



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla



Instituto de Fisiología

Laboratorio de Cáncer y comunicación intercelular

Tesis

“Estudio de la señal de calcio generada por la activación de una sustancia fotosensible y su propagación en células de cáncer de próstata”

Presenta

LBM María Coral Aguilar Santos

No. De CVU CONACyT 774492

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Fisiológicas

Director de Tesis

D.C. Fabián Galindo Ramírez

No. De CVU CONACyT 104040

Octubre 2018

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el periodo de realización de este trabajo.

Agradezco a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por el apoyo autorizado a través del proyecto VIEP con clave 100401400-VIEP 2018.

Agradezco a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del programa IV. Investigación y Posgrado. Apoyar a los programas de posgrado para lograr su incorporación al Padrón Nacional de Calidad. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2017-2021.

Índice

Introducción	1
Anatomía e histología de la próstata	7
Cáncer de próstata	9
Tratamientos	10
Terapia fotodinámica	11
Señal de calcio intracelular durante la terapia fotodinámica	14
Efecto espectador y comunicación intercelular	15
Sistema de segundos mensajeros	18
Mecanismos de muerte celular	19
Justificación	21
Hipótesis	22
Objetivo general	22
Objetivos particulares	22
Metodología	23
<i>Cultivo celular</i>	23
Detección de las conexinas por técnicas de inmunofluorescencia	23
Estudio de la generación y propagación de la señal de calcio intercelular	24
<i>Detección de cambios en el nivel de Ca^{+2} intracelular generados por la terapia fotodinámica</i>	24
<i>Determinación de la participación de las conexinas en la propagación de la señal mediada por Ca^{+2} generada por la terapia fotodinámica</i>	25
Ensayo de viabilidad celular	25
Análisis estadístico	26

Resultados	27
Detección de las conexinas por la técnica de inmunofluorescencia	27
Detección de los cambios en el nivel de calcio intracelular y la participación de conexinas en la propagación de la señal de calcio.	29
Bloqueador inespecífico FFA	29
Bloqueador inespecífico 18-β-GRA	36
Bloqueador inespecífico CBX	42
Ausencia de calcio del medio extracelular	48
Evaluación de la viabilidad celular posterior a la TFD	54
Discusión	56
Conclusiones	65
Perspectivas	66
Bibliografía	68

Introducción

Se infiere que el primer registro escrito que describe una enfermedad con las características del cáncer en humanos data aproximadamente del año 3000 ANE, se trata del papiro de Edwin Smith descubierto en 1862, en este manuscrito se habla sobre un tumor abultado en la mama de pronóstico grave y sin cura. Otros documentos, como el papiro de Ebers refieren también algunos tratamientos empleados dentro de los que se encontraba la remoción de las tumoraciones y el empleo de sales y ungüentos, estos últimos utilizados habitualmente hasta el Renacimiento (Hajdu, 2011). Otras civilizaciones propusieron causas y tratamientos, sin embargo, el estudio del cáncer propiamente comienza durante el desarrollo de la cultura griega (Papac, 2011).

Para Hipócrates (460 ANE- 370 ANE) el crecimiento tumoral y la estructura neoplásica se comparaba de manera visual y táctil con un cangrejo, esta relación dio origen a los términos carcinoma y cáncer (traducción latina del griego Καρκίνος) (Sudhakar 2009). Los griegos conocieron y describieron el cáncer de piel, boca, estómago, colon y mama. Después de la conquista de Grecia por el imperio romano, Aulus Celsus (25 ANE- 50 NE) comenzó a utilizar el latín como lenguaje en la medicina y continuó con el uso de la palabra cáncer comparando la enfermedad con un cangrejo y la forma a la que se adhería a estructuras cercanas con sus tenazas. Este médico, además observó que los tumores mamarios tendían a continuarse en la axila y podían causar muerte al extenderse (Hajdu, 2011).

