luo, Y. (Febrero de 1998). Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. *J Photochem Photobiol B*, 42(2), 89-95. doi:10.1016/s1011-1344(97)00127-9
- Khaleque, M., Kim, J.-H., Tanvir, M., Park, J.-B., & Kim, Y.-Y. (2024). Significance of Necroptosis in Cartilage Degeneration. *Biomolecules*, 14(9), 1192. doi:10.3390/biom14091192
- Kim, J., Lee, H., & Huang, B. (1 de Mayo de 2022). Lung Cancer: Diagnosis, Treatment Principles, and Screening. *Am Fam Physician*, 105(5), 487-494. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35559635/>

- Kim, T., & Chang, J. (31 de Agosto de 2023). Recent Studies in Photodynamic Therapy for Cancer Treatment: From Basic Research to Clinical Trials. *Pharmaceutics*, 15(3), 2257. doi:10.3390/pharmaceutics15092257
- Kubrak, T., Kołodziej, P., Sawicki, J., Mazur, A., Koziorowska, K., & Aebisher, D. (2022, Febrero 10). Some Natural Photosensitizers and Their Medicinal Properties for Use in Photodynamic Therapy. *Molecules*, 27(4). doi:10.3390/molecules27041192
- Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzińska, E., Knap-Czop, K., . . . Kulbacka, J. (Octubre de 2018). Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother*, 106, 1098-1107. doi:10.1016/j.biopha.2018.07.049
- La'ah, A., & Chiou, S.-H. (2024). Cutting-Edge Therapies for Lung Cancer. *Cells*, 13(5), 436. doi:10.3390/cells13050436
- León-Fuentes, I., Salgado-Gil, M., Novoa, M., & Retamal, M. (2023). Connexins in Cancer, the Possible Role of Connexin46 as a Cancer Stem Cell-Determining Protein. *Biomolecules*, 13(10), 1460. doi:10.3390/biom13101460
- Li, H., & Cao, W. (Junio de 2020). Pulmonary enteric adenocarcinoma: a literature review. *J Thorac Dis*, 12(6), 3217-3226. doi:10.21037/jtd-19-4171
- Lung Cancer Research Foundation. (2024). Retrieved from Lung Cancer Types: <https://www.lung.org/lung-health-diseases/lung-disease-lookup/lung-cancer/basics/lung-cancer-types>.
- Luo, K., Chen, C., Yang, J., Huang, Y., Cardenas, E., & Jiang, J. (2020, Diciembre 23). Connexins in Lung Cancer and Brain Metastasis. *Front Oncol*, 10. doi:10.3389/fonc.2020.599383
- Ma, Y., Han, X., de Castro, R., Zhang, P., Zhang, K., Hu, Z., & Qin, L. (2018, Mayo 9). Analysis of the bystander effect in cone photoreceptors via a guided neural network platform. *Sci Adv*, 4(5), eaas9274. doi:10.1126/sciadv.aas9274
- Mariño-Ocampo, N., Dibona-Villanueva, L., Escobar-Álvarez, E., Guerra-Díaz, D., Zúñiga-Núñez, D., Fuentealba, D., & Robinson-Duggon, J. (2023, Marzo). Recent Photosensitizer Developments, Delivery Strategies and Combination-based Approaches for Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol*, 99(2), 469-497. doi:10.1111/php.13749
- Ming, L., Cheng, K., Chen, Y., Yang, R., & Chen, D. (Enero de 2021). Enhancement of tumor lethality of ROS in photodynamic therapy. *Cancer Med*, 10(1), 257-268. doi:10.1002/cam4.3592
- Mishchenko, T., Balalaeva, I., Gorokhova, A., Vedunova, M., & Krysko, D. (13 de Mayo de 2022). Which cell death modality wins the contest for photodynamic therapy of cancer? *Cell Death Dis*, 13(5), 455. doi:10.1038/s41419-022-04851-4

- Mo, X., Phan, N., Nguyen, T., & Kim, J. (30 de Octubre de 2024). H₂O₂ Self-Supplying CaO₂ Nanoplatfom Induces Ca²⁺ Overload Combined with Chemodynamic Therapy to Enhance Cancer Immunotherapy. *ACS Appl Mater Interfaces*, *16*(43), 58337-58345. doi:10.1021/acsami.4c12748
- Moloudi, K., Sarbadhikary, P., Abrahamse, H., & George, B. (16 de Julio de 2023). Understanding the Photodynamic Therapy Induced Bystander and Abscopal Effects: A Review. *Antioxidants (Basel)*, *12*(7), 1434. doi:10.3390/antiox12071434
