



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA

**“Participación de las conexinas en la propagación de señales de calcio generadas por un estímulo fotodinámico en la línea celular tumoral MCF-7”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

Presenta:

Coris Alin Vera del Razo

Director de tesis:

Dr. Fabián Galindo Ramírez

Puebla, Pue.

Junio, 2018

## **AGRADECIMIENTOS**

Al doctor Fabián Galindo Ramírez por la oportunidad para realizar este trabajo en el Laboratorio de Cáncer y Comunicación Intercelular, por su compromiso y apoyo para la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado el Dr. Eduardo Monjaráz Guzmán y el Dr. José Everardo Avelino Cruz y a la Dra. María Rosa Padros por sus aportaciones y por el tiempo invertido en la revisión de este trabajo de tesis.

A la Dra. Laura Hernández Aragón, técnico académico del Laboratorio de Cáncer y Comunicación Intercelular, por su ayuda en el laboratorio y apoyo en el desarrollo experimental.

Al Biol. José Luis Córdoba de la Cruz, responsable del Laboratorio de Microscopía por su ayuda y disposición al trabajo.

A la Dra. Irma Cruz Solís del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey por su apoyo en el desarrollo experimental.

También a la M. en C. Silvia Durán González, técnico académico del Laboratorio de Bioquímica celular y a la Lic. BM. Lorena Arroyo Ríos, técnico académico del laboratorio de Neuromodulación, por las facilidades técnicas que brindaron durante el desarrollo del proyecto.

*“Agradezco al Consejo Nacional de ciencia y tecnología (CONACYT) dado mediante la beca como alguna de maestría”*

*“Se agradece a la vicerrectoría de investigación y estudios de posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del programa de investigación y posgrado aseguramiento de la calidad en el posgrado indicador establecido en el plan de desarrollo institucional 2013-2017”*

## ÍNDICE GENERAL

Resumen .....	I
Abreviaturas .....	III
Introducción .....	1
Justificación .....	20
Hipótesis .....	21
Objetivos .....	22
Metodología .....	23
Resultados .....	26
Discusión .....	45
Perspectivas .....	57
Conclusiones .....	58
Bibliografía .....	59

## RESUMEN

De acuerdo con la Organización Mundial de la salud, el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (OMS, 2015). Diferentes herramientas se han utilizado para describir y comprender el cáncer de mama y así generar mecanismos de diagnóstico y terapia, y la comunicación intercelular puede ser aprovechada para combatirlo. La terapia fotodinámica ofrece la posibilidad de generar y/o liberar sustancias que pueden ser enviadas a las células vecinas a través de *gap junctions* y así ayudar a su erradicación. Las conexinas forman hemicanales y dos hemicanales forman una *gap junction*.

En varios tipos celulares, las elevaciones transitorias intracelulares de  $Ca^{2+}$  inducidas en células individuales son propagadas en forma de ondas a las células vecinas (Stout *et al.*, 2004). En una sola célula, incrementos sostenidos de  $Ca^{2+}$  pueden estar asociados con la muerte celular (Monteith *et al.*, 2017). Las conexinas, formando hemicanales y/o *gap junctions* pueden jugar un rol importante en la regulación de la concentración del  $Ca^{2+}$  intracelular (Nielsen *et al.*, 2012). Este  $Ca^{2+}$  intracelular ha sido reconocido como factor contribuyente de una forma importante en varias modalidades de muerte celular como necrosis, apoptosis y anoikis, así como en la necroptosis y la autofagia (La Rovere *et al.*, 2016). En este proyecto se probaron dos bloqueadores inespecíficos de conexinas para dilucidar el papel de las mismas, en la propagación de la señal de  $Ca^{2+}$  posterior a la terapia fotodinámica, para así generar evidencia de la transmisión de la señal de muerte a las células adyacentes a la tratada con la terapia.

Nuestros resultados indican que las células MCF-7 tienen la capacidad de absorber el fotosensibilizador que empleamos, AICIPc. Cuando activamos dicha sustancia con una luz de longitud de onda localizada en el espectro del rojo lejano (640 nm), genera un incremento en el nivel intracelular de  $Ca^{2+}$  de la célula irradiada y de aquellas que se encuentran cercanas a ella. Esta propagación puede estar siendo favorecida por la presencia de conexinas que forman *gap junctions* y hemicanales. En este trabajo también corroboramos la presencia de las conexinas 26 y 43 en las células MCF-7 y observamos que el bloqueo de la comunicación mediada por estas

proteínas disminuye el incremento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células cercanas a la célula irradiada. También pudimos demostrar que el bloqueo de la comunicación mediado por conexinas disminuye el número de células muertas a consecuencia de esta terapia.

La fotoactivación es el principio fundamental de la Terapia Fotodinámica (TFD), una terapia que presenta grandes ventajas como tratamiento para diferentes patologías, entre las que destaca el cáncer. Entender los mecanismos intracelulares que desencadena, así como la importancia que juega la comunicación intercelular en la propagación de las sustancias que pueden ocasionar daño a las células vecinas nos ayudaría a comprender mejor el fenómeno conocido como *efecto bystander* y mejorar la terapéutica para combatir diferentes tipos de neoplasias.

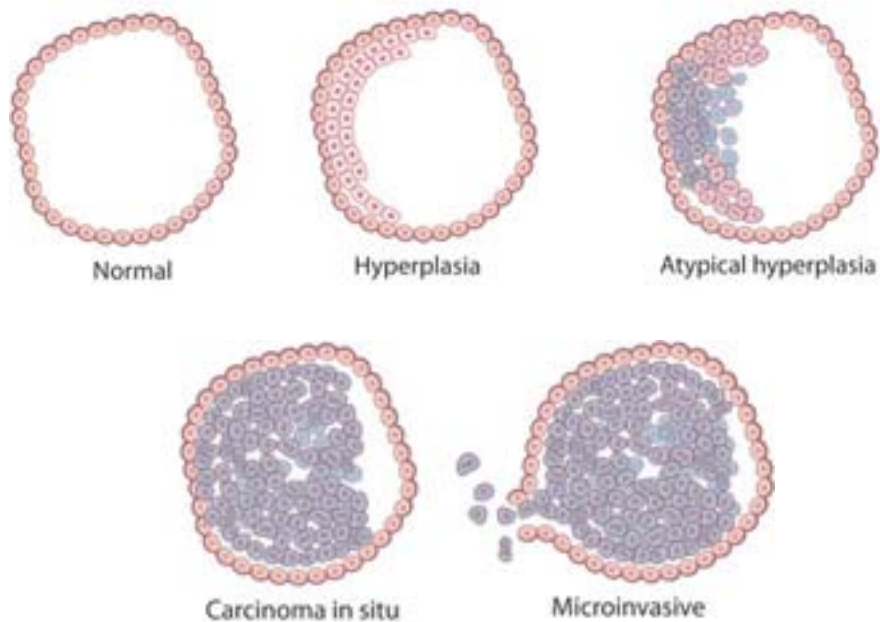
## ABREVIATURAS

$[Ca^{2+}]_i$	Concentración de calcio intracelular
AFF	Ácido flufenámico
AlClPc	Aluminio-Cloro ftalocianina
$Ca^{2+}$	Calcio
CBX	Carbenoxolona
CM	Cáncer mamario
TFD	Terapia fotodinámica

## INTRODUCCIÓN

### *Cáncer*

Cáncer, carcinoma o neoplasia maligna es el nombre que reciben un conjunto de enfermedades relacionadas (NCI, 2015). La función reguladora del ciclo de vida celular es dirigida por proteínas de interacción que mantienen la masa de tejido en un estado “estacionario” de reproducción y muerte. En el cáncer, este balance sufre disturbios a partir de mutaciones en los genes que codifican funciones regulatorias críticas. El resultado es una masa celular agresiva, altamente metabólica y que, típicamente, presenta tendencias de inmortalidad (Horne *et al.*, 2012). La muerte celular ayuda a la vida mediante la eliminación de células dañadas y células superfluas que son capaces de causar daño y, por lo tanto, necesitan ser destruidas para el beneficio de todo el organismo (Mfouo-Tynga y Abrahamse, 2015). Así, el cáncer es una enfermedad heterogénea, donde numerosos cambios genéticos resultan en un desbalance de la proliferación, alteración de los mecanismos de apoptosis (muerte celular), alteración de la expresión de múltiples genes, generación de inestabilidad genética (Silva, *et al.*, 2016).



**Figura1. Microevolución de una célula cancerosa.** Una serie de mutaciones en una célula hace que prolifere más, acumule mutaciones que posteriormente la convierten en



hiperplasia atípica. La propagación de las células cancerosas a otros tejidos y órganos (metástasis) ocurre cuando la adhesión de estas células cancerosas se descompone y pueden viajar fácilmente a nuevas ubicaciones (Nature education, 2010).

De acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Se le atribuyen 8,2 millones de defunciones ocurridas en todo el mundo en 2012. Hasta el año 2012, la OMS reporta que hubo alrededor de 14 millones de nuevos casos y se prevé que aumente un 70% aproximadamente para el año 2022. Se sabe también que más del 60% de los nuevos casos anuales totales del mundo se producen en África, Asia, América Central y Sudamérica. Estas regiones representan el 70% de las muertes por cáncer en el mundo (OMS, 2015).

Los principales tipos de cáncer son los siguientes: cáncer pulmonar (1,59 millones de defunciones), cáncer hepático (745 000 defunciones); cáncer gástrico (723 000 defunciones); cáncer colorrectal (694 000) defunciones; cáncer mamario (CM) (521 000 defunciones) y cáncer de esófago (400 000 defunciones) (AIRC, 2014). Con base en los datos de Globocan 2002, el CM es el cáncer más común en las mujeres afectando aproximadamente a 1.2 millones. La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer en la publicación GLOBOCAN 2008 reveló que 1.3 millones de nuevos casos de CM fueron diagnosticados lo que representa el 23% de todos los casos de cáncer en el mundo (Ferlay et al. 2010).

El cáncer de mama es un problema mundial de salud para las mujeres, es el primero en incidencia y el segundo en mortalidad sobre todos los tipos de cáncer, incluso con los recientes avances tecnológicos (dos Santos, *et al.*, 2017). Se estima que 37mil mujeres mueren de cáncer de mama (CM) cada año en América Latina y el Caribe. El CM es el más común y mata a más mujeres que cualquier otro tipo de cáncer en la región y se espera que el número de defunciones por este, se duplique para 2030, a 74,000 cada año. El envejecimiento es el principal factor de riesgo del CM. Los cambios en la estructura demográfica causarán cambios epidemiológicos, es decir, en Brasil o México para 2020, el CM se enfocará en proporciones epidémicas (Justo *et al.* 2013).

En el Perú, México, Colombia y Brasil, el diagnóstico y la muerte a edades más tempranas privan a la sociedad de numerosos años productivos. Los altos índices de mortalidad e incidencia en América Latina indican una pobre supervivencia, en parte debido a la etapa tardía en el momento del diagnóstico y el acceso al tratamiento. Entre 2002 y 2008, la incidencia y la mortalidad disminuyeron en todos los países, aunque de manera desigual, en México reflejan principalmente el crecimiento de la incidencia en lugar del progreso en los resultados. El diagnóstico precoz y el acceso de toda la población al tratamiento basado en la evidencia siguen sin resolverse, a pesar de los progresos logrados por algunos países (UICC, 2016).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, en el perfil de México respecto al cáncer 2014, de un total de 38 mil muertes de mujeres el 15.8% corresponde a muertes por CM, es decir, entre todos los cánceres es la principal causa de muerte por cáncer en la mujer, con una incidencia de poco más 20 mil casos por cada 50 mil (WHO, 2018).

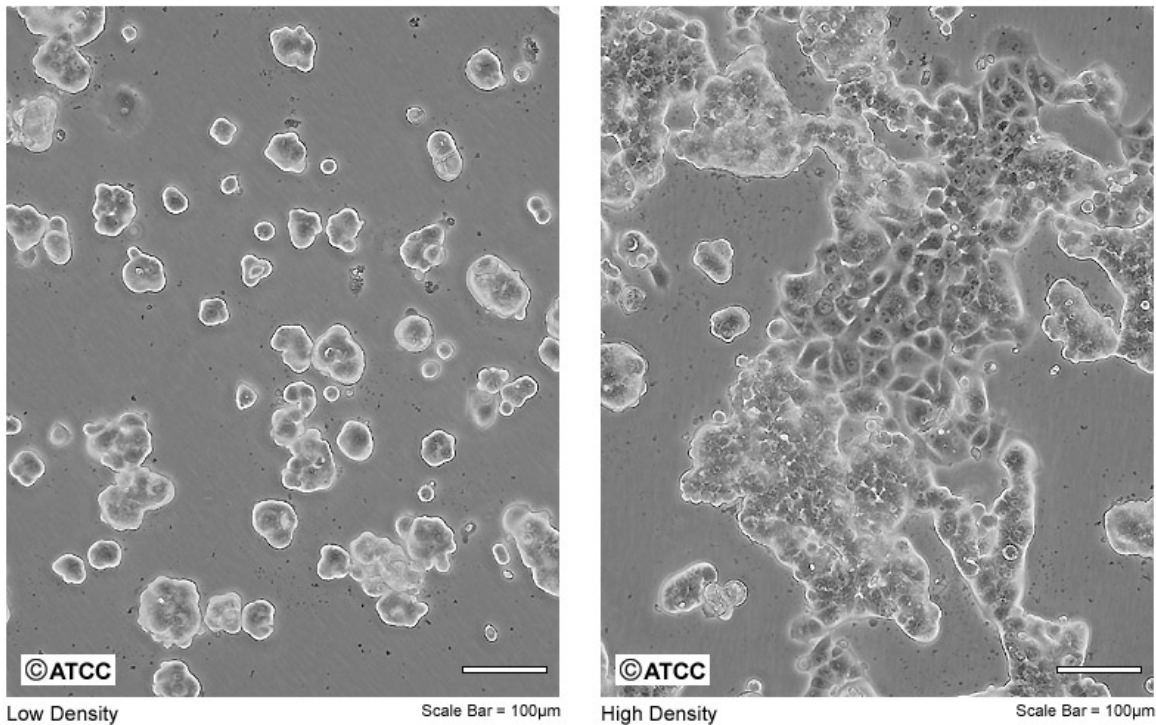
Aunque las causas del CM siguen siendo en gran parte desconocidas, los factores de riesgo como la historia familiar de CM, la edad temprana en la menarquia y la edad avanzada al primer parto, el uso de hormonas, la obesidad, y el alcohol se han identificado como factores que pueden el riesgo de CM (PAHO, 2012). La detección temprana, el diagnóstico preciso y el tratamiento adecuado son los métodos actualmente disponibles para prevenir la muerte por CM.

El CM es una enfermedad heterogénea, con numerosos cambios genéticos resultantes en un desbalance de la proliferación celular, alteración en los mecanismos de apoptosis, alteración de la expresión de varios genes generando inestabilidad genética además de otros factores (Silva *et al.*, 2016).

Las células cancerosas pueden influir en las células normales, en las moléculas y en los vasos sanguíneos que rodean, zona que se conoce como el microambiente. Éstas mismas células, pueden inducir a las células normales cercanas para que formen vasos sanguíneos (angiogénesis) que suministren oxígeno y nutrientes, necesarios para que crezcan los tumores (Granger, 2010).

Diferentes herramientas se han utilizado para describir y comprender el CM y así generar mecanismos de diagnóstico y terapia. Los desafíos en la lucha contra la enfermedad dependen de la resistencia tumoral intrínseca, propiedades y heterogeneidad molecular así como su potencial metastásico (dos Santos, *et al.*, 2017). Los subtipos de CM están definidos con en base a la presencia de receptores a estrógenos, progesterona y el receptor al factor de crecimiento epitelial humano (HER2). La línea celular de cáncer de mama MCF-7 descrita por Soule en 1972 se derivó de un derrame pleural, tomado de una paciente con CM y a partir de este punto se convirtió en uno de los modelos de estudio de cáncer más utilizados por la resistencia a la muerte debido a la eliminación parcial del gen de la caspasa-3 (Levenson *et al.*, 1997 y Horne *et al.*, 2012). Las variantes de la línea MCF-7 son, en muchas maneras, modelos análogos *in vivo* de los fenotipos resistentes a la apoptosis más agresivos inducidos por terapias para el cáncer (Simstein, *et al.*, 2003).

ATCC Number: **HTB-22**  
Designation: **MCF-7**



**Figura 2. Células de cáncer de mama de la línea MCF-7 (ATCC, 2014).**

## *Tratamientos para el cáncer*

El tratamiento para el cáncer es muy variado, la elección del tratamiento adecuado está determinado por varios factores, incluyendo el tipo, las condiciones generales del paciente y, por supuesto, cuál sea el objetivo buscado: curarlo, evitar que se extienda, o aliviar los síntomas causados por éste. Han de considerarse los riesgos y beneficios al momento de elegir un tratamiento, como lo son la oportunidad de la cura definitiva, los efectos potenciales a corto y largo plazo, la probabilidad de que el cáncer regrese después del tratamiento, las posibilidades de vivir con o sin el tratamiento y los efectos en la calidad de vida e independencia.

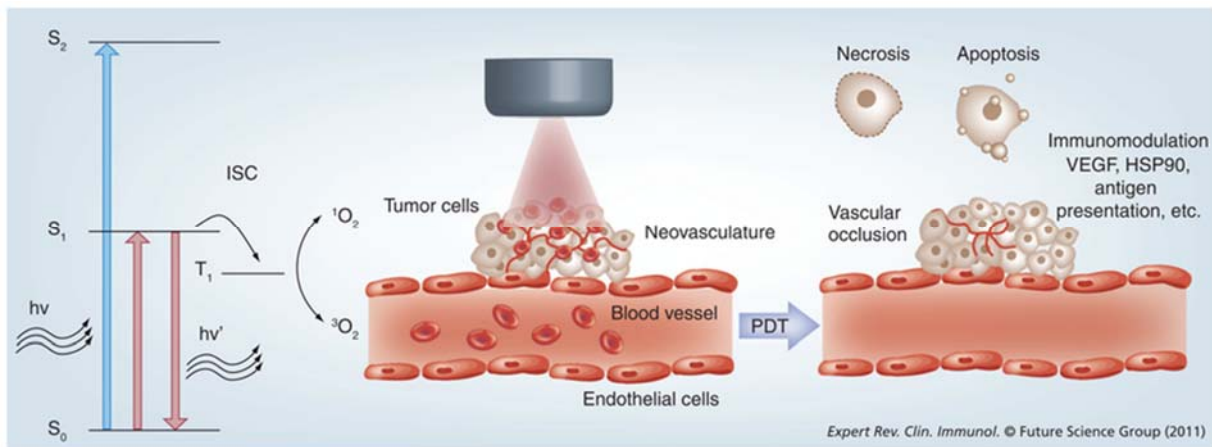
Dependiendo de todos estos factores, el paciente puede recibir uno o varios de los tratamientos que se mencionan a continuación: cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia o terapia biológica y en casos muy particulares, el trasplante de células hematopoyéticas.

## *Terapia fotodinámica*

Un tratamiento ampliamente utilizado para los diversos tipos de neoplasias es la quimioterapia, en ella se hace uso de fármacos con la finalidad de matar a las células cancerosas. Hay más de 100 fármacos disponibles para tratar el cáncer y pueden ser administrados por vía intravenosa, oral, intraperitoneal e incluso vía tópica. Un importante grupo de fármacos empleados en la quimioterapia son los fotosensibilizadores, sustancias activadas por determinado tipo de luz y que son empleadas en la terapia fotodinámica (TFD) contra el cáncer (Smits y Moor, 2009).

La terapia fotodinámica está basada en un enfoque fotoquímico, empleada principalmente en oncología, oftalmología y dermatología, utiliza una sustancia química sensible a la luz, denominada fotosensibilizador, y luz a determinadas longitudes de onda para inducir la citotoxicidad por la generación de especies reactivas de oxígeno que incluyen radicales hidroxilos (-OH), alcoxilos (RO-) o

peróxidos (ROO-) y algunas especies de radicales de vida media como superóxido (O<sub>2</sub>-) o el radical nitroxilo (NO-), los no radicales peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hidroperóxidos orgánicos (ROOH) y ácido hipocloroso (HOCl) (Calì *et al.*, 2015 y Simons *et al.*, 2000) y otras especies moleculares reactivas (Celli *et al.*, 2010). Consiste en un procedimiento de aplicación de agentes fotosensibilizadores en combinación con la luz visible, en presencia de oxígeno molecular para obtener un efecto terapéutico (Bonnett, 2004).