Para Claudio Galeno (130-210), médico cuyas teorías persistieron durante varios siglos, el cáncer era producido por un desbalance entre líquidos corporales en ese entonces considerados como esenciales; estos eran la sangre, la flema, la bilis negra y la bilis amarilla; un exceso de las últimas dos provocaba según Galeno, cáncer curable y no curable, respectivamente (Hajdu, 2004). Los tratamientos aplicados fueron poco efectivos y como ya se dijo, algunos de ellos se usaron por varios siglos; la mayoría recomendaba la administración tópica de sales, pero se sabe que la cirugía también fue una técnica utilizada contra el cáncer desde inicios de nuestra era (Hajdu, 2011).

En la actualidad término cáncer se aplica a un gran número de enfermedades cuya localización varía ampliamente, su principal característica es el crecimiento descontrolado de células anormales transformadas con la capacidad de invadir tejidos adyacentes u órganos lejanos, este último mecanismo es conocido como metástasis y es la principal causa de muerte por cáncer (Stewart & Wild, 2014). Es uno de los padecimientos de mayor incidencia en el planeta y puede originarse de casi cualquier parte del cuerpo dependiendo de factores como la herencia, medio ambiente, edad, género, localización geográfica, hábitos alimenticios entre otros.

De acuerdo con la Agencia Internacional de Investigación sobre cáncer, el tipo de cáncer con mayor incidencia en el mundo es el de pulmón, le sigue el de mama, colon y próstata (12.9%, 11.8%, 9.6% y 7.7% del total de casos respectivamente, **Figura 1**) pero existen diferencias respecto al desarrollo de cáncer en distintos sexos. En mujeres es más frecuente la incidencia de cáncer de mama con 1,671,149 casos en 2012, seguido el cáncer de colon y pulmón. En cuanto al desarrollo de cáncer en el sexo masculino el cáncer de próstata es el segundo de mayor incidencia (14.77%) sólo por debajo del de pulmón (16.75%), con la mayoría de casos registrados en países desarrollados (**Figura 2**). En 2012 se registraron 307 mil 481 muertes debidas al cáncer de próstata, colocándolo como la quinta causa de muerte en hombres a nivel mundial (Ferlay & cols., 2013).