- Monteith, G. P.-T. (Junio de 2017). The calcium-cancer signalling nexus. *Nat Rev Cancer*, *17*(6), 367-380. doi:10.1038/nrc.2017
- National Human Genome Research Institute. (2023). Obtenido de Apoptosis - Genetics Home Reference : <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Apoptosis>
- Naus, C., & Laird, D. (2010). Implications and challenges of connexin connections in cancer. *Nat Rev Cancer*, *10*(6), 435-441. doi:10.1038/nrc2846
- Nicholls, D. (Septiembre-Octubre de 2005). Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium*, *38*(3-4), 311-7. doi:10.1016/j.ceca.2005.06.011
- Nicholson, A., Tsao, M., Beasley, M., Borczuk, A., Brambilla, E., Cooper, W., . . . Travis, W. (Marzo de 2022). The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *J Thorac Oncol*, *17*(3), 362-387. doi:10.1016/j.jtho.2021.11.003
- Organización Mundial de la Salud. (s.f.). Obtenido de Cáncer: <https://www.who.int/es/health-topics/cancer>
- Organización Mundial de la Salud. (2025). Obtenido de Promoción del diagnóstico precoz del cáncer: <https://www.who.int/activities/promoting-cancer-early-diagnosis>
- Pedreira, L., Ros, U., & García-Sáez, A. (Septiembre de 2023). Calcium as a master regulator of ferroptosis and other types of regulated necrosis. *Cell Calcium*, *114*, 102778. doi:10.1016/j.ceca.2023.102778
- Peterlik, M., Grant, W., & Cross, H. (Septiembre de 2009). Calcium, vitamin D and cancer. *Anticancer Res*, *29*(9), 3687-98. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19667166/>
- Piña-Sánchez, P., Chávez-González, A., Ruiz-Tachiquín, M., Vadillo, E., Monroy-García, A., Montesinos, J., . . . Mayani, H. (2021, Enero - Diciembre). Cancer Biology, Epidemiology, and Treatment in the 21st Century: Current Status and Future Challenges From a Biomedical Perspective. *Cancer Control*, *28*. doi:10.1177/10732748211038735
- Prakriya, M. (Mayo de 2020). Calcium and cell function. *J Physiol*, *598*(9), 1647-1648. doi:10.1113/JP279541

- Prakriya, M., & Lewis, R. (2015, Octubre). Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev*, 95(4), 1383-436. doi:10.1152/physrev.00020.2014
- Ramazi, S., Dadzadi, M., Sahafnejad, Z., & Allahverdi, A. (26 de Octubre de 2023). Epigenetic regulation in lung cancer. *MedComm*, 4(6). doi:10.1002/mco2.401
- Ramírez-Tirado, L., Uribe-Ortiz, C., Arrieta, O., & Tirado-Gómez, L. (2019). Mortalidad por cáncer de pulmón y marginación municipal en México, 1998-2016. *Salud Pública Mex*, 61(3), 249-256. doi:10.21149/10083
- Reiners, J. J., Agostinis, P., Berg, K., Oleinick, N., & Kessel, D. (Enero de 2010). Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy*, 6(1), 7-18. doi:10.4161/auto.6.1.10220
- Reynoso-Noverón, N., Torres-Domínguez, J., Morales-Juárez, L., & Mohar-Betancourt, A. (2023). Análisis de la mortalidad por cáncer en México utilizando los resultados del Global Burden of Disease 2021. *Gaceta Médica de México*, 159(6), 591-599. doi:10.24875/gmm.23000403
- Sai, D., Lee, J., Nguyen, D., & Kim, Y. (2021). Tailoring photosensitive ROS for advanced photodynamic therapy. *Exp Mol Med*, 53(4), 495–504. doi:10.1038/s12276-021-00599-7
- Schalper, K., Carvajal-Hausdorf, D., & Oyarzo, M. (27 de Junio de 2014). Possible role of hemichannels in cancer. *Front Physiol*, 5, 237. doi:10.3389/fphys.2014.00237
- SEER Training Modules. (2023). Obtenido de Cancer Classification: <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>
- Shafirstein, G., Battoo, A., Harris, K., Baumann, H., Gollnick, S., Lindenmann, J., & Nwogu, C. (2016, Febrero). Photodynamic Therapy of Non-Small Cell Lung Cancer. Narrative Review and Future Directions. *Ann Am Thorac Soc*, 13(2), 265-75. doi:10.1513/AnnalsATS.201509-650FR