**Figura 3. Mecanismo antitumoral de la TFD.** El diagrama ilustra la absorción de luz por el fotosensibilizador que pasa de un estado fundamental al estado siglete, produciendo ROS que propician el daño a las células tumorales (Mroz *et al.*, 2011).

El éxito de la terapia fotodinámica ha atraído mucha atención por el uso de la luz para inducir reacciones citotóxicas para aplicaciones en medicina. Los atractivos de la terapia fotodinámica, desde el punto de vista terapéutico, se encuentran en la naturaleza única de los efectos biológicos generados. Éste tratamiento induce estrés oxidativo, la muerte de las células cancerosas directamente irradiadas y cierre de la microvasculatura tumoral. La relativa falta de resistencia inducida y el proceso de curación que implica la regeneración de los tejidos normales en lugar de cicatrización, hace de la terapia fotodinámica una opción terapéutica viable que se puede utilizar para una variedad de tumores, en combinación o como alternativa a los tratamientos contra el cáncer ya consolidados (Kennet, 2015).

Agentes fotosensibilizadores tales como fenotiazina, porfirinas y ftalocianinas contienen estructuras macrocíclicas con sitios accesibles para ser excitados bajo radiación de luz visible. Estas moléculas tienen la capacidad de acumularse en tejidos y células saludables y presentan poca o ninguna toxicidad; sin embargo, después de aplicar el estímulo luminoso, son excitadas en presencia de oxígeno molecular para finalmente inducir un efecto letal en los tejidos afectados (Kennet, 2015).

En ensayos clínicos y experimentales, la mayoría de fotosensibilizadores se localizan en la membrana plasmática, lisosomas, mitocondria, retículo endoplásmico y aparato de Golgi (Mfouo-Tynga y Abrahamse, 2015). La localización subcelular del fotosensibilizador en organelos celulares extremadamente vulnerables probablemente podría mejorar su eficacia hasta 3000 veces más cuando es comparado con un fotosensibilizador localizado en la matriz extracelular o la membrana celular (Saneesh *et al.*, 2017).

Este agente entra a la célula mediante endocitosis y su ubicación intracelular depende de sus propiedades fisicoquímicas. Dada de la fotoactivación se induce una respuesta al estrés agudo que incluye cambios en el nivel de  $Ca^{2+}$ , metabolismo de los lípidos, producción de citocinas y mediadores de estrés (Mfouo-Tynga y Abrahamse, 2015).

Las ftalocianinas son la tercera generación de fotosensibilizadores estables con capacidades fotoquímicas mejoradas, ya que son inductoras eficaces de la muerte celular en varios modelos neoplásicos (Mfouo-Tynga, *et al.*, 2015). Ha habido considerable interés en el uso de ftalocianinas en la TFD, principalmente por su alto coeficiente de absorbanza (650-680 nm), con penetración óptima del tejido por la luz. Un fotosensibilizador ideal para TFD debe tener un rango de absorción en la región cercana al infrarrojo, por sus siglas en inglés NIR (Near Infrared Region), entre 600 a 850 nm donde la penetración en el tejido es mayor (Saneesh *et al.*, 2017). El fotosensibilizador debe ser tóxico solo en presencia de luz con mínima toxicidad en la oscuridad y debe ser rápidamente excretado por el cuerpo (Saneesh

*et al.*, 2017). Las propiedades fotofísicas de las ftalocianinas son fuertemente dependientes del ion metálico que se encuentra en el centro de la molécula. Ftalocianinas con elementos como zinc (Zn II), aluminio (Al III) o complejos como la cloro aluminio ftalocianina presentan las propiedades fotofísicas más favorables para la aplicación de la TFD (Nunes, *et al.*, 2004).

Hay dos tipos e reacciones fotoquímicas, las del Tipo I implican una transferencia de electrones entre moléculas biológicas y el fotosensibilizador excitado, mientras que las de Tipo II involucran energía directamente transferida desde el fotosensibilizador excitado al oxígeno molecular circundante y la generación de singletes de oxígeno. Ambos inducen estrés oxidativo en las células, produciendo predominantemente ROS que median las rutas de muerte celular a través de los subproductos metabólicos como peróxido de hidrogeno, radicales hidroxilo y aniones súper peróxido. Típicamente los niveles de ROS son muy altos en células neoplásicas comparadas con las células normales, lo cual es atribuido a la alta tasa metabólica (Saneesh *et al.*, 2017).

Múltiples cascadas de señalización celular y orgánulos se ven afectados de forma semejante en las células expuestas a estrés fotodinámico, incluyendo la adenilato ciclasa, receptor a tirosina cinasas, MAP-cinasas, fosfatidilinositol 3-cinasa, varias proteínas cinasas y fosfatasas, factores de transcripción, la ceramida, la membrana plasmática, mitocondria y el retículo endoplásmico (Castano *et al.*, 2004 y Buytaert *et al.*, 2007).

Son múltiples las vías que están relacionadas durante la inducción de la muerte mediante TFD, sin embargo hay diferentes reportes de que la apoptosis en TFD es relacionada con la activación de dos mecanismos distintos: la vía intrínseca, que está relacionada con las señales mitocondriales y la vía extrínseca activada por ligandos de muerte (Silva *et al.*, 2016). La membrana mitocondrial permeable y la liberación de sustancias apoptogénicas, como el citocromo C, caracterizan la vía intrínseca, mientras que la activación de receptores de muerte como el factor de necrosis tumoral 1 (TNRF1) o Fas/CD95, en la membrana plasmática caracterizan la vía extrínseca (Mfouo-Tynga y Abrahamse, 2015).

El estrés oxidativo constitutivo de las células cancerosas es muy alto, así que después de la adición de ROS se puede inducir un umbral más alto para las ROS a partir del cual se induce el daño mitocondrial y la liberación de caspasas desencadenando la apoptosis (Saneesh *et al.*, 2017). La apoptosis o muerte celular tipo II, es caracterizada por la contracción celular, condensación de la cromatina y posterior fragmentación del DNA, blebbing de la membrana, activación de las caspasas y fagocitosis por parte de las células vecinas (Buytaert *et al.*, 2006). Durante la TDF es reconocida la activación de la apoptosis, pero también puede inducir autofagia en distintos tipos celulares, en los cuales la respuesta autofágica puede estar relacionada con mecanismos de supervivencia o de muerte celular (Mfouo-Tynga y Abrahamse, 2015).

La autofagia es un proceso catabólico comprendido de la acumulación ROS, la oxidación de lípidos de la membrana y la pérdida de la integridad de la membrana plasmática en ausencia de la actividad de las caspasas. También ha demostrado promover la muerte celular inmunogénica y juega un papel crítico en las células dañadas con TFD, especialmente en células resistentes a la apoptosis (Mfouo-Tynga y Abrahamse, 2015).

La necrosis ha sido referida como un evento de muerte celular accidental no programado, asociado a la ausencia de señales de muerte programada y a una respuesta inflamatoria. Siete tipos vías de muerte celular han sido reconocidos y relacionados a la TFD, la secuencia de eventos permanece conservada para todas ellas e incluyen la permeabilización de la membrana, movimiento de iones de calcio a través del retículo endoplásmico, oncosis, activación de calpaina dependiente de  $Ca^{2+}$  ruptura lisosomal, seguida de la degradación de los componentes celulares y la inducción de la respuesta inflamatoria (Mfouo-Tynga y Abrahamse, 2015).

Un fenómeno que se ha observado tanto en la radioterapia como en la terapia fotodinámica es el llamado *bystander affect* (Butterworth, *et al.*, 2013).



## Comunicación intercelular y el *bystander effect*

El término *bystander effect* se refiere a la inducción de efectos biológicos en las células que no son afectadas directamente por una haz de luz. Debido a la comunicación célula-célula este efecto exhibe diversas respuestas en la proximidad de las células irradiadas, mediada a través de uniones intercelulares (Prise *et al.*, 2010), y está bien documentado en el campo de la biología de la radiación (Chakraborty *et al.*, 2009). Existen experimentos que implican la transferencia de medio de células irradiadas, que se traduce en un efecto biológico en las células no irradiadas. Estos efectos incluyen daño en DNA, inestabilidad cromosómica, mutación, y la apoptosis. Existe evidencia considerable de que la radiación ionizante afecta a las células localizadas cerca del sitio de la irradiación, que responden de forma individual y colectivamente como parte de una gran red interconectada. Este *bystander effect* puede alterar el equilibrio dinámico entre la proliferación, la apoptosis o diferenciación celular (Marín *et al.*, 2015).

Algunos experimentos sugieren que el *bystander effect* se debe a una molécula secretada por células irradiadas, que es capaz de transferir “daño” a las células distantes y han mostrado un efecto de alerta para la letalidad celular, aberraciones cromosómicas y retraso del ciclo celular (Hall *et al.*, 2003). Sin embargo aún no se han ideado experimentos para demostrarlo en un tejido normal en tres dimensiones (Hall *et al.*, 2003).

Un mecanismo a través del cual es posible inducir el *bystander effect* en las células que están en contacto directo, es a través *Gap Junctions (GJ)* o *uniones comunicantes*, que son canales de proteínas multiméricas entre las células que permiten la transmisión de moléculas de señalización (Herve *et al.*, 2007). Las GJ están compuestas por dos hemicanales que se asocian en series. Los hemicanales están compuestos por seis subunidades proteicas llamadas conexinas, donde cada conexina está formada por cuatro segmentos transmembranales. Estos canales son permeables a varios cationes, algunas veces aniones y diferentes moléculas de

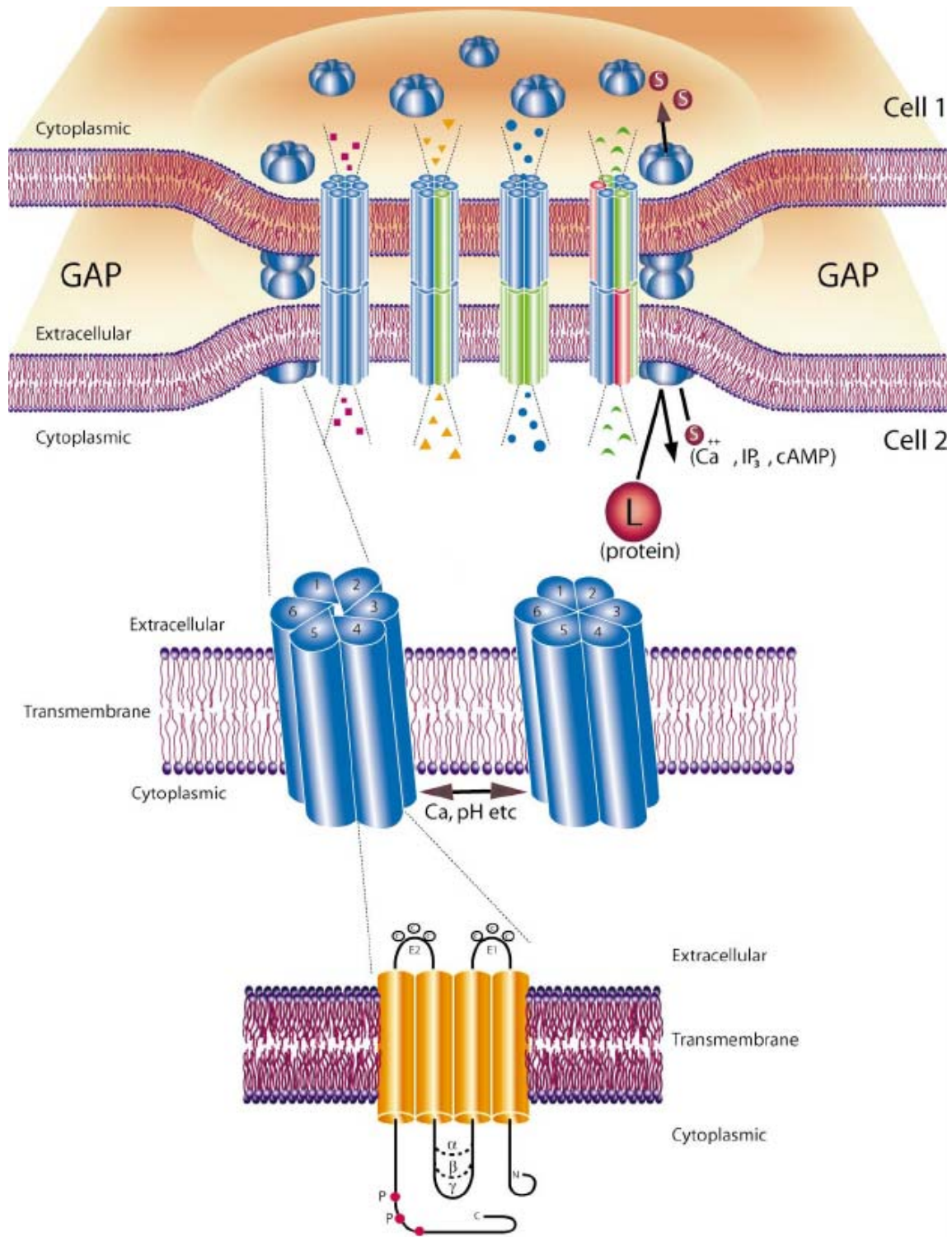
señalización intracelular. Consecuentemente, las conexinas representan dianas importantes en investigación farmacológica (Guinamard *et al.*, 2013).

Las conexinas, que forman hemicanales individuales en células separadas, que se unen para formar uniones y así es como las células interactúan físicamente entre sí (Prise *et al.*, 2010). Estas proteínas tienen cuatro dominios transmembranales alfa hélice (M1-M4), un amino terminal y carboxilo terminal en la parte intracelular, dos asas extracelulares (E1, E2) y un asa citoplasmática (Rackauskas *et al.*, 2010). Una vez en la membrana, la actividad del canal es determinada por las propiedades conductivas de la conexina involucrada, que pueden ser reguladas por voltaje o por unión a ligando, así como un gran número de modificaciones postraduccionales (Nielsen *et al.*, 2012). Estas conexiones son esenciales en varios aspectos de la fisiología animal incluyendo la propagación de señales eléctricas y la coordinación de la señalización celular mediante la transferencia de segundos mensajeros (Nielsen *et al.*, 2012).

Las funciones de las *GJ* son muy diversas e incluyen el intercambio de metabolitos y señales eléctricas entre células, así como funciones que no parecen estar relacionadas con la comunicación intercelular (Nielsen *et al.*, 2012). Típicamente permiten el paso de iones y metabolitos clave, tales como  $\text{Ca}^{2+}$ , nucleótidos, péptidos y otros mensajeros secundarios (Prise *et al.*, 2010).

La familia de genes de conexinas, consiste en 20 genes en ratón y 21 genes en el ser humano. Las conexinas son nombradas por su masa molecular que tiene un rango de 23-62 kDa. Por ejemplo Cx30 tiene una masa molecular de 30366 kDa (Rackauskas *et al.*, 2010).

Gran parte de los primeros trabajos en la caracterización del papel de las *GJ* se realizó con células confluentes que fueron irradiadas en situaciones en las que no se expone a todas las células. Con este enfoque, Nagasawa y sus colaboradores mostraron que, en condiciones en las que sólo el 1% de una población de células se irradió, 30% mostró cambios cromosómicos (Nagasawa *et al.*, 1992). Los hemicanales son bloqueados por los mismos compuestos que bloquean canales intercelulares. Así los inhibidores inespecíficos de las *GJ* son heptanol, octanol,



**Figura 4. Representación esquemática de una GJ entre dos células adyacentes.** En cada bicapa lipídica se pueden observar los conexones, que permiten el paso de pequeñas moléculas. En la parte inferior se observa la conformación transmembranal de las conexinas (El-Sabban, *et al.*, 2003).

halotano, carbenoxolona, 18-glicirretinico y varios ácidos grasos como el ácido araquidónico y derivados del femanato, como el ácido flufenámico; una molécula que se une a la conexina preferentemente en el sitio modulador, presumiblemente dentro de la membrana, induciendo el cierre del canal (Guinamard *et al.*, 2013), bloqueando así los hemicanales (Nielsen *et al.*, 2012).

Estos pueden ser una vía importante en la liberación de ATP al compartimiento extracelular. El ATP liberado puede unirse a receptores purinérgicos en las células secretoras o en las células vecinas y así actuar como una molécula de señalización en respuestas autocrinas y paracrinas. Un efecto bien descrito es la iniciación de las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ , donde el ATP liberado difunde y actúa extracelularmente lo que causa un incremento en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el cual puede propagarse a través de las células vecinas (Nielsen *et al.*, 2012). Los hemicanales también pueden jugar un rol importante en la regulación de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Nielsen *et al.*, 2012) y pueden exhibir actividad individual en las membranas plasmáticas, introduciendo largas conductancias iónicas y cambiando dramáticamente las propiedades de permeabilidad de células individuales (Stout *et al.*, 2004).

La reducción de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, la despolarización de la membrana, estrés mecánico, activación de receptores purinérgicos y la actividad cinasa intracelular han sido implicadas en la activación de los hemicanales, medida por la absorción de colorantes, electrofisiología y/o liberación de metabolitos (Stout *et al.*, 2004).

La inhibición de esta vía en células espectadoras, es decir, las células ubicadas alrededor de las radiadas, conduce a la disminución y/o inactivación del *bystander effect*, lo que sugiere una vía potencial para modular estas respuestas a nivel clínico (Zhou *et al.*, 2005). Por ejemplo, puede ser beneficioso activar el *bystander effect* para aumentar la destrucción de células tumorales, o con el fin de proteger los tejidos normales del daño adicional (Prinse *et al.*, 2010). En general, los mecanismos subyacentes implicados en la señalización del *bystander effect* están siendo aclarados. Sin embargo, hay una escasez significativa de datos sobre los

mecanismos de liberación de señales de las células irradiadas a las células espectadoras (Prinse *et al.*, 2010).

La energía depositada mediante radiación en el citoplasma es capaz de producir especies reactivas de oxígeno, que pueden conducir indirectamente al daño del ADN nuclear (Wu *et al.*, 1999). Por lo tanto, se ha propuesto que objetivos subcelulares como las mitocondrias podrían desempeñar un papel importante, ya sea como objetivos directos para la producción del *bystander effect* o como partes de un mecanismo de transducción de señales (Nugent *et al.*, 2007 y Tartier *et al.*, 2007). El óxido nítrico ha sido durante mucho tiempo implicado en los procesos apoptóticos desencadenados por la terapia fotodinámica (Gupta *et al.*, 1998; Dalbasti *et al.*, 2002; Reeves *et al.*, 2009) lo que lleva a la muerte celular (Rasola *et al.*, 2011), siendo así el óxido nítrico uno de los principales candidatos del *bystander effect*. Además, el estrés fotodinámico se ha asociado con una alteración en la homeostasis de  $Ca^{2+}$  y el agotamiento del mismo en el retículo endoplásmico (Buytaert *et al.*, 2006; 2007; Granville *et al.*, 2001)

Han pasado más de 30 años desde que la terapia fotodinámica fue desarrollada como una herramienta útil y prometedora de tratamiento en oncología. Los agentes citotóxicos generados a raíz de la radiación, generan una cascada de respuestas bioquímicas que inactivan las células cancerosas, ya sea directamente o a través de la inducción del *bystander effect* (Li *et al.*, 2009). La terapia fotodinámica induce la muerte celular en la línea celular MCF-7 ya sea por apoptosis o necrosis, dependiendo del fotosensibilizador y su localización subcelular (Xue *et al.*, 2010). También ocasiona la perturbación de  $Ca^{2+}$  libre intracelular, la homeostasis, la activación de la fosfolipasa entre otras. La comunicación a través de estas uniones es clave para el equilibrio celular, donde conexinas tienen un papel importante en procesos celulares como el crecimiento celular, la diferenciación, y la homeostasis. Debido a su importancia en el mantenimiento de las funciones celulares, la función de las conexinas tiene impacto en la progresión de numerosas patologías, incluyendo el CM (Grek *et al.*, 2015). Un papel crítico para las conexinas, las *GJ*, y

la comunicación mediada por GJ (*GJIC*, por sus siglas en inglés) en la génesis tumoral y metástasis fue documentado en 1966 en los estudios que revelaban alteración de acoplamiento eléctrico intercelular inducido químicamente en hepatocarcinomas de rata (Loewenstein *et al.*, 1966 y Loewenstein *et al.*, 1967). Mientras que los estudios recientes apoyan el potencial terapéutico de la orientación de algunos tipos de conexinas, como un tratamiento en el CM (Ding *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2013; Shishido *et al.*, 2014; Grek *et al.*, 2014), las complicaciones que están asociadas con las funciones de las conexinas en los procesos de la tumorigénesis, migración de células tumorales y la metástasis en CM siguen sin resolverse (Grek *et al.*, 2015). Las células MCF-7 expresan principalmente a las Cx26 y Cx43 (Grek *et al.*, 2016).