PORCENTAJE DE CASOS DE CÁNCER A NIVEL MUNDIAL

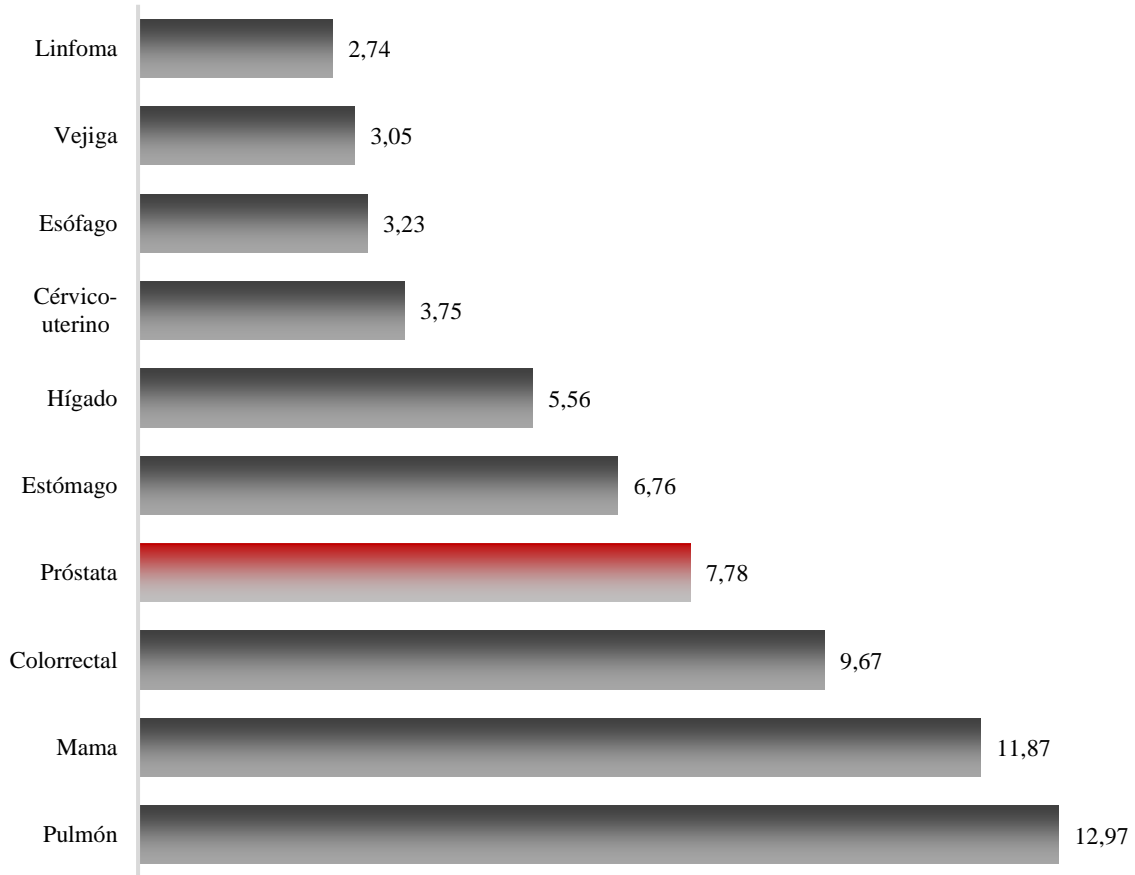


Figura 1. Porcentaje de incidencia de cáncer a nivel mundial. Los datos representan las neoplasias malignas más significativas y corresponden al 67.38% del total de casos; datos obtenidos de Ferlay & cols., 2013.