- Skoulidis, F., & Heymach, J. (Septiembre de 2019). Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*, 19(9), 495-509. doi:10.1038/s41568-019-0179-8
- Sociedad Americana Contra El Cáncer. (s.f.). Obtenido de ¿Qué es el cáncer?: <https://www.cancer.org/es/cancer/entendimiento-del-cancer/que-es-el-cancer.html>
- Sociedad Americana contra el Cáncer. (2025). Obtenido de Estadificación del cáncer: <https://www.cancer.org/cancer/diagnosis-staging/staging.html>
- Sociedad Americana contra el Cáncer. (2025). Obtenido de Datos y cifras sobre prevención y detección temprana del cáncer: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/cancer-prevention-early-detection.html>

- Spray, D., Hanstein, R., Lopez-Quintero, S., Stout, R., Jr, S. S., & Thi, M. (2013, Enero). Gap junctions and Bystander Effects: Good Samaritans and executioners. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal*, 2(1), 1-15. doi:10.1002/wmts.72
- Stanford Health Care. (2023). Obtenido de Cancer causes: <https://stanfordhealthcare.org/medical-conditions/cancer/cancer/cancer-causes.html>
- Stanford Health Care. (2024). Obtenido de Types of Surgery for Cancer Treatment: <https://stanfordhealthcare.org/medical-treatments/c/cancer-surgery/types.html>
- Steinfort, D., & Herth, F. (Septiembre de 2020). Bronchoscopic treatments for early-stage peripheral lung cancer: Are we ready for prime time? *Respirology*, 25(9), 944-952. doi:10.1111/resp.13903
- Sukumaran, P., Nascimento Da Conceicao, V., Sun, Y., Ahamad, N., Saraiva, L., Selvaraj, S., & Singh, B. (2021, Agosto 18). Calcium Signaling Regulates Autophagy and Apoptosis. *Cells*, 10(8), 2125. doi:10.3390/cells10082125
- Sun, W., Wu, X., Gao, H., Yu, J., Zhao, W., Lu, J., . . . Chen, X. (2017, Julio). Cytosolic calcium mediates RIP1/RIP3 complex-dependent necroptosis through JNK activation and mitochondrial ROS production in human colon cancer cells. *Free Radic Biol Med*, 108, 433-444. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.010
- Sun, W., Zhang, Q., Wang, X., Jin, Z., Cheng, Y., & Wang, G. (2024). Clinical Practice of Photodynamic Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer in Different Scenarios: Who Is the Better Candidate? *Respiration*, 103(4), 193-204. doi:10.1159/000535270
- Sundararajan, R., Salameh, T., Camarillo, I., Prabu, R., Natarajan, A., & Sankaranarayanan, K. (2014). Irreversible electroporation: a drug-free cancer treatment. In R. Sundararajan, *Electroporation-Based Therapies for Cancer*. doi:10.1533/9781908818294.219
- Swain, R., Kemp, S., Goldstraw, P., Tetley, T., & Stevens, M. (21 de Abril de 2010). Assessment of cell line models of primary human cells by Raman spectral phenotyping. *Biophys J*, 98(8), 1703-11. doi:10.1016/j.bpj.2009.12.4289
- Tajiri, H., Hayakawa, A., Matsumoto, Y., Yokoyama, I., & Yoshida, S. (19 de Junio de 1998). Changes in intracellular Ca²⁺ concentrations related to PDT-induced apoptosis in photosensitized human cancer cells. *Cancer Lett*, 128(2), 205-10. doi:10.1016/s0304-3835(98)00066-4
- Thandra, K., Barsouk, A., Saginala, K., Aluru, J., & Barsouk, A. (2021). Epidemiology of lung cancer. *Contemp Oncol (Pozn)*, 25(1), 45-52. doi:10.5114/wo.2021.103829

- Thun, M., Linet, M., Cerhan, J., Haiman, C., & Schottenfeld, D. (2017). *Cancer Epidemiology and Prevention* (Cuarta ed.). Nueva York: Oxford University Press. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK195369/>