### *Señalización de Ca<sup>2+</sup>*

Asimismo se ha demostrado que el Ca<sup>2+</sup> desempeña papeles importantes en carcinogénesis tales como la transformación de células normales en células cancerosas, la formación de tumores y el crecimiento, la invasión, la angiogénesis y la metástasis (Pascash *et al.*, 2010). En condiciones de reposo, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, es mantenido a una concentración de aproximadamente 100 nM, mientras que [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> extracelular es aproximadamente de 1 mM (Marchi y Pinton, 2016).

En células no excitables, el Ca<sup>2+</sup> entra, en su mayoría, a través de canales que no son voltaje-dependientes. Estos incluyen canales abiertos por ligando, como la familia de receptores ionotrópicos purinérgicos P2X, receptores del potencial transitorio (TRP, por sus siglas en inglés). El rol principal de estos canales es mediar la entrada de Ca<sup>2+</sup> en respuesta a varios estímulos, incluyendo la producción de diacilglicerol (Marchi y Pinton, 2016).

Bajo una variedad de estrés o tipos de daño, el Ca<sup>2+</sup> excesivo es liberado del retículo endoplásmico a través de los IP3R's y transferido a la mitocondria, permitiéndole la sobrecarga del Ca<sup>2+</sup> y la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial y la liberación de factores pro-apoptóticos en el citosol (Marchi y Pinton,

2016). Lo que controla los complejos cambios en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol y en los organelos subcelulares son los instrumentos de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ ; los canales, bombas e intercambiadores de este ion (Monteith *et al.*, 2017).

En una sola célula, incrementos largos y sostenidos de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden estar asociados con la muerte celular, mientras que cambios altamente localizados en el citosol puede regular la migración direccional. Los cambios de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria pueden controlar los niveles de ATP y la frecuencia y duración de las oscilaciones de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , pueden activar de manera diferencial y factores de transcripción (Monteith *et al.*, 2017).

La señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  a menudo es remodelada con la tumorigénesis y el  $\text{Ca}^{2+}$  regula vías y maquinarias oncogénicas y supresoras de tumores clave (Monteith *et al.*, 2017). Estudios han demostrado también que la quelación de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  reduce la inducción de la apoptosis por terapia fotodinámica in vivo , y en los últimos casos esto afecta, quizá, de manera dependiente de p53 (Monteith *et al.*, 2017).

El  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular juega múltiples roles en la inducción o regulación de procesos relacionados con la supervivencia y la muerte celular. Éste  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ha sido reconocido como factor contribuyente de una forma importante en varias modalidades de muerte celular como necrosis, apoptosis y anoikis, así como en la necroptosis y la autofagia (La Rovere *et al.*, 2016).

La señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser modulada mediante diversos mecanismos, no sólo al nivel de los cambios de expresión de proteínas formadoras de canales, bombas y transportadores. En algunos casos la contribución de canales iónicos y bombas es atribuido a los efectos indirectos o incluso a funciones independientes a sus propias habilidades para transportar iones (Monteith *et al.*, 2017).

Dado que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y las bombas involucradas en la regulación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) y sus vías de señalización muestran alteraciones de expresión en el cáncer, se puede ubicar a estos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y bombas como opciones terapéuticas para disminuir la proliferación de células cancerosas y promover su apoptosis. (Pascash *et al.*, 2010).

El nivel de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y su transferencia desde el retículo endoplásmico a la mitocondria representa otro criterio para la muerte celular. La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria permite cambios en la morfología y conduce a la apoptosis en una manera no nuclear y  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente. En presencia de niveles elevados de  $\text{Ca}^{2+}$ , TFD tiene la habilidad de inducir daño, que parece depender también de p53 (Mfouo-Tynga y Abrahamse, 2015).

Desde que el aparato de Golgi y el RE están asociados a síntesis de proteínas y su procesamiento, se podría esperar que el fotodaño a estos organelos comprometa significativamente la producción de estas biomoléculas. RE es también el mayor reservorio de calcio intracelular. En principio, dañar este orgánulo puede liberar una ráfaga de  $\text{Ca}^{2+}$  que pueda desregular varias rutas de señalización e incluso desencadenar mecanismos de muerte celular. Las ráfagas de calcio intracelular han mostrado tener un rol mayor en la inducción de muerte necrótica programada, así como afectar negativamente la homeostasis del RE con la mitocondria. Sin embargo, el rol del calcio como posible agente responsable de la muerte celular durante/después de la TFD ha sido controversial, quizá porque en la TFD varios objetivos moleculares son dañados al mismo tiempo (Bacellar, *et al.*, 2015).

La TFD con la aluminio ftalocianina (AIPc) causa un excesivo incremento en la concentración de calcio intracelular. Sin embargo, el pre-tratamiento de las células con quelantes de calcio causa un mejoramiento en lugar de un decremento de la muerte celular, poniendo en duda el rol activo del calcio como un agente de muerte celular. Buytaert *et al.*, reporta que el fotodaño en el retículo endoplásmico permite una pérdida inmediata de los niveles de SERCA2 (*sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase*), causando la interrupción de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y de la muerte celular después de la TFD con hipericina. Estudios recientes sobre TFD dirigida a RE, sugieren que SERCA2 no es el principal objetivo, pero si la activación de las calpainas (cisteín-proteasas dependientes de calcio), las cuales son las principales responsables de la muerte celular por necrosis. Estos resultados muestran que el



fotodaño del RE y la consecuente liberación de estas ráfagas de calcio en el citosol claramente afectan la viabilidad celular (Bacellar, *et al.*, 2015).

A fin de utilizar  $\text{Ca}^{2+}$  como un segundo mensajero, las células han ideado un ingenioso mecanismo de señalización que ha superado los problemas inherentes asociados con tasa de difusión baja y la citotoxicidad del  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la presentación de los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  como picos breves que a menudo están organizados en forma de ondas regenerativas (Berridge, 1993; Rey *et al.*, 2010).

Ambos, los mecanismos genéticos y epigenéticos, han sido propuestos con roles específicos en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en el cáncer (Hanahan y Weinberg 2000; Jaffe 2005). Como resultado de las mutaciones, las células normales pueden transformarse en células cancerosas, adquiriendo propiedades específicas, tales como la proliferación incontrolable, la inmortalidad y la autosuficiencia en las señales de crecimiento (Futreal *et al.*, 2005; Hanahan y Weinberg 2000). Desde que los gradientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y las ondas de propagación del mismo han mostrado estar involucradas en procesos normales del desarrollo, la epigenética propone que una alteración en los gradientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y sus ondas de propagación participa en la carcinogénesis (Jaffe, 2005). La remodelación de la homeostasis intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$ , como una causa o consecuencia de la actividad de diferentes proteínas con funciones alteradas, relacionadas con el cáncer, es una característica de las células cancerosas (Marchi y Pinton, 2016). Las rutas de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  son remodeladas o desreguladas en el cáncer que se resulta en cambios en su fisiología y los distinguen de las células no malignas (Hanahan y Weinberg 2000; Wang *et al.*, 2010).

La señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  entre las células puede producirse de dos maneras. En la primera, las células pueden utilizar *GJ* que funcionan como canales para comunicarse entre sí (Rosselló *et al.*, 2009). En la segunda, la señalización célula a célula se realiza por receptores ionotrópicos permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  tales como los

receptores NMDA o receptores purinérgicos (Jahn y Scheller, 2006; Rosselló *et al.*, 2009; Sudhof 2004). En varios tipos celulares, las elevaciones transitorias intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas en células individuales son propagadas en forma de ondas a las células vecinas (Stout *et al.*, 2004).

Las células que carecen de conexinas pueden movilizar calcio normalmente en respuesta al estrés mecánico, pero las ondas no son propagadas hasta que las células son transfectadas con conexinas (Stout *et al.*, 2004). Estudios muestran que la mayor extensión de la propagación de onda de calcio requiere la activación de receptores purinérgicos mediante la liberación paracrina de ATP (Stout *et al.*, 2004).

Diversos estudios han mostrado que altos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular activan y ejecutan la muerte celular (Szado *et al.*, 2008). En virtud de la regulación de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  intracelular, la mitocondria y el retículo endoplásmico juegan un papel crucial, tanto en la señalización como en la decisión de la muerte celular (Pascash *et al.*, 2010). Las ondas de propagación de  $\text{Ca}^{2+}$  se generan como resultado de las actividades concertadas de varios canales celulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y prevé una señalización muy eficaz, que permite transferencia de información en términos de la amplitud, duración, frecuencia, forma de onda o el momento de oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  que luego se descodifica en una etapa posterior de la transducción de señales. En las células cancerosas, la expresión alterada de estos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  resultan en un código de calcio modificado (Pascash *et al.*, 2010).

Estas perspectivas de estudio, apoyadas en terapias ya conocidas pueden dar nuevos enfoques para el rediseño y desarrollo de nuevas tecnologías para el diagnóstico y tratamiento del CM.

## JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama genera una alta mortalidad a nivel mundial por lo que es importante desarrollar investigación que genere nuevas alternativas de tratamiento. Comprender los mecanismos por los cuales se puedan maximizar los efectos de la señalización de muerte celular desencadenados por estímulos externos a consecuencia de diferentes tratamientos, abriría la puerta a nuevas estrategias de mejora en la eliminación de células cancerosas (Fuchs y Steller, 2014).

Existen diversos reportes que indican que la modulación de la homeostasis intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  es una estrategia para revertir el desarrollo de un tumor y es un excelente mecanismo a través del cual ciertos fármacos pueden ayudar al tratamiento de las neoplasias (Szado, 2008). Además, la comunicación intercelular juega un papel muy importante en la génesis del cáncer, sin embargo, esta misma puede ser aprovechada para combatirlo (Brücher y Jamal, 2014). La terapia fotodinámica ofrece la posibilidad de generar y/o liberar sustancias que pueden ser enviadas a las células vecinas y ayudar a su erradicación. Hasta el momento, no existen reportes en la literatura en donde se haya estudiado la participación de las conexinas en la propagación de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  secundarias a TDF, empleando para esto a la línea celular MCF-7.

El empleo de técnicas de biología molecular, microscopía, fototerapia y cultivos celulares, hacen posible el desarrollo de nuevos experimentos que conformen las nuevas plataformas de investigación relacionadas a la comprensión de la señalización de muerte celular y así utilizarla como una terapia menos agresiva pero altamente efectiva para erradicar el cáncer.

## **HIPÓTESIS**

La comunicación entre las células tumorales mediada por conexinas es un factor fundamental que favorece la propagación de las señales que ocasionan la muerte de las células MCF-7 como consecuencia de la terapia fotodinámica, siendo el  $\text{Ca}^{2+}$  una de las señales que genera dicho efecto.

## **Objetivo general**

Estudiar la participación de las conexinas en la propagación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  generada por la terapia fotodinámica.

## **Objetivos específicos**

1. Examinar los efectos de la fotoestimulación sobre la viabilidad celular y evaluar el tipo de muerte celular que se induce.
2. Determinar la presencia de las conexinas 26 y 43 mediante ensayos de inmunofluorescencia.
3. Determinar los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  como consecuencia de la fotoestimulación.
4. Bloquear farmacológicamente las conexinas y evaluar los efectos de la fotoestimulación en esta nueva condición (viabilidad celular y aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , así como su propagación a células cercanas).

## **METODOLOGÍA**

### ***Cultivo celular***

La línea celular empleada en este proyecto fue la línea MCF-7 (ATCC), que es una línea tumoral que deriva de cáncer de mama. Las células se mantuvieron en un medio MEM en frascos T25 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, antibióticos 1X e insulina. Las células se conservaron en una incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

### ***Administración del fotosensibilizador***

Las células, previamente adheridas a un cubreobjeto de 12 mm de diámetro, fueron incubadas por 90 minutos con la aluminio-cloro ftalocianina (AlClPc) a una concentración de 20 µM en solución extracelular y posteriormente se colocaron en la cámara de registro para dar inicio a los experimentos de fotoestimulación empleando una luz de 640 nm de longitud de onda (roja).

### ***Determinación de la viabilidad celular y tipo de muerte celular generada por la fotoestimulación.***

Para determinar si la fotoactivación era capaz de generar muerte celular, conocer el tipo de muerte que se está produciendo y cuantas células podían verse afectadas por este procedimiento, empleamos un kit de detección que utiliza Anexina V acoplada a FITC y yoduro de propídido. Cuando las células están sufriendo un proceso apoptótico, la anexina V-FITC se une a la fosfatidilserina que ha sido transportada a la monocapa extracelular, sin embargo, si la integridad de la membrana celular ha sido comprometida, el yoduro de propídido penetrará y se unirá al ADN.

Cuando se visualizan las células en un microscopio de fluorescencia o confocal, se considera que aquellas que se encuentran en una etapa inicial de apoptosis, se teñirán exclusivamente con la anexina V-FITC (verde), mientras que las células que estén en un proceso necrótico, además de teñirse con la anexina V-FITC, también lo harán con el yoduro de propídido (rojo), de tal forma que el núcleo se observará en color rojo y la membrana celular en color verde.

### ***Determinación de la propagación de la onda de Ca<sup>2+</sup> generada por la terapia fotodinámica***

Se realizó el análisis fluorométrico en células tumorales a las cuales después de la administración de la AICIPc, se les aplicó una sonda para Ca<sup>2+</sup>, el Fluo-4FF AM (Invitrogen). Las células se incubaron con el AM éster de Fluo-4FF 10 µM, el cuál es permeable a través de la membrana celular. La incubación con la sonda se realizó a 37°C durante 45 minutos y se visualizó empleando el microscopio invertido Nikon C2 (Nikon, Japón). La excitación del fluoróforo se realizó con un haz de luz de 480 nm.

La solución extracelular empleada tuvo la siguiente composición: (en mM): 147 NaCl, 2 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 D-glucosa y 10 HEPES con pH ajustado a 7.4 empleando NaOH.

El análisis de estos experimentos se realizó con el programa Image J FIJI, que permite analizar las regiones de interés (ROI) y mide la intensidad de fluorescencia. Los valores se muestran como  $dF/F_0$ , donde  $F_0$  representa la fluorescencia basal durante los primeros 10 segundos de registro. Se midió el área bajo la curva de respuesta como medida indirecta de la fluorescencia emitida después de la fotoestimulación durante una ventana temporal de 210 segundos.

Para medir la propagación de la onda de Ca<sup>2+</sup> generada por la fotoactivación también se empleó el microscopio invertido Nikon C2. La secuencia de imágenes se adquirió usando el software NIS-elements (Nikon, Japón).

### ***Determinación de la participación de las conexinas en la propagación de la señal mediada por Ca<sup>2+</sup> generada por la terapia fotodinámica.***

Para realizar esta parte del proyecto, se cuantificó la propagación de la señal de Ca<sup>2+</sup> en condiciones control y en presencia de bloqueadores de *gap junctions* y *hemicanales*; carbenoxolona y el ácido flufenámico (AFF) ambos a una concentración de 100 µM.

***Determinación de la presencia de las conexinas 26 y 43 mediante ensayos de inmunofluorescencia.***

Para la detección de las conexinas 26 y 43 por medio de inmunofluorescencia indirecta se aplicó el siguiente protocolo:

1. Se les realizó a las células 3 lavados con PBS.
2. Se permeabilizaron y saturaron los sitios inespecíficos con tritón al 0.1% disuelto en solución de BSA al 2% a temperatura ambiente por 30 minutos.
3. Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
4. Posteriormente se incubaron por 12 horas a 4°C con el anticuerpo primario para la Cx26 (conejo antihumano, abcam, USA) o para la Cx43 (conejo antihumano, abcam, USA), en solución BSA al 1%. La dilución empleada para ambos anticuerpos fue de 1:200.
5. Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
6. A continuación, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario (cabra anticonejo conjugado con Alexa Fluor 488, abcam, USA.) a temperatura ambiente durante dos horas. Este anticuerpo se empleó a una dilución 1:200.
7. Se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
8. Hecho esto, se realizó la tinción de núcleos con DAPI (abcam, USA) y de F-actina con faloidina conjugada con Alexa Fluor 647 (abcam, USA).
9. Se selló la preparación y se observó en el microscopio invertido Nikon C2 (Nikon, Japón).
10. Se realizaron 4 ensayos por duplicado para cada conexina y en cada caso se emplearon 2 controles negativos y 2 positivos. Para los controles positivos empleamos cortes de corazón (Cx43) y de cóclea (Cx26).

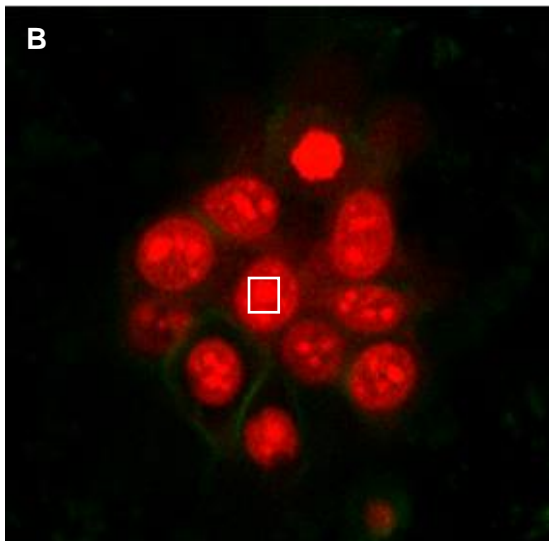
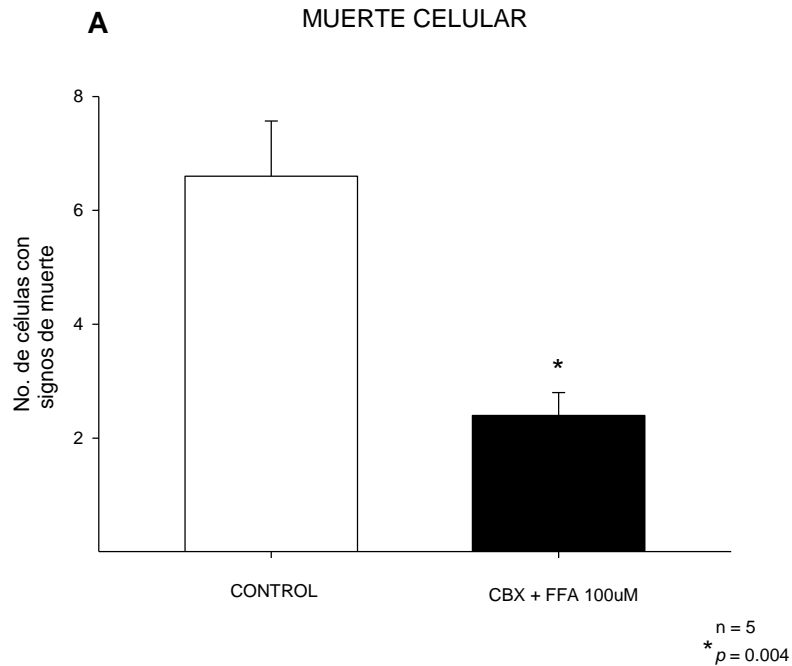


## RESULTADOS

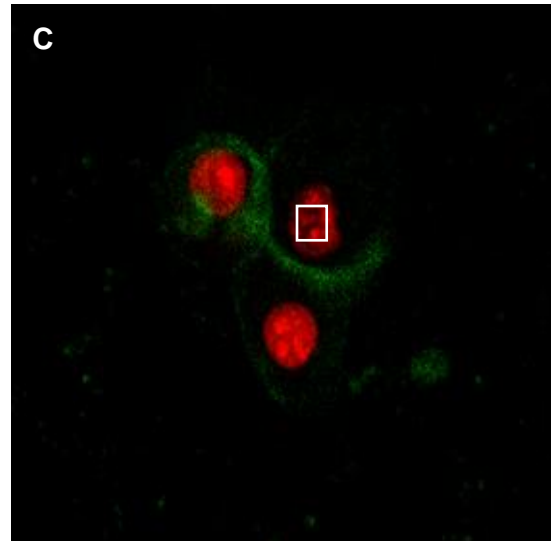
### *Efectos de la fotoestimulación sobre la viabilidad de las células MCF-7*

Para comprobar si las células MCF-7 incubadas con el fotosensibilizador y sometidas a estimulación lumínica de 640 nm de longitud de onda (rojo), generaban cambios que indicaran un proceso de muerte en la célula estimulada y en aquellas que se encontraban cercanas a ella, se empleó una solución con Anexina V-FITC y yoduro de propídio. Como se aprecia en la gráfica que aparece en la figura 5A, el número de células que presentaron signos de muerte celular en condiciones control, fue significativamente mayor al observado en los experimentos en donde la estimulación se hizo en presencia de los bloqueadores de *gap junctions* y hemicanales, carbenoxolona y ácido flufenámico, ambos a una concentración de 100 $\mu$ M ( $6.6\pm 0.97$  y  $2.4\pm 0.4$  células, respectivamente,  $n=5$ ,  $p=0.004$ ).