PORCENTAJE DE CASOS DE CÁNCER EN HOMBRES A NIVEL MUNDIAL

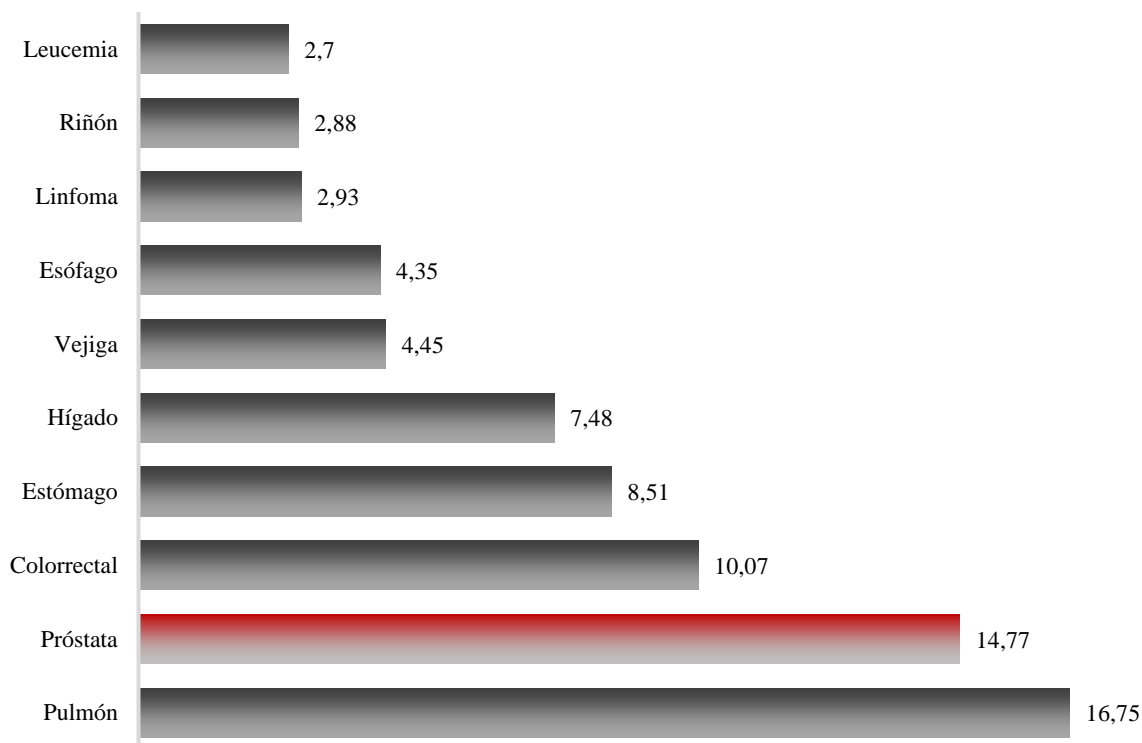


Figura 2. Porcentaje de incidencia de cáncer en hombres a nivel mundial. Los datos representan las neoplasias malignas más significativas y corresponden al 74.89% del total de casos; datos obtenidos de Ferlay & cols., 2013.

En México, siendo un país en vías de desarrollo, la incidencia de cáncer es de 27.3 por cada 100,000 habitantes hombres. De acuerdo con lo declarado por los establecimientos de salud particulares ante el INEGI, en 2016 se registraron 79,927 ingresos por neoplasias, la mayoría (6,951) por cáncer de mama, en segundo lugar 3,404 ingresos por cáncer colorrectal y en tercero 3,202 ingresados de género masculino por cáncer de próstata; del total de pacientes internados por neoplasias 1,745 concluyeron en defunciones dentro de unidades de salud particulares (**Figura 4**), principalmente por cáncer de pulmón, colorrectal, de mama, hígado, estómago, páncreas y próstata pero no se reporta la proporción entre hombres y mujeres (INEGI, 2018).