- Travis, W., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A., Geisinger, K. Y., Ishikawa, Y., . . . Tsao, M. (2013, Mayo). Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med*, *137*(5), 668-84. doi:10.5858/arpa.2012-0263-RA
- Usuda, J., Inoue, T., Tsuchida, T., Ohtani, K., Maehara, S., Ikeda, N., . . . Oka, K. (2020, Junio). Clinical trial of photodynamic therapy for peripheral-type lung cancers using a new laser device in a pilot study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, *30*, 101698. doi:10.1016/j.pdpdt.2020.101698
- Usuda, J., Kato, H., Okunaka, T., Furukawa, K., Tsutsui, H., Yamada, K., . . . Tsuboi, M. H. (2006, Junio). Photodynamic therapy (PDT) for lung cancers. *J Thorac Oncol*, *1*(5), 489-93. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17409904/>
- van Straten, D., Mashayekhi, V., de Bruijn, H., Oliveira, S., & Robinson, D. (18 de Febrero de 2017). Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers (Basel)*, *9*(2), 19. doi:10.3390/cancers9020019
- Verkhatsky, A., & Toescu, E. (Enero de 1998). Calcium and neuronal ageing. *Trends Neurosci*, *21*(1), 2-7. doi:10.1016/s0166-2236(97)01156-9
- Wang, R., Zhou, T., Liu, W., & Zuo, L. (6 de Abril de 2018). Molecular mechanism of bystander effects and related abscopal/cohort effects in cancer therapy. *Oncotarget*, *9*(26), 18637-18647. doi:10.18632/oncotarget.24746
- Wu, H., Zhang, Y., Jiang, L., & Huang, H. (2025). Photodynamic therapy with photodegradable photosensitizers. *Chem Commun*, *61*(13), 2627-2635. doi:10.1039/d4cc05091f
- Wu, L., Lian, W., & Zhao, L. (Noviembre de 2021). Calcium signaling in cancer progression and therapy. *FEBS J*, *288*(1), 6187-6205. doi:10.1111/febs.16133
- Wu, R., Chu, E., Kwok, K., & Huang, Z. (2023). Influence of cytosol calcium ion level on PDT efficacy in nasopharyngeal carcinoma cell line. *Annals of Oncology*, *34*(Suppl 3). doi:10.1016/j.annonc.2023.09.382
- Wu, R., Chu, E., Kwok, K., & Huang, Z. (2023). P37-7 Influence of cytosol calcium ion level on PDT efficacy in nasopharyngeal carcinoma cell line. *Annals of Oncology*, *34*(3), S1455-S1456. doi:10.1016/j.annonc.2023.09.382.

- Yang, P., Chang, Y., Zhang, J., & Gao F, L. X. (Enero de 2023). The combination of in situ photodynamic promotion and ion-interference to improve the efficacy of cancer therapy. *J Colloid Interface Sci*, 629(Pt A), 522-533. doi:10.1016/j.jcis.2022.08.125
- Yu, E., & Sharma, S. (14 de Agosto de 2023). Obtenido de Physiology, Calcium: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482128/>
- Zhao, W., Wang, L., Zhang, M., Liu, Z., Wu, C., Pan, X., . . . Quan, G. (2024, Junio 22). Photodynamic therapy for cancer: mechanisms, photosensitizers, nanocarriers, and clinical studies. *MedComm (2020)*, 5(7), e603. doi:10.1002/mco2.603
- Zheng, S., Wang, X., Zhao, D., Liu, H., & Hu, Y. (Abril de 2023). Calcium homeostasis and cancer: insights from endoplasmic reticulum-centered organelle communications. *Trends Cell Biol*, 33(4), 312-323. doi:10.1016/j.tcb.2022.07.004
- Zhivotovsky, B., & Orrenius, S. (Septiembre de 2011). Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community. *Cell Calcium*, 50(3), 211-21. doi:10.1016/j.ceca.2011.03.003
- Zhou, M., Zheng, M., Zhou, X., Tian, S., Yang, X., Ning, Y., . . . Shiwu, Z. (2023). The roles of connexins and gap junctions in the progression of cancer. *Cell Commun Signal*, 21(8), 1-19. doi:10.1186/s12964-022-01009-9
- Zhou, Z., Chai, W., Liu, Y., Liu, Y., Pan, H., Wu, Q., & Zhang, X. (2022). Connexin 43 overexpression induces lung cancer angiogenesis in vitro following phosphorylation at Ser279 in its C-terminus. *Oncol Lett*, 24(3), 293. doi:10.3892/ol.2022.13413