Las características que muestran las células que se encuentran en un proceso de muerte se pueden apreciar en la figura 5B y C, las células presentan el núcleo rojo, teñido por el yoduro de propídio y la membrana celular en color verde lo que corresponde a la unión de la anexina. En B, se observa el efecto de la fotoestimulación en condiciones control, mientras que en C, lo que se observó en presencia de los bloqueadores de *GJ* y hemicanales mencionados anteriormente.



Control

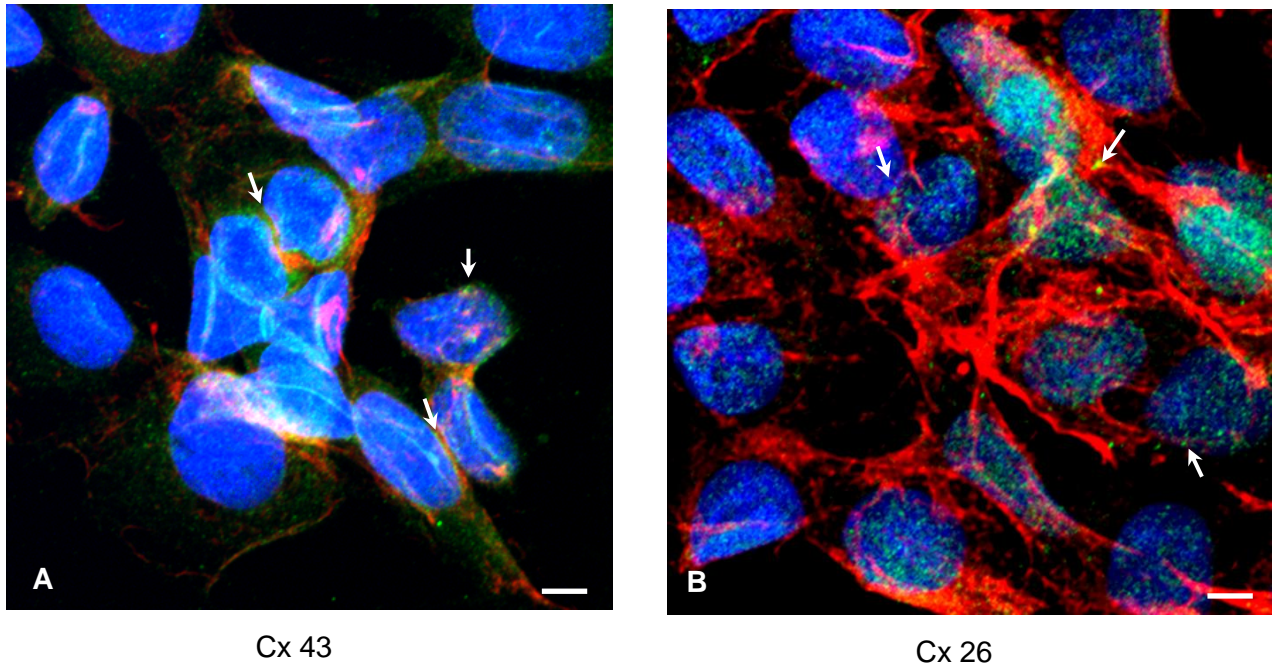


CBX + FFA 100μM

**Figura 5. Muerte celular ocasionada por la fotoestimulación.** En esta figura podemos apreciar los efectos de la fotoestimulación sobre la célula irradiada y las que la rodean. En A, se observa una gráfica de barras que muestra la diferencia en el número de células con signos de muerte en condiciones control y cuando los bloqueadores de *GJ* y hemicanales se encontraban presentes. En B, se observa una imagen tomada con el microscopio confocal y muestra la condición control, en donde prácticamente todas las células que rodean a la irradiada (cuadro blanco) presentan datos de muerte celular. Cuando la fotoestimulación se realizó en presencia de los bloqueadores de *gap junctions* y hemicanales, la CBX y el AFF (100μM), el número de células con datos de muerte fue menor (C). Los núcleos están marcados con yoduro de propidio y se observan en color rojo, mientras que la membrana celular a la que se le unió la anexina V, se observa en color verde. Barra de escala = 10μm.

### *Presencia de la conexina 26 y la conexina 43 en las células MCF-7*

La detección de la conexina 26 y de la conexina 43 se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta y se evaluó solamente de manera cualitativa. Ambas conexinas fueron localizadas en las células MCF-7 y se observó una distribución heterogénea de dichas conexinas en la población celular. Los resultados sugieren una localización tanto membranal, como citoplasmática. De las dos conexinas estudiadas, la que presentó un mayor inmunomarcaje fue la conexina 43. La figura 6, nos permite visualizar en color verde la presencia y distribución de las conexinas, en A, la conexina 43 y en B, la conexina 26. Los núcleos de las células se observan en azul y el citoesqueleto en rojo.

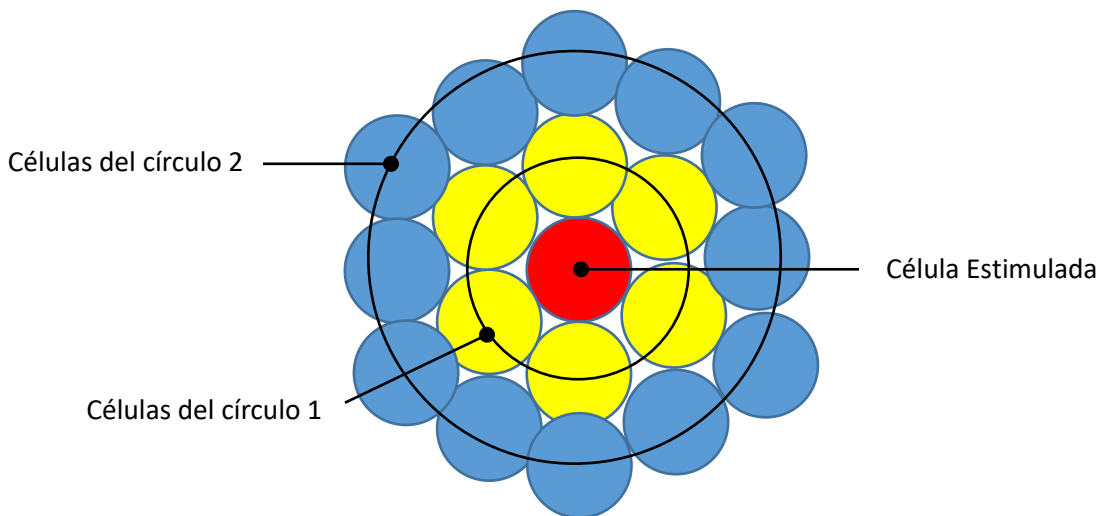


**Figura 6. Presencia de las conexinas 26 y 43 en las células MCF-7.** Empleando un anticuerpo específico para la conexina 43 (A) y otro para la conexina 26 (B), podemos apreciar la presencia de ambas conexinas (color verde) en las células MCF-7, el marcaje se observa en un patrón de puntillado y sugiere una localización tanto membranal, así como citoplasmático. Ocasionalmente se observó un patrón en forma de placas, sin embargo, no fue predominante. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y los filamentos de actina con faloidina acoplada al fluoróforo Alexa Fluor 647 (rojo). Las flechas indican algunos sitios en donde se localizan las conexinas. Barra de escala = 10  $\mu$ m.

*Determinación de los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  como consecuencia de la fotoestimulación.*

Los resultados de esta sección fueron analizados de la manera que a continuación se describe:

Se seleccionó una célula, a la cual se le aplicó el estímulo luminoso, dicha célula debía de estar rodeada completamente por otras células. Durante la aplicación del estímulo pudimos observar la manera en cómo se incrementaba el nivel intracelular de  $Ca^{2+}$  en la célula estimulada y dicho efecto propagaba a las células que la rodeaban, de tal forma que podíamos clasificar a las células en las que propagaba la señal, dependiendo de su localización, como pertenecientes al círculo 1, al círculo 2, como se aprecia en la figura 7. En términos generales podríamos decir que la propagación casi nunca fue más allá del segundo círculo, sin embargo debido a los pocos experimentos en donde la propagación se extendió hasta el círculo dos, decidimos realizar el análisis únicamente en las células del círculo 1, es decir, en aquellas en contacto directo con la célula estimulada



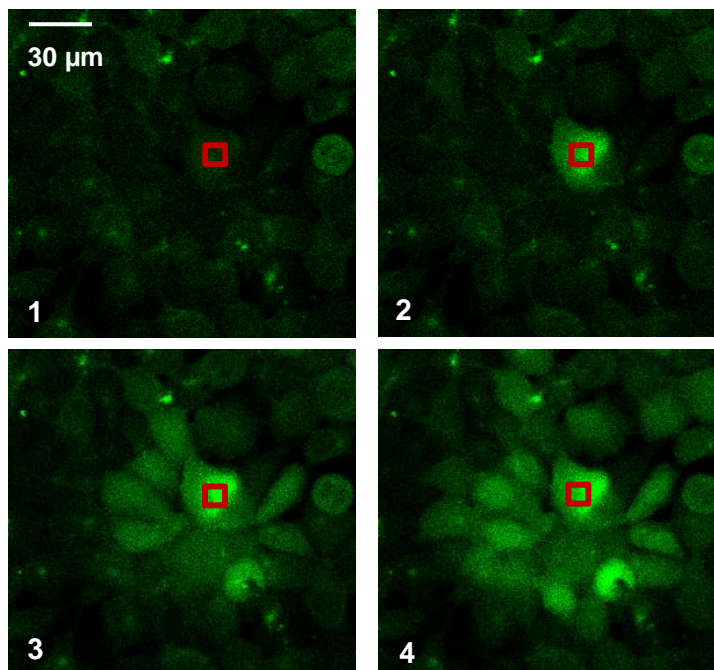
**Figura 7. Esquema que ilustra la forma en cómo se clasificaron las células para su análisis.**

Para establecer los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  posteriores a la fotoestimulación y el origen del  $Ca^{2+}$  que participa en la propagación de la señal de  $Ca^{2+}$  en las células MCF-7, una vez incubadas con el fotosensibilizador AICIPc y la sonda de calcio Fluo4-FF AM, se sometieron a estimulación lumínica de 640 nm de longitud de onda (figura 8).

Se estudiaron 5 grupos, cada uno comparado con su respectivo control. Los grupos fueron:

- 1.- Células MCF-7 perfundidas con solución normal como control y con solución sin  $Ca^{2+}$  y EGTA [0.5 mM] por 10 minutos.
- 2.- Células MCF-7 perfundidas con AFF [100 $\mu$ M] por 30 minutos.
- 3.- Células MCF-7 perfundidas con CBX [100 $\mu$ M] por 30 minutos.
- 4.- Células MCF-7 perfundidas con AFF [100 $\mu$ M] y CBX [100 $\mu$ M] de manera simultánea.
- 5.- Células MCF-7 perfundidas con AFF [100 $\mu$ M] + CBX [100 $\mu$ M] por un tiempo total de 30 minutos, donde los 10 minutos finales se cambiaba a una solución sin  $Ca^{2+}$  pero aún con AFF [100 $\mu$ M]+ CBX [100 $\mu$ M].

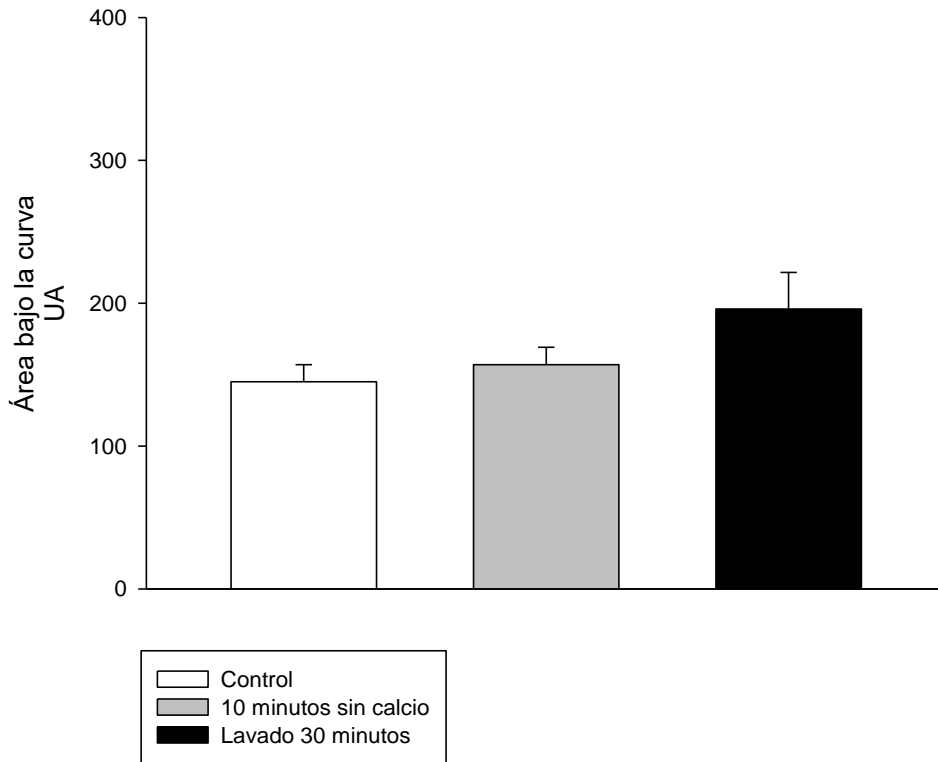
Se realizó la medición del área bajo la curva de intensidad de fluorescencia contra tiempo. Se obtuvo también la gráfica de intensidad máxima de fluorescencia, mostrado como las veces que se incrementó la fluorescencia con respecto al registro basal. Ambas como medidas indirectas de la concentración del  $[Ca^{2+}]_i$  en las diferentes condiciones experimentales.



**Figura 8. Representación de la propagación de la onda de  $\text{Ca}^{2+}$  en un grupo control.** En el cuadro 1 se observa al grupo de células previo a la fotoestimulación, la célula estimulada se señala con el cuadro rojo. De la imagen 2 a la 4 se aprecia la propagación de la onda de  $\text{Ca}^{2+}$  hasta alcanzar 2 células después de la estimulada.

Como se aprecia en la gráfica que aparece en la figura 9, no existe un cambio significativo en el valor del área bajo la curva entre las tres condiciones, es decir, la fotoactivación no generó un cambio significativo en el área bajo la curva en ausencia de calcio, ni después de 30 minutos de lavado con solución normal.

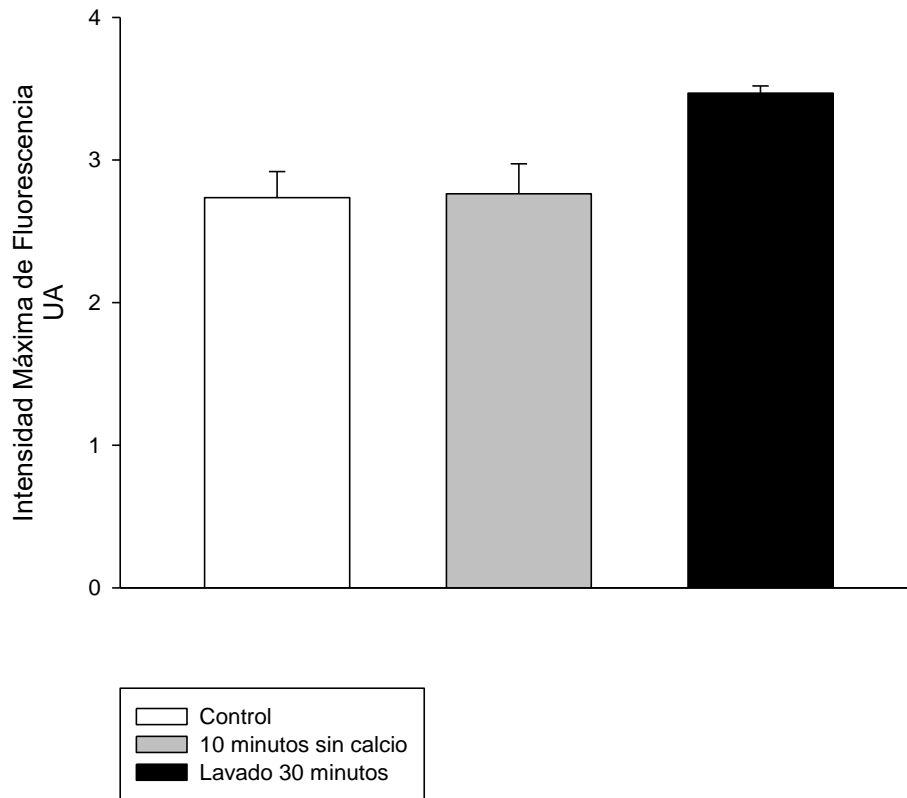
Área bajo la curva con solución normal  
y con solución sin calcio



**Figura 9. Medición del área bajo la curva del cambio en la fluorescencia.** Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar obtenido de experimentos independientes (n=5). Los datos de los grupos tratados con la solución sin calcio y el quelante EGTA [0.5 mM] en los diferentes tiempos fueron comparados con el control.

Sobre la gráfica de intensidad máxima de fluorescencia, tampoco se observa un cambio significativo en la intensidad correspondiente a los experimentos realizados en una solución sin  $\text{Ca}^{2+}$  por 10 minutos, ni de esta con respecto al lavado con después de 30 minutos.

Intensidad Máxima de Fluorescencia con solución normal  
y con solución sin calcio



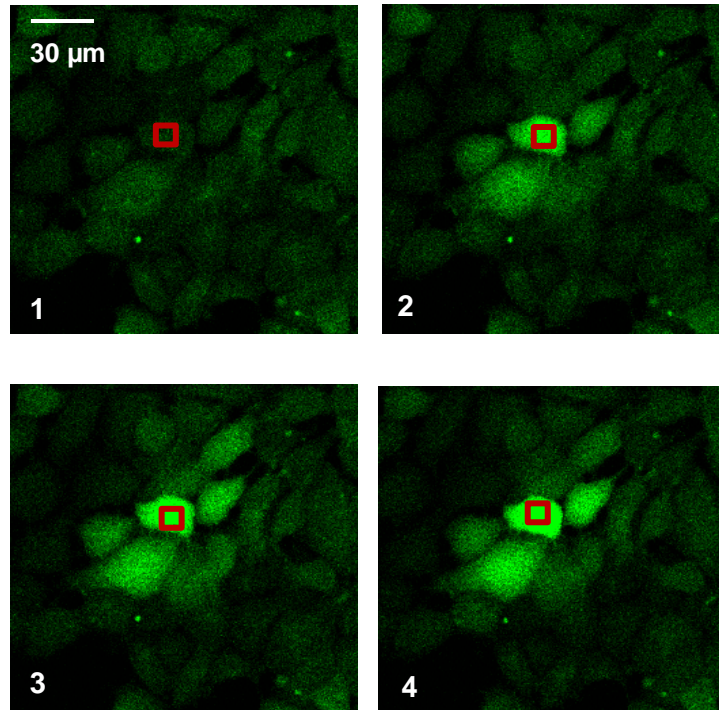
**Figura 10. Gráfica de la intensidad máxima de fluorescencia.** Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar obtenido de experimentos independientes (n=5). Los datos del grupo tratado con la solución sin calcio y EGTA [0.5 mM] fue comparado con el control y el lavado, sin encontrar datos que indicaran un cambio significativo.