INGRESOS HOSPITALARIOS POR NEOPLASIAS EN MÉXICO

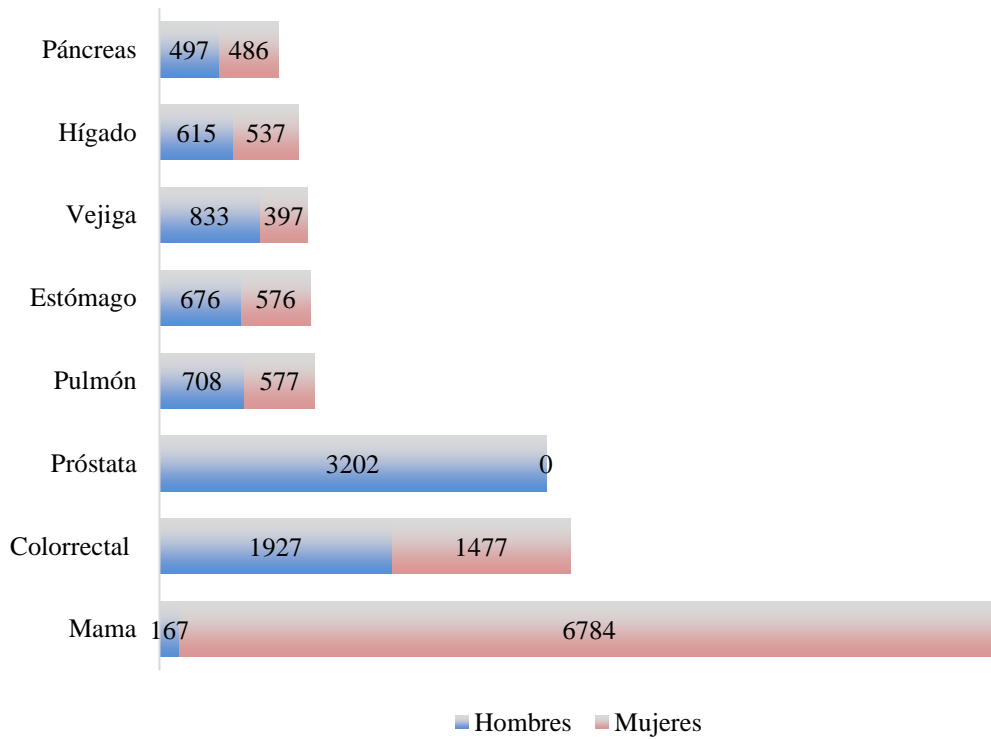


Figura 3. Ingresos hospitalarios por neoplasias en México. Los datos representan neoplasias malignas con mayor número de casos y corresponden al 24.32% del total reportado por instituciones particulares de salud; datos obtenidos de INEGI, 2018.

DEFUNCIONES INTRAHOSPITALARIAS POR NEOPLASIAS EN MÉXICO

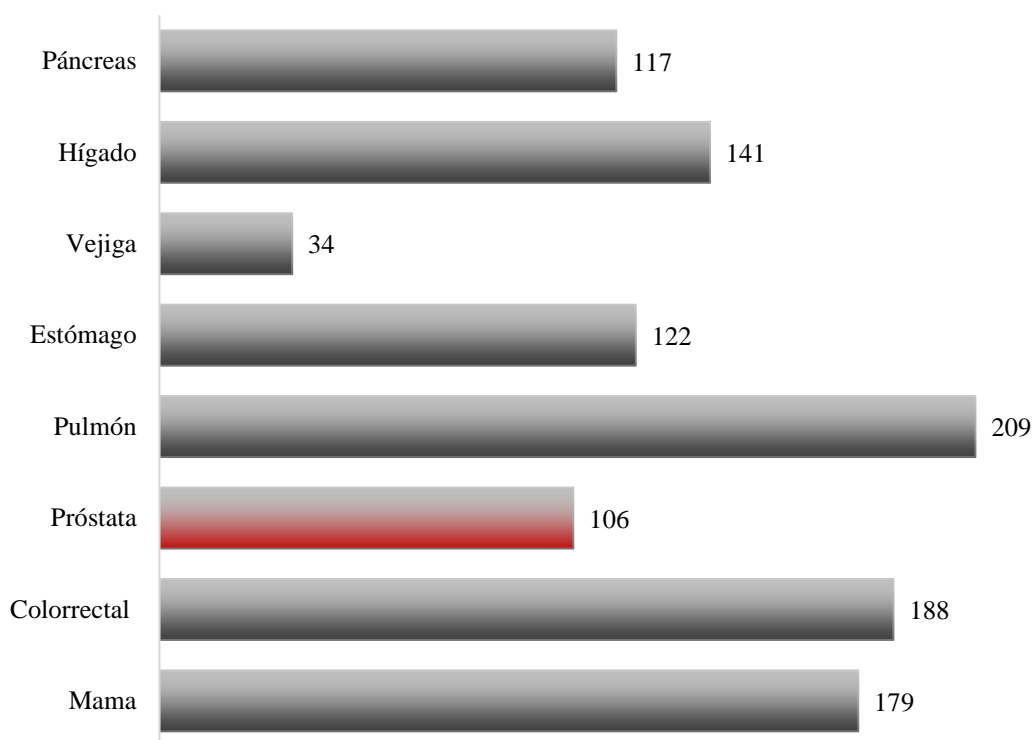


Figura 4. Defunciones intrahospitalarias por neoplasias en México. Los datos representan neoplasias malignas con mayor número de defunciones dentro de centros de salud particulares y corresponden al 62.8% del total de casos; datos obtenidos de INEGI, 2018.