### Ácido flufenámico

Para establecer los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  posteriores a la fotoestimulación y la participación de las conexinas en la propagación de la señal de  $Ca^{2+}$  en las células MCF-7 incubadas con el fotosensibilizador AICIPc y la sonda de calcio Fluo4-FF AM, y sometidas a estimulación lumínica de 640 nm de longitud de onda (rojo), se realizó la medición del área bajo a curva de intensidad de fluorescencia contra tiempo. Se obtuvo también la gráfica de intensidad máxima de fluorescencia durante

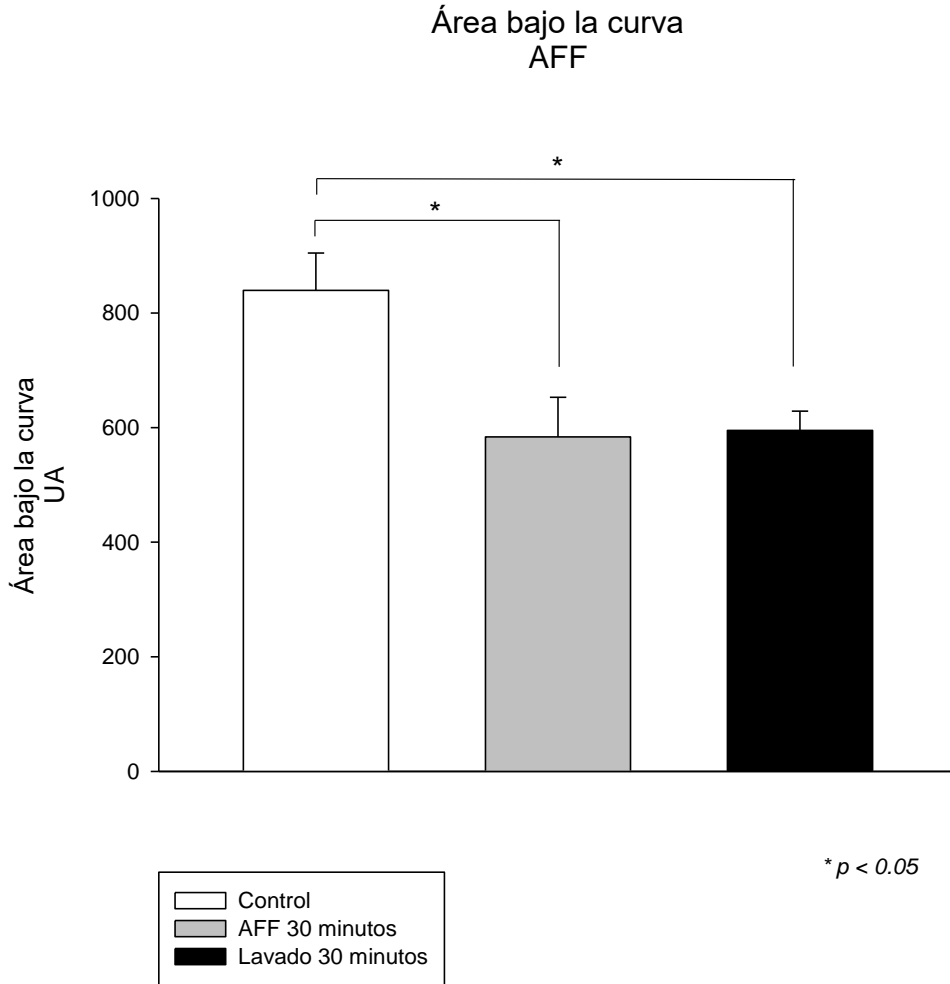


el tiempo de registro. Ambas como medidas indirectas de la concentración del  $[Ca^{2+}]_i$ .



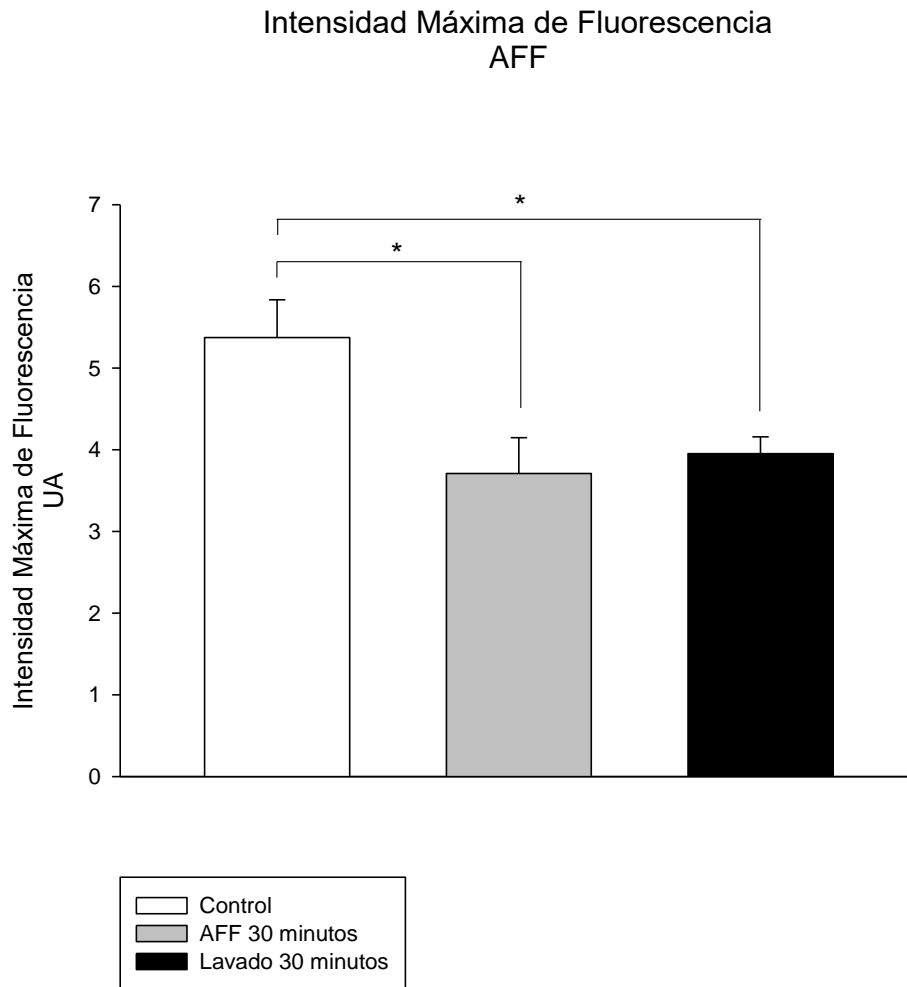
**Figura 11. Representación de la propagación de la onda de  $Ca^{2+}$  en las células MCF-7 perfundidas con AFF [100µM] por 30 minutos.** En el cuadro 1 se observa al grupo de células antes de la fotoestimulación, la célula estimulada se señala con el cuadro rojo. En la imagen 2, 3 y 4 se aprecia la propagación la onda de  $Ca^{2+}$  a través del tiempo, que en estas condiciones llega sólo a las células adyacentes a la estimulada.

Como se aprecia en la gráfica que aparece en la figura 12, existe una tendencia a la disminución del área bajo la curva correspondiente a los experimentos realizados con AFF por 30 y 35 minutos, sin embargo el valor correspondiente al lavado del cultivo por 30 minutos, presenta una diferencia significativa respecto al valor observado en el control, en donde la estimulación se hizo en ausencia del bloqueador.



**Figura 12. Medición del área bajo la curva de la fluorescencia en presencia de AFF.** Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar obtenido de experimentos independientes ( $n=4$ ). El gráfico permite apreciar que hubo una disminución en el área cuando el AFF estuvo presente y que dicho efecto se mantuvo incluso después de 30 minutos de lavado.  $p < 0.05$  (\*).

Respecto a la gráfica de intensidad máxima de fluorescencia, se observa la misma tendencia donde, hay una disminución de la intensidad correspondiente al experimento realizado con AFF por 30 minutos al igual que el valor correspondiente al lavado del cultivo por 30 minutos, ambos exhiben una diferencia significativa respecto al valor observado en el control, en donde la estimulación se hizo en ausencia del bloqueador.

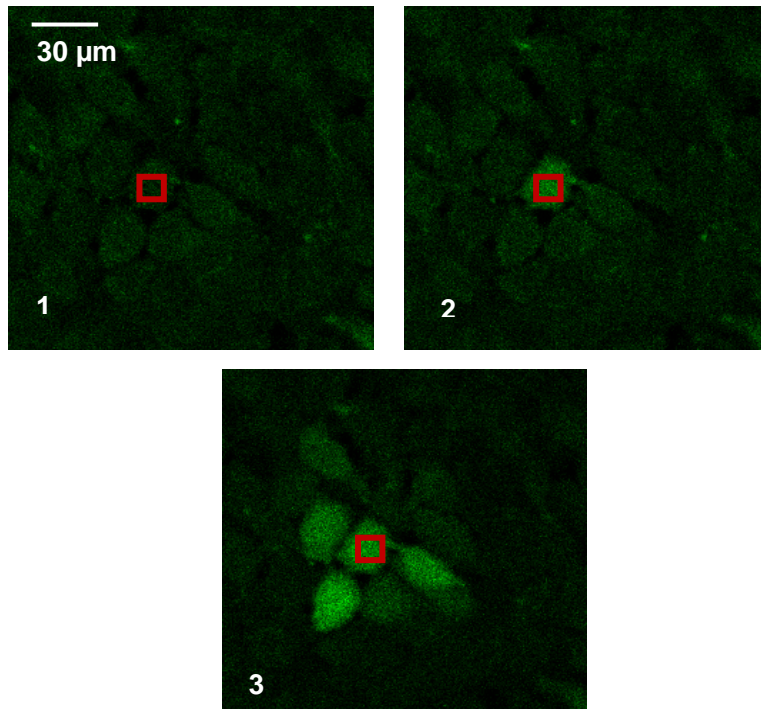


**Figura 13. Medición de la intensidad máxima de fluorescencia en presencia de AFF.** Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar obtenido de experimentos independientes (n=4). Los datos del grupo tratado con el bloqueador fueron comparados con el control.  $p < 0.05$  (\*).

### *Carbenoxolona*

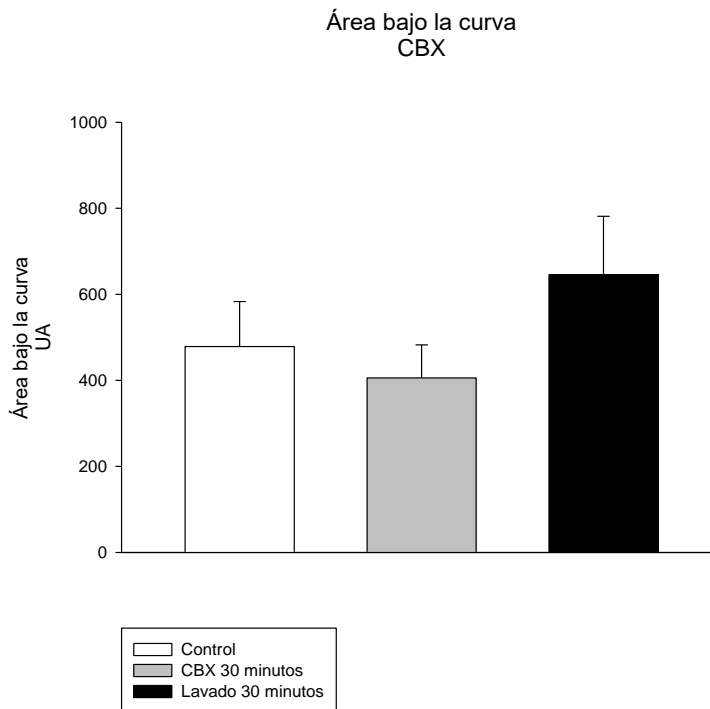
Se probó también el bloqueador inespecífico para conexinas carbenoxolona, en las mismas condiciones que el AFF, para observar los cambios ulteriores a la fotoestimulación y la participación de las conexinas en la transmisión de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en la línea celular MCF-7 incubada con el fotosensibilizador AICIPc y la sonda

de calcio Fluo4-FF AM, y sometida a estimulación lumínica de 640 nm de longitud de onda (rojo). Se realizó la medición del área bajo a curva de intensidad de fluorescencia contra tiempo. Se obtuvo también la gráfica de intensidad máxima de fluorescencia durante el tiempo de registro. Ambas como medidas indirectas de la concentración del  $[Ca^{2+}]_i$ .

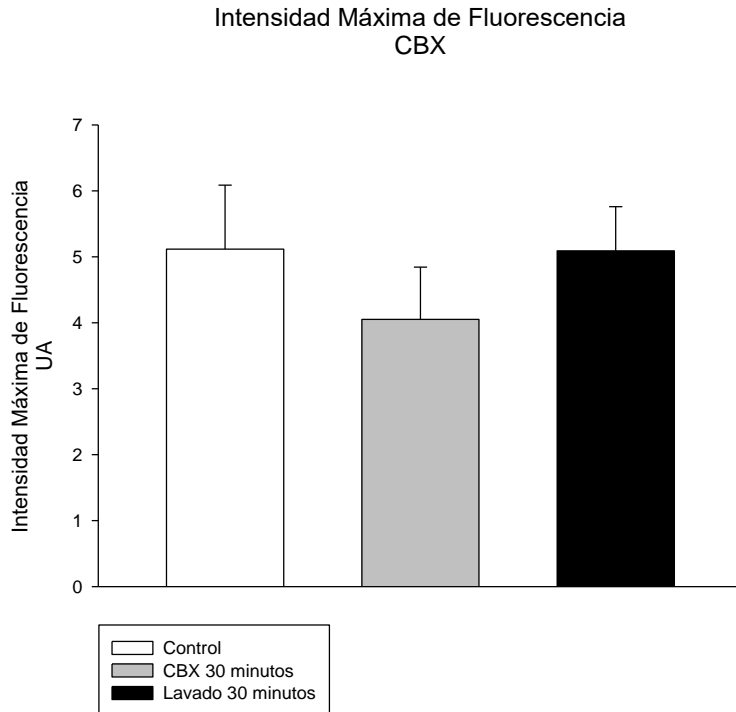


**Figura 14. Representación de la propagación de la onda de  $Ca^{2+}$  en las células MCF-7 perfundidas con CBX [100μM].** En el cuadro 1 se observa al grupo de células previo a la fotoestimulación, la célula estimulada se señala con el cuadro rojo. La imagen 2 y 3 se aprecia la propagación de la onda de  $Ca^{2+}$ , que en estas condiciones llega sólo a las células adyacentes a la estimulada.

Los resultados correspondientes al área bajo la curva se observan en la gráfica que aparece en la figura 15. Los resultados muestran una disminución del área después de la perfusión por 30 minutos con CBX y una recuperación de la misma después del lavado, sin embargo, estos cambios no fueron significativos. Mientras que, en la gráfica de intensidad máxima de fluorescencia (figura 16), se observa la misma tendencia, respecto al valor observado en el control.



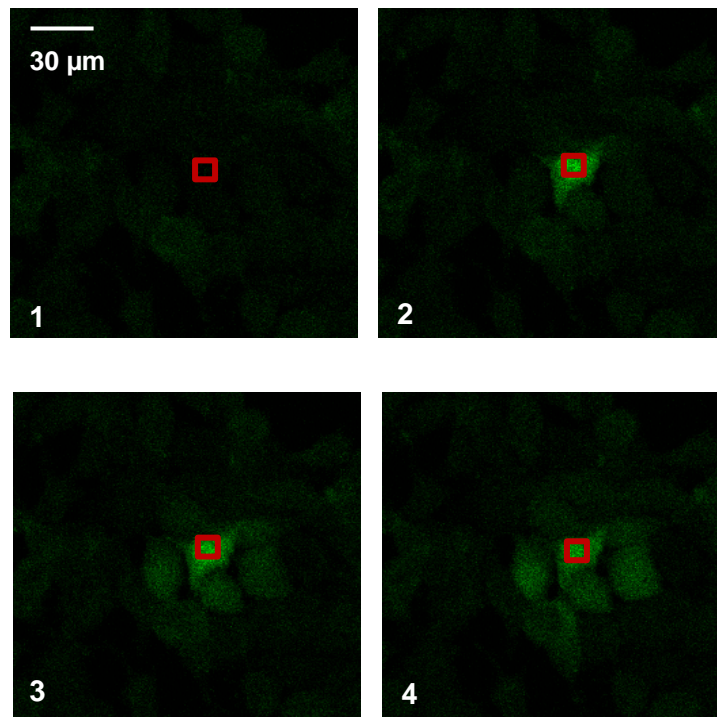
**Figura 15. Medición del área bajo la curva de la fluorescencia con CBX.** Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar obtenido de experimentos independientes (n=4). Los datos del grupo tratado con el bloqueador CBX muestran una tendencia a disminuir con respecto al control, sin embargo estos resultados no fueron significativos.



**Figura 16. Medición de la intensidad máxima de fluorescencia con CBX.** Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar obtenido de experimentos independientes (n=4). Los datos del grupo tratado con el bloqueador CBX muestran una tendencia a disminuir con respecto al control, sin embargo estos resultados no fueron significativos.

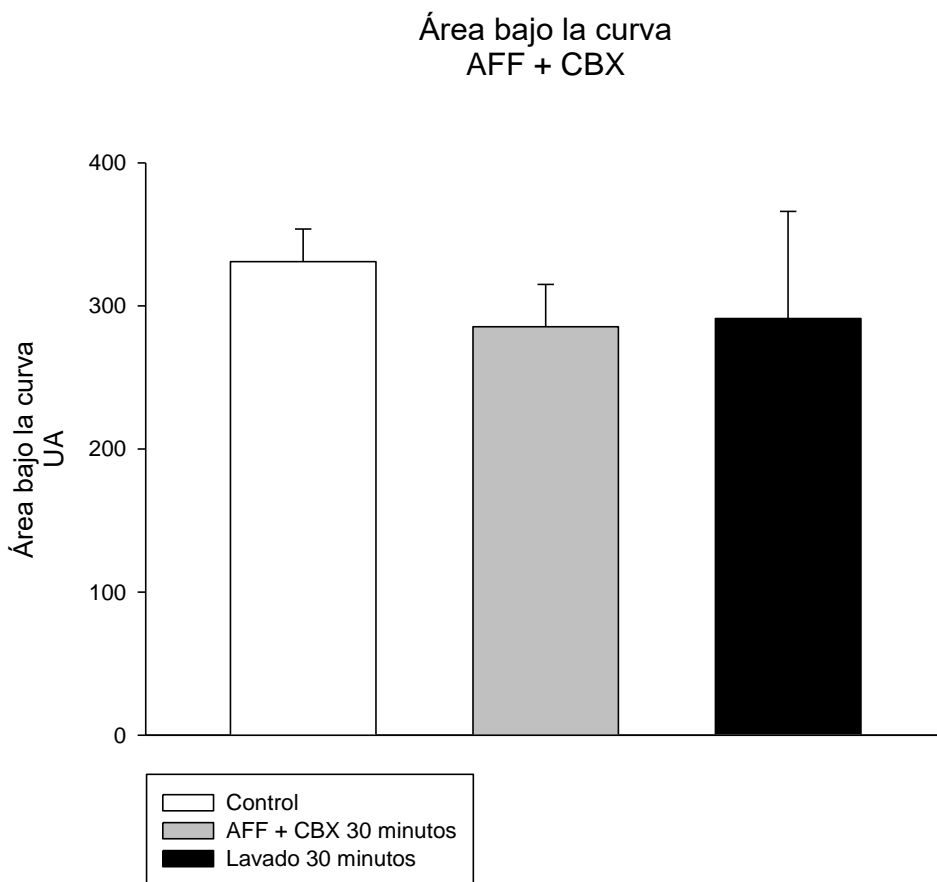
### *Ácido flufenámico y carbenoxolona*

Se hicieron experimentos con ambos bloqueadores inespecíficos, AFF y CBX, para observar los cambios subsiguientes a la fotoestimulación y la participación de las conexinas en la transmisión de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en la línea celular MCF-7 incubada con el fotosensibilizador AICIPc y la sonda Fluo4-FF AM, y sometida a la fotoestimulación (figura 17). Se realizó la medición del área bajo a curva de intensidad de fluorescencia contra tiempo. Se obtuvo también la gráfica de intensidad máxima de fluorescencia durante el tiempo de registro, ambas como medidas indirectas de la concentración del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .



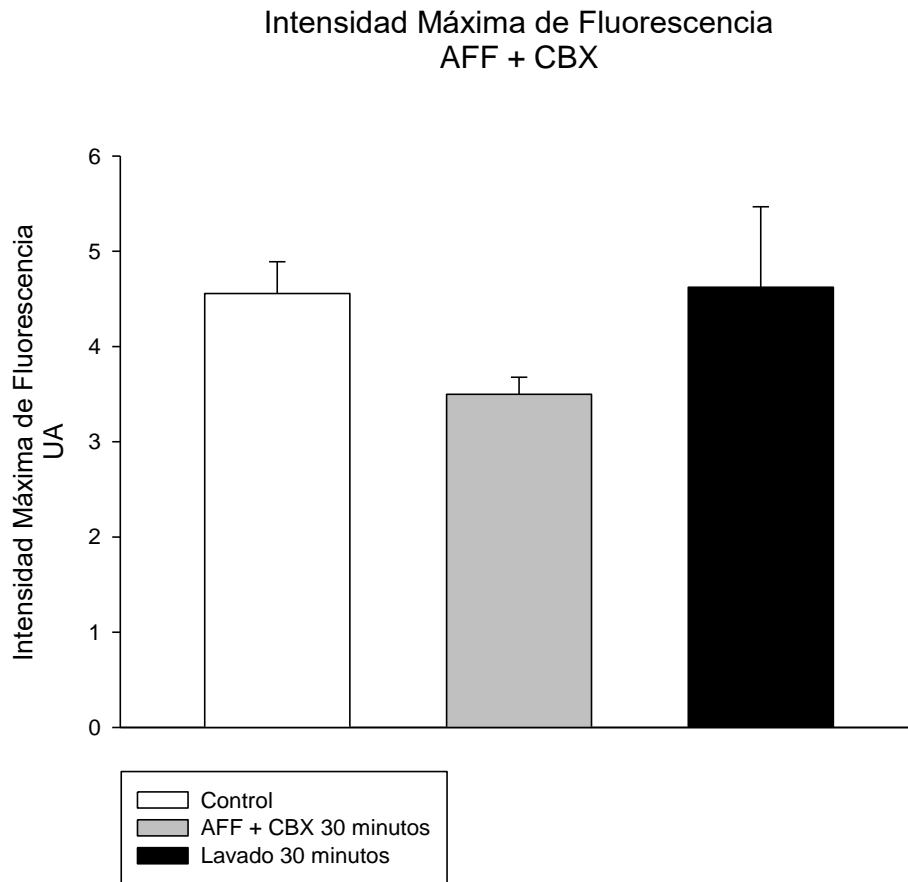
**Figura 17. Representación de la propagación de la onda de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células MCF-7 perfundidas con CBX [100µM] y AFF [100µM].** En el cuadro 1 se observa a las células antes de recibir el fotoestímulo, la célula estimulada se señala con el cuadro rojo. En la imagen 2, 3 y 4 se aprecian la propagación de la onda de  $\text{Ca}^{2+}$  conforme transcurre el tiempo, que en estas condiciones llega sólo a las células adyacentes a la estimulada.

Como se aprecia en la gráfica que aparece en la figura 18, se presenta una tendencia a la disminución del área respecto al valor observado en el control después de perfundir por 30 minutos a los bloqueadores, y una discreta recuperación después 30 minutos de lavado, sin embargo estos resultados no fueron significativos.



**Figura 18. Medición del área bajo la curva de la fluorescencia en presencia de AFF y CBX 100µM.** . Los valores representan la media ± el error estándar obtenido de experimentos independientes (n=5). Los datos del grupo tratado con los bloqueadores AFF + CBX muestran una tendencia a disminuir con respecto al control, sin embargo estos resultados no fueron significativos.

Para de intensidad máxima de fluorescencia, se observa en la gráfica (figura 19) la misma tendencia, respecto al valor observado en el control y en las diferentes condiciones de experimentación.



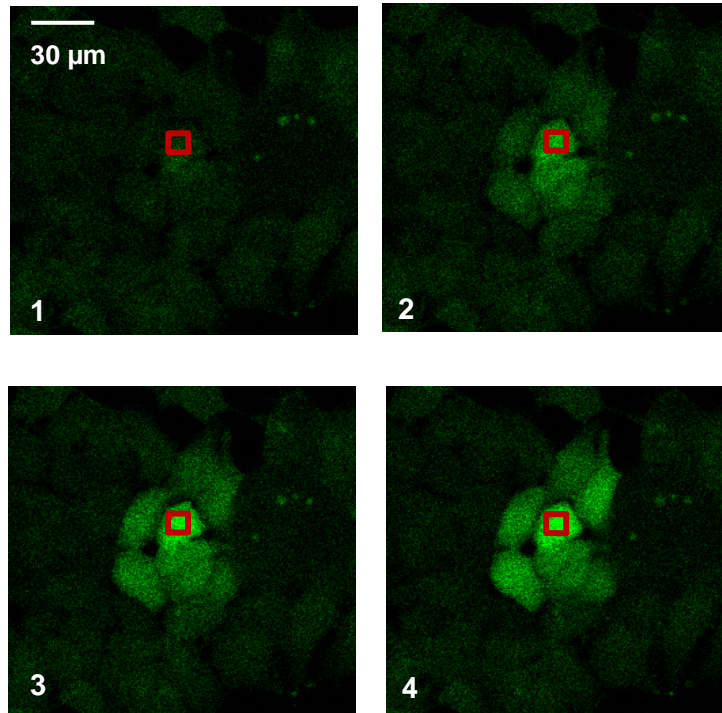
**Figura 19. Medición de la intensidad máxima de fluorescencia en presencia de CBX y AFF 100 $\mu$ M).** Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar obtenido de experimentos independientes (n=5). Los datos del grupo tratado con los bloqueadores muestran una tendencia a disminuir con respecto al control, sin embargo estos resultados no fueron significativos.

#### *Ácido flufenámico y carbenoxolona en solución normal y solución sin Ca<sup>2+</sup>*

Estos experimentos se realizaron con ambos bloqueadores inespecíficos en diferentes tiempos con solución con y sin Ca<sup>2+</sup>, esta última tenía además EGTA (con el quelante EGTA) para observar los cambios siguientes a la fotoestimulación y la participación de las conexinas en la transmisión de la señal de Ca<sup>2+</sup> así como la procedencia del mismo (intra o extracelular) en la línea celular MCF-7 incubada con el fotosensibilizador AICIPc y la sonda Fluo4-FF AM, y sometida a la



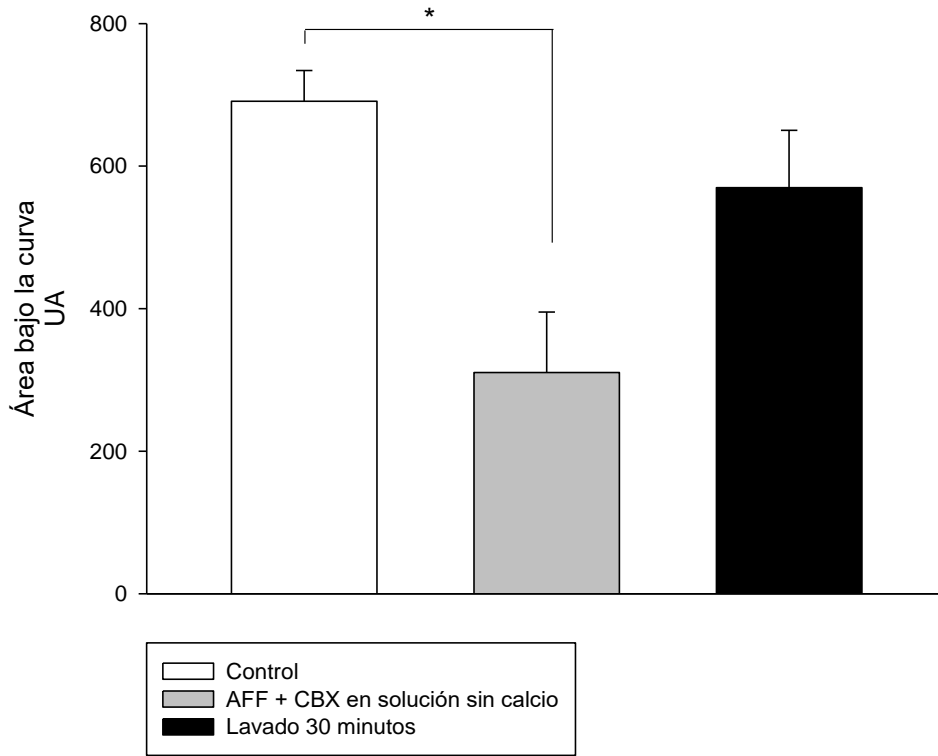
fotoestimulación (figura 20). Se realizó, al igual que en las condiciones pasadas, la medición del área bajo la curva de intensidad de fluorescencia contra tiempo. Se obtuvo también la gráfica de intensidad máxima de fluorescencia durante el tiempo de registro, ambas como medidas indirectas de la concentración del  $[Ca^{2+}]_i$ .



**Figura 20. Representación de la propagación de la onda de  $Ca^{2+}$  en las células MCF-7 en solución sin  $Ca^{2+}$  y EGTA [0.5 mM] adicionada con CBX [100µM] y AFF [100µM].** En el cuadro 1 se observa al grupo de células previo a la fotoestimulación, la célula estimulada se señala con el cuadro rojo. De la imagen 2 a la 4 se aprecia la propagación de la onda de  $Ca^{2+}$  que en estas condiciones no fue más allá que a la célula adyacente a la estimulada.

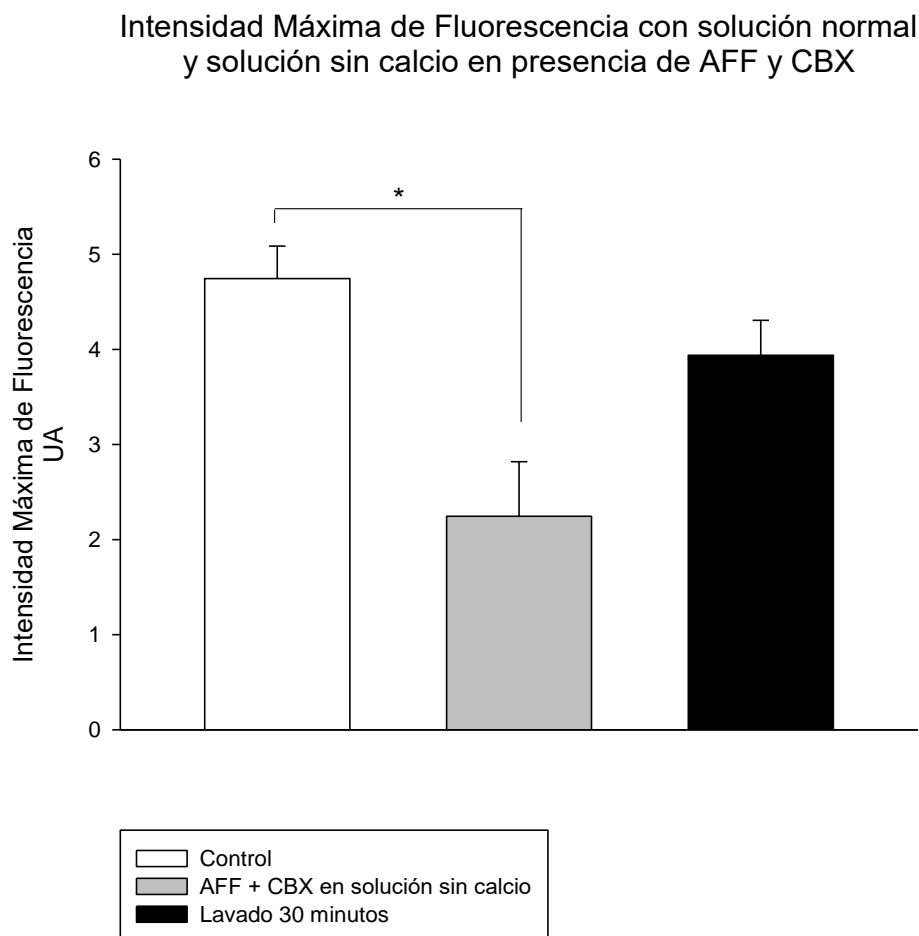
Como se aprecia en la gráfica que aparece en la figura 21, existe una disminución del área bajo la curva correspondiente a los experimentos realizados sin  $Ca^{2+}$  con ambos bloqueadores, presentando una diferencia significativa respecto al valor observado en el control, en donde la estimulación se hizo en ausencia de los bloqueadores y en solución normal.

Área bajo la curva con solución normal  
y solución sin calcio en presencia de  
AFF y CBX



**Figura 21. Medición del área bajo la curva de la fluorescencia en células MCF-7 en solución sin  $\text{Ca}^{2+}$  y EGTA [0.5 mM] en presencia de CBX y AFF ambos a una concentración de  $100\mu\text{M}$ .** Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media obtenidos de experimentos independientes ( $n=5$ ). Los datos del grupo tratado con la solución sin calcio (y el quelante EGTA [0.5 mM]) y los bloqueadores AFF y CBX fueron comparados con el control, siendo los valores significativamente menores.  $p < 0.05$  (\*)

Los valores de intensidad máxima de fluorescencia se observan en la gráfica de la figura 22, donde observamos un comportamiento parecido, es decir, una diferencia significativa respecto al valor observado en el control y en las diferentes condiciones de experimentación.



**Figura 22. Medición de la intensidad máxima de fluorescencia en células MCF-7 en solución sin  $\text{Ca}^{2+}$  y EGTA [0.5 mM] en presencia de CBX y AFF ambos a una concentración de  $100\mu\text{M}$ .** Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media obtenidos de experimentos independientes ( $n=5$ ). Los datos del grupo tratado con la solución sin calcio (y el quelante EGTA [0.5 mM]) y los bloqueadores AFF y CBX fueron comparados con el control, siendo los valores significativamente menores.  $p < 0.05$  (\*).

## DISCUSIÓN

A partir de que el cáncer de mama es una de las formas más peligrosas de cáncer por permanecer resistente a varios tratamientos y dado que muchas terapias no son específicas y matan células sanas y células cancerosas (Mfouo-Tynga y Abrahamse, 2013), el cáncer de mama localizado fue uno de los primeros blancos para la TFD. En estudios realizados por Dougherty usando derivados de hematoporfirinas (fotosensibilizadores de primera generación), la TFD mostró ser efectiva en estudios en pacientes con metástasis de la pared del pecho (Rollakamti et al., 2015). La TFD es una quimioterapia emergente dependiente de la luz, usada para el control de una variedad de neoplasias (Mfouo-Tynga y Abrahamse, 2015) y la citotoxicidad depende, además de otros factores, de la presencia de oxígeno (Penning et al., 1992).

Para este diseño experimental se emplearon células de la línea tumoral MCF-7. Las líneas celulares parecen ser un elemento clave para el diagnóstico molecular del cáncer de mama que puede ser empleado extensamente, y como en este caso, particularmente en diseños *in vitro* aplicados como modelos en la investigación de las neoplasias. Las células pertenecientes a la línea MCF-7, proveen un modelo adecuado para investigaciones relacionadas con medicamentos anticancerígenos, caracterizada por ser positiva a receptores de estrógeno, perteneciente al subtipo molecular luminal A, es poco agresiva y, considerada no invasiva (Comsa, et al., 2015). Sin embargo, los cultivos de esta línea contienen una fracción de *células madre tumorales* capaces de generar variabilidad clonal, que finalmente, puede ser la explicación para la heterogeneidad de esta línea celular y justifica su uso como modelos para estudiar los tumores cancerosos de mama (Nugoli et al., 2003). Estas características, permitieron que la línea MCF-7 se aplicara como modelo neoplásico adecuado para el estudio del papel de las conexinas en la propagación de las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  generadas por la TFD.

En clínica, la TFD envuelve típicamente la administración intravenosa del fotosensibilizador y la iluminación con una apropiada longitud de onda activando la fototoxicidad generando radicales libres y destruye células tumorales a través de múltiples mecanismos como son apoptosis, necrosis y respuesta inmune (Lei *et al.*, 2015).

La fototoxicidad de la iluminación usualmente afecta de 1-2 cm de profundidad (Xu *et al.*, 2012), para el desarrollo de este diseño experimental *in vitro*, el fotosensibilizador AICIPc se aplicó a los cultivos celulares en solución y después del tiempo de incubación (90 min) se incidió un láser en una célula localizada para provocar la citotoxicidad y finalmente la muerte de ésta célula y las células adyacentes como se puede observar en la figura 5. Esta figura muestra evidencias de las células MCF-7 que presentaron signos de muerte celular después del fotoestímulo apreciando los efectos de la TFD sobre la célula irradiada y las que la rodean empleando uno de los indicadores del proceso muerte celular, la unión de anexina V y yoduro de propídio. Este ensayo permitió determinar la proporción de células que murieron por apoptosis o necrosis en la población de células tratadas con TFD.

En la imagen 5A de la misma figura, se presenta una gráfica de barras que señala la diferencia en el número de células con signos de muerte en condiciones control y cuando los bloqueadores de *GJ* y hemicanales (CBX y AFF) se encontraban presentes, siendo los valores  $6.6 \pm 0.97$  y  $2.4 \pm 0.4$  células, respectivamente,  $n=5$ ,  $p=0.004$ . En la figura 5B, se observa una imagen tomada con el microscopio confocal y muestra la condición control, en donde prácticamente todas las células que rodean a la irradiada presentan signos de muerte celular, al parecer por un proceso necrótico. Mientras que, en las condiciones donde la fotoestimulación se realizó en presencia de los bloqueadores de *GJ* y hemicanales, la CBX y el AFF, el número de células con datos de muerte fue significativamente menor (imagen 5C).

Estos resultados coinciden con lo reportado previamente por Mfouo-Tynga y Abrahamse en 2015, donde en un estudio enfocado en las propiedades de las ftalocianinas, estas se identificaron como fuertes inductores de citodaño y preferencialmente se acumulan en células tumorales; *in vitro*, han sido asociadas con la inducción de vías apoptóticas y necróticas mientras que *en vivo* promueven la muerte celular a través de la translocación de p38 activado a la mitocondria, la fosforilación de BCL2 y/o BCL-X2 a través de la facilitación de la liberación del citocromo C desde la mitocondria mediado por caspasas, el anclaje de PARP y la inhibición de la vía de P13/Akt/mTOR.

Esta evidencia de muerte celular encontrada en los cultivos, podría escalar a la aplicación clínica, ya que, los mismos autores en un artículo publicado en 2013, señalan que la TFD aplicada como un proceso sincronizado que requiere de la exposición del tejido canceroso a un fotosensibilizador administrado vía tópica, oral o intravenosa dependiendo de la localización del tejido a tratar, en los experimentos *in vitro* la administración se asemeja a la aplicada vía intravenosa, dado que se aplicó diluida. Por su puesto, tal como lo apoyan otros autores, para mejorar la eficacia de la TDF y aplicarla en pacientes es muy importante entender su fundamento bioquímico (Penning *et al.*, 1992).

Dado que el fotosensibilizador es uno de factores claves y que juega un papel crítico en la TFD, la elección de utilizar en este proyecto la AICIPc, ofrece propiedades ventajosas comparados con los derivados de las porfirinas además de que tienen una absorbancia máxima cerca de los 670 nm, a la cual, la profundidad de la penetración de la luz en el tejido es dos veces la de las porfirinas a 630 nm (Xu *et al.*, 2012), esta evidencia ofrece una perspectiva más amplia del uso futuro de la TFD en la práctica clínica, apoyada por los resultados correspondientes a la inducción de muerte celular derivados de las condiciones probadas en este proyecto.

Como se mencionó en la introducción, las células MCF-7 expresan principalmente a las Cx26 y Cx43 (Grek et al., 2016). En la imagen 6, se muestran dos microfotografías representativas referentes a la presencia de la Cx26 y 43 en las células MCF-7. Empleando un anticuerpo específico para la conexina 43 (imagen A) y otro para la conexina 26 (imagen B), se logró apreciar la presencia de ambas conexinas (color verde) en las células MCF-7, el marcaje se observa en un patrón de puntillado y sugiere una localización tanto membranal, como citoplasmática.

Ocasionalmente se observó un patrón en forma de placas, sin embargo, no fue predominante. Esto contrasta con la información reportada en la bibliografía, sin embargo puede ser consecuencia de que la línea MCF-7, que a menudo se considera como una entidad, pero se compone de un gran número de fenotipos individuales la mayoría de los cuales constituyen sólo pequeñas proporciones de la población total. Estos fenotipos difieren en el perfil de expresión génica, la expresión del receptor y la vía de señalización. A pesar de las diferencias en la tasa de proliferación de fenotipos individuales, se mantiene de alguna manera un equilibrio de múltiples fenotipos durante el cultivo progresivo de la línea, tal vez por algún tipo de cooperación de señalización. Sin embargo, una pregunta crítica con respecto a la terapia es si las sublíneas emergentes expresan receptores alterados y vías de señalización asociadas (Baguley *et al*, 2011).

Las Cx43 y 26 podrían estar formando conexones unidas a otros subtipos de conexinas, participando en la señalización metabólica e iónica “silenciosa” que está constantemente en marcha en células ensambladas y está incrementando su apreciación como un proceso clave en el control del desarrollo y crecimiento celular y confiriéndoles un rol en la señalización celular más directa, esto apoyado en estudios con fluoróforos sensibles al calcio y estudios de imagen (Howard *et al.*, 2002). Los hemicanales también pueden tener un rol importante en la regulación de la  $[Ca^{2+}]$  (Nielsen *et al.*, 2012).

Debido a que la comunicación intercelular no sólo se lleva a cabo por *GJ*, estas conexinas podrían estar mediando la transmisión de la señal de muerte mediante la formación de hemicanales. La pérdida de compuestos relevantes como la glucosa, el ATP y NAD<sup>+</sup> así como de los radicales libres como el glutatión, el ácido ascórbico, pueden contribuir al daño y lo muerte celular además la liberación de K<sup>+</sup> extracelular glutamato y metabolitos del ácido araquidónico pueden causar despolarización y excitotoxicidad y así la muerte celular es comunicada a las células vecinas (Nielsen *et al.*, 2012).

Una vez corroborada la presencia de estas conexinas, y después de haber observado que la presencia de los bloqueadores antes mencionados delimitan la propagación del daño celular, se procedió a investigar el papel del Ca<sup>2+</sup> en la señalización celular relacionada a la muerte después de aplicar TFD. La hipótesis de que un incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> puede ser un paso común en el desarrollo de la citotoxicidad mediada por TFD surgió en 1992 y en ese mismo año el primer reporte indicando que una elevación transitoria de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> sirve como una señal en el desencadenamiento de una respuesta celular que disminuye el daño inducido por la TFD. Entonces el proceso desencadenado por la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> permite a la célula acumular daño subcelular y se puede especular que el cambio transitorio de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> es una señal de inducción de un proceso de reparación celular (Penning *et al.*, 1992).

Las ondas de Ca<sup>2+</sup> han sido observadas y descritas en diferentes tipos celulares, por ejemplo, epitelio, tejido nervioso, hígado y células de músculo liso (Nielsen *et al.*, 2012). Esta parte del proyecto se diseñó de manera que se pudiera vislumbrar de dónde proviene el Ca<sup>2+</sup> y observar si los cambios del mismo eran transitorios o sostenidos y posteriormente, evaluar la participación de las conexinas en la transmisión de esta señal, ya fuera formando hemicanales o *GJ*.



Como se mencionó en la sección de resultados, se estudiaron 5 grupos, cada uno comparados con su respectivo control, en la figura 8 se muestra una imagen representativa del mismo. En cada condición se midió el área bajo la curva del registro de cambio de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  contra el tiempo y la intensidad máxima de fluorescencia alcanzada en ese periodo. El primer grupo se conformó por células MCF-7 perfundidas con solución normal como control y con solución sin  $\text{Ca}^{2+}$  y EGTA [0.5 mM] por 10 minutos. Los datos indican que en comparación con el control, no hubo un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia después de la perfusión por 10 minutos de solución sin  $\text{Ca}^{2+}$  y EGTA, ni tampoco con el registro realizado después de 30 minutos de lavado con solución normal.

Estos resultados permiten sugerir que el movimiento del  $\text{Ca}^{2+}$  es resultado del vaciado de los almacenes intracelulares, apoyado en un estudio realizado en 1993, donde después de la aplicación de EGTA y la aplicación de la TFD, se demostró que la adición del quelante afecta muy poco la inducción del incremento en el calcio intracelular indicando que el incremento del nivel de calcio libre es principalmente derivado de los almacenes intracelulares (Agarwal et al., 1993).

Sin embargo, dada la ausencia de resultados estadísticamente significativos, una posibilidad es aumentar la  $n$  o emplear otro tipo de fármacos y condiciones experimentales que permitan aislar mejor el efecto. Por ejemplo, en células CHO un tratamiento con verapamil (un bloqueador de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y otro con una solución DPBS con 1mM de EGTA, mostró reducir la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  pero no eliminó la respuesta del mismo después de la fotoestimulación, empleando para esto AICIPc como fotosensibilizador (Penning et al., 1992).

De acuerdo con la literatura, los fotosensibilizadores de tercera generación, como las ftalocianinas, se acumulan en la mitocondria (Allison y Sibata, 2010) y su eficacia en la TFD depende del sitio anatómico a tratar y la dosis aplicada (Benerjee, et al., 2017). Y a partir de que desde 1944 el estudio de la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  en la

carcinogénesis y en la progresión tumoral es considerada un aspecto clave en la biología del cáncer. Los incrementos en las concentraciones del  $[Ca^{2+}]_i$  son resultado de: primero, la entrada de  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular y, segundo, la liberación de  $Ca^{2+}$  desde los almacenes intracelulares, predominantemente del retículo endoplásmico (RE). De hecho, cuando el RE libera su contenido de  $Ca^{2+}$  en el citosol, ocurre un subsecuente influjo de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de membrana, el cual mantiene la señal de  $Ca^{2+}$  y permite que los almacenes vacíos se llenen de nuevo, incluyendo el RE (Marchi y Pinton, 2016). Esto respalda la sugerencia de que en estas condiciones experimentales el  $Ca^{2+}$  que se propaga, proviene de los almacenes intracelulares debido a las características de fotodaño desencadenado por el fotosensibilizador empleado.

La hipótesis de que un incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  puede ser un paso común en el desarrollo de la citotoxicidad mediada por TFD surgió en 1992 y en ese mismo año el primer reporte indicando que una elevación transitoria de la  $[Ca^{2+}]_i$  sirve como una señal en el desencadenamiento de una respuesta celular que disminuye el daño inducido por la TFD. Entonces el proceso desencadenado por la  $[Ca^{2+}]_i$  permite a la célula acumular daño subcelular. Se puede especular que el cambio transitorio de la  $[Ca^{2+}]_i$  es una señal de inducción de un proceso de reparación celular (Penning *et al.*, 1992). Esto coincide con las curvas de los registros individuales de fotoestimulación, donde en todas las condiciones se observaron cambios sostenidos en la  $[Ca^{2+}]_i$  y no transitorios (figura no mostrada). Un incremento sostenido de la  $[Ca^{2+}]_i$  puede permitir la muerte celular por varias vías: perturbando la organización del citoesqueleto, activando enzimas degradantes (fosfolipasas, proteasa y endonucleasas) y perturbar la función mitocondrial (Penning *et al.*, 1992).

La activación de enzimas como la fosfolipasas C y fosfolipasa A, localizadas en la membrana son un evento inmediato de la apoptosis mediada por TFD (Tajiri *et al.*, 1998) ya que el  $Ca^{2+}$  intracelular actúa como segundo mensajero en la señalización intracelular en respuesta a una variedad de estímulos, puede relacionarse

fuertemente a la activación de estas enzimas. También puede estar ligado a la apoptosis inducida por TFD (Agarwal et al., 1993), esto soporta los datos obtenidos en los ensayos de muerte celular y fortalece el supuesto de que una vez que el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado de la célula estimulada puede inducir cambios intracelulares en las células adyacentes y finalmente desencadenar la muerte celular en la línea celular MCF-7.

Esta muerte puede ser causada por el  $\text{Ca}^{2+}$  que está actuando como segundo mensajero ya que la elevación de su concentración a nivel intracelular puede resultar de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  secuestrado de los almacenes intracelulares de la mitocondria y RE o desde el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Agarwal et al., 1993) y se propone que una vez iniciado vaciado del RE por el fotodaño, se origina una unión de ligandos fisiológicos a receptores de la superficie que activan a la fosfolipasa C para producir  $\text{IP}_3$ , un segundo mensajero que al unirse a su receptor favorece la rápida liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma. El  $\text{Ca}^{2+}$  liberado en exceso puede ser transferido a la mitocondria, generando la apertura del poro de transición mitocondrial y liberación de factores proapoptóticos al citosol (Marchi y Pinton, 2016).

Ahora bien, los resultados de los experimentos realizados con los bloqueadores inespecíficos de conexinas, para el caso del AFF (figura 12 y 13), se aprecia una disminución en el área bajo la curva después de 30 minutos de haber perfundido las células en comparación con su respectivo control. Este efecto era el esperado dado que el AFF inhibe *GJ* y *hemicanales*, su efecto se desarrolla y se revierte rápidamente ya que se une a un sitio modulador, presumiblemente dentro de la membrana, induciendo el cierre del canal (Guinamard *et al.*, 2013).

En contraste con lo reportado para la CBX, conocida en fisiología celular como un bloqueador clásico de *GJ* (Beaumont *et al.*, 2011), durante la realización de la serie experimental en la que se administró CBX al cultivo celular a través de perfusión se observó una discreta disminución en los valores del área bajo la curva y la intensidad máxima de fluorescencia en relación al control que no fueron

estadísticamente significativos (figuras 15 y 16). Sin embargo, estos resultados marcan la pauta para seguir investigando qué Cx participan activamente en la propagación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  ya sea formando hemicanales o propiamente GJ.

Debido a lo descrito en la literatura sobre los efectos bloqueadores del AFF y la CBX, se esperaba que al coaplicarlos su efecto bloqueador se potencializara y se viera reflejado en valores menores del área bajo la curva e intensidad de fluorescencia, la condición experimental 4 fue: células MCF-7 perfundidas con AFF [100 $\mu\text{M}$ ]+ CBX [100 $\mu\text{M}$ ] por 30 minutos, los resultados indican que no hubo cambios significativos, condición para la cuál aún no encontramos una explicación satisfactoria.

La condición de experimentación número 5 fue la combinación de todas las anteriores, aplicándose a las células MCF-7 una solución con AFF [100 $\mu\text{M}$ ]+ CBX [100 $\mu\text{M}$ ] por un total de 30 minutos, de los cuales, en los últimos 10 se cambiaba a una solución sin  $\text{Ca}^{2+}$  pero aún con la presencia de ambos bloqueadores. En esta sección obtuvimos resultados que mostraban una disminución significativa de los parámetros medidos cuando se perfundieron los bloqueadores en solución libre de  $\text{Ca}^{2+}$ . No se propone algún mecanismo que explique claramente por qué estos resultados, sin embargo, además de la descarga de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte del RE, después de la TFD, la mitocondria toma una gran cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  (hasta 10 veces más que la concentración del citosol) debido a su cercanía con el ER, la presencia de un gradiente electroquímico dentro de la mitocondria, activa al complejo MCU por sus siglas en inglés *mitochondrial calcium uniporter*. Además para amortiguar las funciones del  $\text{Ca}^{2+}$ , la acumulación mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  regula el metabolismo y la supervivencia celular (Marchi y Pinton, 2016) y varias líneas de evidencia indican que el papel protector de Cx43 en las mitocondrias puede ser exclusivo de esta conexina. Las Cx mitocondriales, y particularmente la Cx43 no se ha investigado en muchos tejidos, pero el inhibidor de la unión gap carbenoxolona inhibe la apertura del poro de transición de permeabilidad en las mitocondrias aisladas de astrocitos

pero no en las mitocondrias de las células hepáticas (que expresan Cx26 y Cx32) (Azarashvili *et al.*, 2011), si esto está ocurriendo en las células neoplásicas de mama MCF-7, podría ser una explicación a los resultados que se obtuvieron.

Hasta ahora es sabido que los efectos citotóxicos directos de la TFD causan estrés oxidativo en el RE y daño foto-oxidativo a las células, resultando en apoptosis o necrosis del tumor. La liberación extracelular de proteínas intracelulares, conocidas como patrones moleculares asociados al daño (*DAMP's* por sus siglas en inglés), típicamente ocurre entre 1-4 horas después de la TFD (Benerjee, *et al.*, 2017), las elevaciones transitorias intracelulares de  $Ca^{2+}$  inducidas en células individuales son propagadas en forma de ondas a las células vecinas (Stout *et al.*, 2004).

Camino alternativo a la TFD han sido explorados a través de líneas celulares y modelos animales, específicamente su rol en combinación con terapias como la radioterapia y la quimioterapia para el tratamiento de cáncer de mama y sus secuelas, dada la capacidad de los fotosensibilizadores de actuar en combinación con las terapias ya mencionadas (Benerjee, *et al.*, 2017), es por eso que estos resultados permiten el planteamiento de nuevas posibilidades de investigación.

Es importante aclarar que varios oncosupresores muestran su actividad ligada al re-arreglo de la dinámica del  $Ca^{2+}$ . Esto incluye la modulación de la captura de  $Ca^{2+}$  por la mitocondria y la inducción de apoptosis mediada por la liberación de  $Ca^{2+}$  dada por BRCA1 (gen de la susceptibilidad 1 de cáncer de mama y ovario) (Marchi y Pinton, 2016), por lo cual también es importante darle un mayor seguimiento a la dinámica genética de los cultivos, y explorar otras formas en las que esté actuando la señal de  $Ca^{2+}$ .

Esto permitirá comprender la dinámica molecular de la TFD y continuar su mejoramiento como terapia individual o en conjunto con alguna de las ya existentes. Tal como se hace desde 1990 cuando Raab, Jodlbauer, Jesionick y Von Tappeiner

descubrieron que la acridina era un agente fotosensibilizador. Ellos explicaron y acuñaron en el término reacción fotodinámica y, eventualmente, para principios de 1900 llevaron la TFD a la clínica. A partir de ahí, la TDF ha ido evolucionando según la investigación lo permite. Desde que las lesiones pueden ser más profundas que superficiales, el desarrollo de fotosensibilizadores ha tenido una tendencia a buscar una longitud de onda de activación mucho más alta (Allison and Sibata, 2010).

El fotosensibilizador que se aplicó pertenece al grupo de las ftalocianinas, tiene bandas de absorción fuertes, en el rango de los 670nm. Posee propiedades fluorescentes y puede ser activado clínicamente a  $100 \text{ J/cm}^2$  (Allison and Sibata, 2010) además de la localización subcelular del fotosensibilizador que será la membrana plasmática, lisosomas, mitocondrias, aparato de Golgi o RE. Esta clase de fotosensibilizadores también parece tener propiedades sensibles a la radiación y la combinación de la TFD y la radiación es una posibilidad intrigante de tratamiento médico. Algunos otros sensibilizadores han sido encontrados útiles como radiosensibilizadores. Datos preliminares sugieren que pueden ser usados en el tratamiento de metástasis de algunas neoplasias. Sin embargo, no han sido empleados en el tratamiento de cáncer de mama, pero la iniciativa de usarla TFD en conjunto con otros tratamientos sigue siendo de interés (Benerjee, *et al.*, 2017).

El mecanismo por el cual la AICIPc está actuando sobre las células MCF-7 no queda claro, sin embargo, funciona de manera *in vitro* ya que cuando se realizaron las pruebas de viabilidad con MTT, la parte de la población celular que fue irradiada con luz roja mostró una mayor cantidad de células muertas (imagen no mostrada). La primera aplicación de la TFD para el tratamiento del cáncer de mama cuando el tratamiento de una metástasis de cáncer de piel en 1993 notando que fue un tratamiento efectivo en los pacientes seleccionados. La TFD como tratamiento para el cáncer de mama sigue estando en las etapas preliminares de investigación, sin embargo, su baja toxicidad y su potencial efecto inmunológico sugieren que puede ser adecuada como tratamiento para el cáncer de mama (Benerjee, *et al.*, 2017).

El reto recurrente para este tratamiento es trasladar los avances en el entendimiento de los efectos en líneas celulares y en modelos animales a la práctica clínica (Benerjee, *et al.*, 2017).

Las evidencias apuntan a que dos participantes importantes de la comunicación de la señal de muerte celular son el  $\text{Ca}^{2+}$ , como ya se había mencionado anteriormente y el  $\text{IP}_3$ . El estudio de la inducción de la apoptosis, en un sistema de células de linfoma murino, con la administración de AICIPc, mostró que el tratamiento con TFD activa enzimas localizadas en la membrana PLC y PLA2. Estas enzimas degradan el fosfatidilinositol bifosfato para generar  $\text{IP}_3$  (Agarwal *et al.*, 1993). Otros estudios apuntan a que cuando la autofagia es bloqueada, las células MCF-7 desarrollan resistencia a las ftalocianinas, resultando en un incremento en la supervivencia celular (Mfouo-Tynga y Abrahamse, 2015). Es por eso de vital importancia comprender el mecanismo molecular por el cual la TFD completa su efecto citotóxico y hacer una comparativa con los efectos en la clínica y así mejorar su eficacia y su campo de aplicación a neoplasias más profundas.

Hasta ahora, los efectos fototóxicos de la TFD, en la clínica, indican que generalmente no es selectiva. Los fotosensibilizadores son tomados por células sanas y tumorales, aunque el tejido normal es eliminado o limpiado con el tiempo, mientras que en las células neoplásicas no. Esto permite la retención del fotosensibilizador en el tejido tumoral, que, combinado con la iluminación específica, da selectividad a la TFD, la cual puede ser mejorada conociendo los medios por los cuales se propagan las señales de muerte y así potenciarlas.

## PERSPECTIVAS

La práctica clínica del a TFD tiene aún muchas oportunidades de investigación para mejorar su aplicación y tratar diferentes neoplasias. Comparado con otros tratamientos estándar como la cirugía, la radiación y la quimioterapia, los cuales pueden tener importantes efectos secundarios y resistencia a los medicamentos, es esencial enfocarse en innovar tratamientos terapéuticos. La TFD está bien establecida como un tratamiento innovador para combatir los tumores por su alta tasa de curación y baja tasa de recurrencia. Se ha iniciado su aplicación en diferentes enfermedades, incluyendo al cáncer (Lei *et al.*, 2015). Dirigir el fotosensibilizador al área de interés es otra oportunidad de estudio. Hay múltiples investigaciones en las que, según el tipo de cáncer a tratar, unen diferentes moléculas con la finalidad de volver más específica la acción de los mismos. Un ejemplo es la unión de análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (por sus siglas en inglés gonadotropin-releasing hormone, GnRH) a nanopartículas magnéticas, como de óxido de hierro o nanopartículas de hierro y platino fueron reportadas capaces de facilitar su acumulación en células cancerosas teniendo como blanco los receptores de GnRH (Xu *et al.*, 2012).

Con la finalidad de mejorar la selectividad de las ftalocianinas se han conjugado con glicanos, polietilenglicoles, el grupo 1,3-bis(dimetilamino)-2-propoxi, incrementando así su absorción a nivel celular para generar un fotodaño mayor (Xu *et al.*, 2012).

Mayor investigación clínica puede permitir a la TFD ser considerada como un método de vacunación en contra de los tumores, esto, claro puede ser una gran ventaja para pacientes tratados por cáncer de mama primario y podría resultar también en la adquisición de inmunidad en contra del cáncer en sitios distantes para todas las metástasis clones del tumor primario (Korbelik, 2010). Bajo estas circunstancias, la posición recurrente de la TFD como un potencial complementario de otras terapias puede ser extendida a convertirse en un estándar del cuidado en contra del cáncer de mama, por su puesto, se requiere más investigación para que la TFD sea usada exitosamente en tumores primarios de mama.



## CONCLUSIONES

De acuerdo con lo observado durante el desarrollo de este proyecto se puede concluir lo siguiente:

- La fotoestimulación genera muerte en la célula irradiada y en las que entran en contacto directo con dicha célula.
- Nuestros resultados sugieren que el proceso de muerte celular se genera por necrosis.
- Las conexinas 26 y 43 se encuentran presentes en las células MCF-7.
- Al aplicar la fotoestimulación, se genera un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  en la célula irradiada y este incremento se propaga a las células vecinas.
- Nuestros resultados sugieren que dicho incremento depende principalmente del  $Ca^{2+}$  liberado de los almacenes intracelulares y una pequeña cantidad proviene del medio extracelular.
- Cuando los bloqueadores inespecíficos de conexinas, AFF y CBX se encuentran presentes, la propagación de la onda de  $Ca^{2+}$  disminuye al igual que su incremento en las células que rodean a la célula estimulada.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, M., Larkin, H., Zaidi, S., Mukhtar, H., and Oleinick N. (1993). Phospholipase Activation Triggers Apoptosis in Photosensitized Mouse Lymphoma Cells. *Cancer Research*, (53) 5897-5902.
- Allison, R., and Sibata, C. (2010). Oncologic Photodynamic Therapy Photosensitizers: a Clinical Review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. Jun;7 (2):61-75.
- ATCC. Morphology of ATCC® HTB-22. Consultado el 30 de Mayo de 2014. <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx#documentation>.
- Azarashvili T, Baburina Y, Grachev D, Krestinina O, Evtodienko Y, Stricker R, Reiser G. (2011). Calcium-induced permeability transition in rat brain mitochondria is promoted by carbenoxolone through targeting connexin43. *Am J Physiol Cell Physiol*.; 300:C707–C720.
- Bacellar, I., Tsubone, T., Pavani, C. and Baptista, M. (2015). Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. *Int. J. Mol. Sci.*; (16): 20523-20559.
- Baguley, B. and Leung, E. (2011). Heterogeneity of Phenotype in Breast Cancer Cell Lines. In: *Breast Cancer - Carcinogenesis, Cell Growth and Signalling Pathways*, Rijeka, InTech open, pp. 245-256.
- Beaumont, M., and Maccaferri, G. (2011). Tales of a Dirty Drug: Carbenoxolone, Gap Junctions, and Seizures. *G. J Physiol*; 589(7):1663–1680.
- Benerjee, S., MacRobert, A., Mosse, C., Periera, B., Bown, S. and Keshtgar, M. (2017). Photodynamic Therapy: Inception to Application in Breast Cancer. *The Breast* 31:105-113.
- Berridge, M. (1993). Inositol trisphosphate and Ca<sup>2+</sup> signalling. *Nature*. 361:315–325.
- Bonnett R. (2004). Metal complexes for photodynamic therapy. McCleverty JA, Meyer TJ, editors. *Comprehensive inorganic chemistry II*. Oxford: Elsevier Pergamon. 945-1003.

- Brücher B, Jamal IS. (2014). Cell-cell communication in the tumor microenvironment, carcinogenesis and anticancer treatment. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 34: 213-243.
- Butterworth, K., McMahon, S., Hounsell, A., O'Sullivan, J., and Prise, K. (2013). Bystander Signalling: Exploring Clinical Relevance Through New Approaches and New Models. *Clinical Oncology* 25; 586-592.
- Buytaert, E., Callewaert, G., Hendrickx, N., Scorrano, L., Hartmann, D., Missiaen, L., Vandenheede, J., Grooten, J., Agostinis, P. (2006). Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *FASEB J*. 20(6):756-8.
- Buytaert, E., Dewaele, M. and Agostinis, P. (2007). Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et biophysica acta*. 1:86-107.
- Calì, B., Ceolin, S., Ceriani, F., Bortolozzi, M., Agnellini, A., Zorzi, V., Predonzani, A., Vincenzo, B., Bronte, B., Molon, B., and Mammano, F. (2015). Critical role of gap junction communication, calcium and nitric oxide signaling in bystander responses to focal photodynamic injury. *Oncotarget*. 6: 12, 10161-10174.
- Castano, A., Demidova, T., and Hamblin, M. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn Photodyn*. 1(4): 279-293.
- Celli, J. Spring, B., Rizvi, I., Evans, C., Samkoe, K., Verma, S., Pogue, B. and Hasan, T. (2010). Imaging and Photodynamic Therapy: Mechanisms, Monitoring, and Optimization. *Chemical Reviews*; 110(5): 2795-2838.
- Chakraborty, A., Held, K. D., Prise, K. M., Liber, H. L. and Redmond, R. W. (2009). Bystander Effects Induced by Diffusing Mediators after Photodynamic Stress. *Radiat. Res.*; 172: 74-81.
- Clapham D. (2007). Calcium signaling. *Cell*; 131:1047-1058.
- Comsa, S., Cimpean, A. and Raica, M. (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 Years of Experience in Research. *Anticancer research* 35: 3147-3154  
Consultado en [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)

- Dalbasti, T., Cagli, S., Kilinc, E., Oktar, N. and Ozsoz, M. (2002). Online electrochemical monitoring of nitric oxide during photodynamic therapy. *Nitric Oxide-Biol Ch.*; 7(4):301-305.
- Ding, Y., and Nguyen, T. (2013). APQ1, a quinoline derivative, induces apoptosis in T47D breast cancer cells through activation of caspase-8 and caspase-9. *Apoptosis*. 18; 9 1071–1082.
- Ding, Y., Prasain, K., Nguyen, T., Hua D.H., Nguyen T.A. (2012). The effect of the PQ1 anti-breast cancer agent on normal tissue. *Anticancer Drugs*. 23; 9, 897–905.
- Dos Santos, A., Terra, L., Wailemann, R., Oliveira, T., de Moraes, G., Franco, M., Meotti, F., Bruni-Cardoso, A., Baptista, M., and Labriola, L. (2017). Methylene Blue Photodynamic Therapy Induces Selective and Massive Cell Death in Human Breast Cancer Cells. *BMC Cancer*. 17:94.
- El-Sabban, M., Abi-Mosleh, L., and Talhouk, R. (2003). Developmental Regulation of Gap Junctions and Their Role in Mammary Epithelial Cell Differentiation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 8:4
- Ferlay, I. Soerjomataram, M. Ervik, D. Forman, F. Bray. (2012). Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide; GLOBOCAN. Consultado en: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx).
- Ferlay, I. Soerjomataram, M. Ervik, D. Forman, F. Bray. (2014). International Agency for Research on Cancer. Breast Cancer. Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. GLOBOCAN (IARC), Section of Cancer Surveillance.
- Ferlay, J., Parkin, D., and Steliarova-Foucher E. (2010). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *European Journal of Cancer*. 46 (4): 765-781
- Fuchs Y., Steller H. (2014). Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*. 1-16.
- Futreal, P., Wooster, R., Stratton, M. (2005). Somatic mutations in human cancer: insights from resequencing the protein kinase gene family. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*; 70:43-49.

- Granger, N., and Senchenkova, E. (2010). Inflammation and the Microcirculation. Chapter 6 Angiogenesis. San Rafael Morgan & Claypool Life Sciences. Consultado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53373/>.
- Granville, D., Ruehlmann, D., Choy, J., Cassidy, B., Hunt, D., Van Breemen, C. and McManus, B. (2001). Bcl-2 increases emptying of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> stores during photodynamic therapy-induced apoptosis. *Cell calcium*. 30(5):343-350.
- Grek, C., Rheet, M., Bruce, J., Ghatnekar, G., Yeh, E. (2016). Connexin 43, Breast cancer tumor suppressor: Missed connections? *Cancer Letters* 374; 117-126.
- Grek, C., Rheet, J., and Ghatnekar G. (2014). Cardiac to cancer: connecting connexins to clinical opportunity. *FEBS Lett*. 588; 8: 1349-1364.
- Grek, C., Rheet, J.M., Bruce, J.S., Abt, M.A., Ghatnekar, G.S., and Yeh, E.S. (2015). Targeting connexin 43 with  $\alpha$ -connexin carboxyl-terminal (ACT1) peptide enhances the activity of the targeted inhibitors, tamoxifen and lapatinib, in breast cancer: clinical implication for ACT. *BMC Cancer*, 15: 296.
- Grek, C., Tew, K. (2010). Redox metabolism and malignancy, *Curr. Opin. Pharmacol*. 4; 362-368.
- Guinamard, R., Simard, C. y Del Negro, C. (2013). Flufenamic acid as an anion channel modulator. *Pharmacol Ther*. 138 (2): 272-284.
- Guinamard, R., Simard, C., and Del Negro, C. (2013). Flufenamic Acid as an Ion Channel Modulator. *Pharmacol Ther*. 138 (2): 272-284.
- Gupta, S., Ahmad, N. and Mukhtar H. (1998). Involvement of nitric oxide during phthalocyanine (Pc4) photodynamic therapy- mediated apoptosis. *Cancer research*. 58(9):1785-1788.
- Hall, J. (2003). The New Biology: the bystander effect. *Health Physics*: 85(1): 31-35.
- Hanahan, D., and Weinberg R. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*. 100: 57-70.
- Herve, J., Bourmeyster, N., Sarrouilhe, D., Duffy, H. (2007). Gap junctional complexes: from partners to functions. *Prog. Biophys. Mol. Biol*. 94:29-65.
- Horne, T., Abrahamse, H., and Cronjé, M. (2012). Investigating the efficiency of novel metallo-phthalocyanine PDT-induced cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 9: 215-224.

- Howard, W. and Martin, P. (2002). Gap Junctions: Structure and Functions (Review). *Molecular Membrane Biology*. 19; 121-136
- Jaffe, L. (2005). A calcium based theory of carcinogenesis. *Advances in Cancer Research*. 94:231-263.
- Jahn R. and Scheller, R. (2006). SNAREs—engines for membrane fusion. *Nature Reviews on Molecular and Cell Biology*. 7: 631-643.
- Justo. N., Wilking, N., Jonsson, B., Luciani, S., and Cazap, E. (2013). A Review of Breast Cancer Care and Outcomes in Latin America. *The oncologist*. 18: 248-256.
- La Rovere, R., Roest, G., Bultynck, G., and Parys, J. (2016). Intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling and Ca<sup>2+</sup> microdomains in the control of cell survival, apoptosis and autophagy. *Cell Calcium*. 4: 1-14
- Lei, K., Tan, S., Du. W., Xu, Y., Lin, S., Zheng, Y., Zou, F., Xu, Y. and Liu J. (2015). 3B, a Novel of Photosensitizer, Exhibited Anti-tumor Effects Via Mitochondrial Apoptosis Pathway in MCF-7 Human Breast Carcinoma Cells. *Tumor Biol*. 36:5597-5606.
- Levenson, A. and Jordan, C. (1997). MCF-7: The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line. *Cancer research*. 57; 3071-3078.
- Levenson, A. and Jordan, C. (1997). MCF-7: The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line. *Cancer research*. 57; 3071-3078.
- Li, B., Chu, L., Meihua, G., and Li, W. (2010). Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycoyanin. *Acta Biochim Biophys*, 42 (1), 80-89.
- Li, S., Huang, S., and Peng, S. (2005). Overexpression of G protein-coupled receptors in cancer cells: involvement in tumor progression. *Int. J. Oncol*. 27:5, 1329-1339.
- Loewenstein, W., and Kanno, Y. (1966). Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. *Nature*. 209(5029): 1248-1249.
- Loewenstein, W., and Kanno, Y. (1967). Intercellular communication and tissue growth.I. Cancerous growth. *J. Cell Biol*. 33(2): 225-234.

- Marchi, S. y Pinton, P. (2016). Alterations of calcium homeostasis in cancer cells. *Current opinion in pharmacology*; 29:1-6.
- Marín, A., Martín, M., Liñán, O., Alvarenga, f., López, M., Fernández, L., Büchser, D., Cerezo, L. (2015). Bystander effects and radiotherapy. *Reports of practical oncology and radiotherapy*. 20: 12-21.
- Mfouo-Tynga, I., and Abrahamse, H. (2013). The Primary subcellular localization of Zinc Phthalocyanine and its Cellular Impact on Viability, Proliferation and Structure of Breast Cancer Cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 120; 171-176.
- Mfouo-Tynga, I., and Abrahamse, H. (2015). Cell Death Pathways and Phthalocyanine as an Efficient Agent for Photodynamic Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.*; 16:10228-10241.
- Monteith, G., Prevarskaya, N. y Roberts-Thomson, S. (2017). The calcium-calcium signaling nexus. *Nature Reviews Cancer*. 17: 367–380
- Mroz, P., Hashmi, J., Huang, Y., Lange, N., and Hamblin, M. (2011). Stimulation of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. *Expert Rev Clin Immunol.*; 7(1):75-91.
- Nagasawa, H., Little, J. (1992). Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of  $\alpha$ - particles. *Cancer Res*. 52: 6394-6396.
- National Cancer Institute. ¿Qué es el cáncer? Consultado en <https://www.cancer.gov>
- Nielsen, M., Axelsen, L., Sorgen, P., Verma, V., Delmar, M. y Holstein-Rathlou, N. (2012). Gap junctions. *Compr Physiol*. (2): 3
- Nugent, S., Mothersill, C., Seymour, C., McClean, B., Lyng, F., Murphy, J. (2007). Increased mitochondrial mass in cells with functionally compromised mitochondria after exposure to both direct  $\gamma$  radiation and bystander factors. *Radiat. Res*. 168: 134-142.
- Nugoli, M., Chuchana, P., Vendrell, J., Orsetti, B., Ursule, L., Nguyen, C., Birnbaum, D., Douzery, E., Cohen, P. and Theillet, C. (2003). Genetic variability in MCF-7 sublines: evidence of rapid genomic and RNA expression profile modifications. *BMC Cancer*. 12: 1-12.

- Nunes, S., Sguilla, F., and Tedesco, A. (2004). Photophysical Studies of Zinc Phtalocianine and Chloroaluminum Phtalocianine Incorporated into Liposomes in the Presence of Additives. *Braz J Medical Bio Res.* 37(2): 273-284.
- O'Connor, A., Gallagher, W. and Byrne, A. (2009). Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 85: 1053–1074.
- Organización mundial de la salud. (2018). Cáncer, datos y cifras. Consultado en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Organización mundial de la salud. (2015). Cáncer. Consultado el 8 de mayo de 2016 de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Organización mundial de la salud. (2015). Cáncer. Consultado el 8 de mayo de 2016 de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Pan American Health Organization. PAHO. (2014). Epidemiology of Colorectal Cancer in the Americas, Consultado en: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=rdmore&cid=3673&Itemid=40735&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=3673&Itemid=40735&lang=en)
- Parkash, J. and Asotra, K. (2010). Calcium wave signaling in cancer cells. *Life Sci.* November 20; 87: 587-595.
- Penning, L., Ben-Hur, R., Dubbelman, T., Havelaar, A., Van der Zee J., and Van Steveninck J. (1992). A Role for the Transient Increase of Cytoplasmic Free Calcium in Cell Rescue after Photodynamic Therapy. *Biochimica et Biophysica acta*, 1107; 255-260.
- Prise, K., Belyakov, V., Folkard, M., Michael, B. (1998). Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam. *Int. J. Radiat. Biol.* 74:793-798.
- Prise, K., O'Sullivan, J. (2009). Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 9(5): 351-360.
- Rackauskas, M., Neverauskas, V., and Skeberdis, V. (2010). Diversity and properties of connexin gap junction channels. *Medicina (Kaunas)* 46:1
- Rasola, A. and Bernardi, P. (2011). Mitochondrial permeability transition in Ca<sup>2+</sup>-dependent apoptosis and necrosis. *Cell calcium.* 50(3):222-233.



- Reeves, K., Reed, M. and Brown, N. (2009). Is nitric oxide important in photodynamic therapy? *Photoch Photobio B.* 95(3):141-147.
- Rey O., Young S., Jacamo R., Moyer M., Rozengurt E. (2010). Extracellular calcium sensing receptor stimulation in human colonic epithelial cells induces intracellular calcium oscillations and proliferation inhibition. *Journal of Cell Physiology.* 225: 73-83.
- Rollakanti, K., Anand, S., and Maytin, E. (2015). Vitamin D enhances the Efficacy of Photodynamic Therapy in a Murine Model of Breast Cancer. *Cancer medicine* 4 (5):633-642.
- Rossello, R., Wang, Z., Kizana, E., Krebsbach, P., Kohn, D. (2009). Connexin 43 as a signaling platform for increasing the volume and spatial distribution of regenerated tissue. *Proceedings of National Academy of Sciences USA.* 106:13219–13224.
- Ruggerio E., Alonso de Castro S., Habtemariam A. and Salassa L. (2015). The photochemistry of transition metal complexes and its application in biology and medicine. Chapter of Luminescent and Photoactivated Transition Metal Complexes as Biomolecular Probes and Cellular Reagents. Springer-International Publishing Switzerland, 165; 69-108.
- Saneesh, P., Manu, P., Jayaram, T., Tapas, P., Nair, R., Surendran, A., Aneesh, K., Jisha, S., Ramaiah, D., Nair, S. and Radhakrishna, M. (2017). Bis(3,5-diiodo-2,4,6-trihydroxyphenyl) squaraine photodynamic therapy disrupts redox homeostasis and induce mitochondria-mediated apoptosis in human breast cancer cells. *Scientific Reports.* 7:42126.
- Scitable (2010). Cell Division and Cancer. *Nature Education*, 2010. Consultado en 2014: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-division-and-cancer-14046590>.
- Shishido, S., Delahaye, A., Beck, A., and Nguyen, T. (2014). The anticancer effect of PQ1 in the MMTV-PyVT mouse model. *Int. J. Cancer.* 134: 6, 1474-1483.
- Silva, L., Ferreira, J., Fontana, L., Rocha, A., Serra, A., Pineiro, M. y Canevari, R. (2016). Molecular analysis of apoptosis pathway after photodynamic therapy in breast cancer: Animal model study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 14: 152–158.

- Simons, H., Haj-Yehia, A., and Levi-Schaffer, F. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5: 415-418.
- Simstein R., Borow, M., Parker, A., Weldon, C., and Beckman, B. (2003). Apoptosis, Chemoresistance, and Breast Cancer: Insights from the MCF-7 Cell Model System. *Exp Biol Med* (Maywood). 228:995.
- Smits, T., and Moor, A. (2009). New aspects in photodynamic therapy of actinic keratosis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 96 159–169.
- Spungin, B., and Friedberg, I. (1993). Growth inhibition of breast cancer cells induced by exogenous ATP. *J Cell Physiol*. 157: 502-508.
- Stout, C., Goodenough, D. and Paul, D. (2004). Connexins: functions without junctions. *Current opinion in cell biology*. (16):507-512.
- Sudhof, T. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annual Reviews on Neurosciences*. 27: 509-547.
- Szabo T. (2008). Phosphorylation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits Ca<sup>2+</sup> release and apoptosis. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. 105:2427-2432.
- Tartier, L., Gilchrist, S., Burdak-Rothkamm, S., Folkard, M., and Prise, K. (2007). Cytoplasmic Irradiation Induces Mitochondrial-Dependent 53BP1 Protein Relocalization in Irradiated and Bystander Cells. *Cancer Res*. 67: 5872-9.
- Wang Z. (2004). Roles of K<sup>+</sup> channels in regulating tumor cell proliferation and apoptosis. *Pflugers Arch*. 448:274-286
- World Cancer Declaration Progress Report. (2016). The Union for International Cancer Control's (UICC). Consultado en: [https://www.uicc.org/sites/main/files/atoms/files/UICC\\_WorldCancerDeclaration\\_Progress\\_Report\\_2016\\_Book.pdf](https://www.uicc.org/sites/main/files/atoms/files/UICC_WorldCancerDeclaration_Progress_Report_2016_Book.pdf)
- Wu, L., Randers-Pehrson, G., Xu, A., Waldren, C., Geard, C., Yu, Z., Hei, T. (1999). Targeted cytoplasmic irradiation with  $\alpha$  particles induces mutations in mammalian cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 96:4959-4964.
- Xu. P., Chen, J., Chen, Z., Zhuo, S., Hu, P., Chen, X., and Huang, M. (2012). Receptor Targeting Phthalocyanine Photosensitizer for Improving Antitumor Photocytotoxicity. *PLoS ONE*. (7) 5.

- Xue, L., Chiu, S., and Oleinnick. (2001). Photodynamic therapy-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: a role for caspase-3 in the late steps of apoptosis but not for the critical lethal event. *Experimental Cell Research*. 263: 145–155.
- Zhou, H., Ivanov, V., Gillespie, J., Geard, C., Amundson, S., Brenner, D., Yu, Z., Lieberman, H., and Hei, T. (2005). Mechanism of radiation-induced bystander effect: role of the cyclooxygenase-2 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102 (41): 14641-6.