Estas cifras no corresponden al total de casos de cáncer en México, sin embargo, nos permite un acercamiento a lo que sucede en la población mexicana. Se puede destacar que los tipos de cáncer con mayor morbilidad en nuestro país son el cáncer de mama y el cáncer colorrectal y corresponde a dos de los tipos de cáncer con mayor incidencia a nivel mundial. El cáncer de pulmón ocupa el cuarto lugar de morbilidad en México pero el primero de incidencia en el mundo. Por otro lado, el cáncer de próstata también ocupa los primeros lugares tanto en morbilidad hospitalaria como en incidencia en nuestro país (**Figura 3**) (INEGI, 2018).

De acuerdo con la Organización mundial de la Salud, en 2012 se reportaron 14,016 casos de cáncer de próstata y una tasa de mortalidad de 11.3 por cada 100,000 individuos colocando este tipo de cáncer como de mayor incidencia, morbilidad y tasa de mortalidad

en la población masculina de nuestro país (Ferlay & cols., 2013); y según lo reportado al INEGI, el cáncer de próstata sería la tercera causa de muerte por cáncer en instituciones de salud particulares y el tipo de cáncer con mayor morbilidad en individuos del sexo masculino.

La detección precoz de esta enfermedad favorece la tasa de supervivencia de las personas afectadas, no obstante, aún existen casos en los que la enfermedad es detectada en etapas avanzadas con pronóstico más grave; existen síntomas y signos que pueden indicar la presencia de cáncer de próstata, sin embargo, no son suficientes para establecer un diagnóstico preciso. Uno de los principales indicadores del cáncer de próstata es el antígeno prostático específico (APS), cuyos niveles séricos por arriba de 4 ng/ml pueden predecir la positividad del padecimiento (Bracarda & cols., 2005). A pesar de ello, es necesario llevar a cabo otras pruebas para realizar un diagnóstico correcto, las cuales son, principalmente, la examinación digital rectal, la ultrasonografía transrectal y la examinación de biopsias (Attard & cols., 2016). Es importante conocer la anatomía de la glándula prostática y su relación con otros órganos pues de ello depende el correcto diagnóstico, pronóstico y diseño de los tratamientos.

Anatomía e histología de la próstata

La próstata fue re-descrita anatómicamente por McNeal a partir de 1968 (McNeal, 1968) en una serie de trabajos realizados y publicados durante 25 años, durante este periodo se cambió la idea de que la próstata humana estaba constituida por lóbulos como se planteaba en un principio debido a disecciones en animales y se dividió en zonas de acuerdo a su localización y su histología (Selman, 2011); esta división se ha conservado hasta el día de hoy y es útil en la clínica y la investigación.

En el adulto sano la próstata se considera un órgano compuesto cuya estructura es similar a la forma de una castaña, se distingue un ápex en su parte inferior (distal) y una base superior o proximal; se encuentra localizada debajo de la vejiga y las vesículas seminales y justo delante del recto, además envuelve una porción de la uretra que se conoce como uretra prostática. La próstata tiene un peso entre 15 y 20 gramos y se divide anatómicamente en

cuatro regiones, tres de ellas glandulares y una no glandular que se encuentran fusionadas y encapsuladas en tejido conectivo rico en colágeno y altamente vascularizado (Fine & Reuter, 2012).

La región de mayor tamaño en la zona periférica, constituye un 60% de la masa total de la próstata y se encuentra en la parte posterior de la glándula, es aquella que se inspecciona durante la examinación digital rectal y se encuentra fuertemente relacionada con la zona o región central que constituye de un 25 a un 30% de la masa prostática, ésta se distingue por su forma cónica. Una tercera región conocida como zona transicional es mucho más pequeña (abarca un 5% de la masa total) y recorre la uretra prostática, esta región está generalmente afectada en la Hiperplasia Prostática Benigna (HPB), una neoplasia común en adultez tardía (Hammerich & cols., 2009). La masa prostática restante la ocupa la zona no glandular, que pertenece al estroma fibromuscular localizado en la superficie anterior de la glándula, esta región es rica en músculo estriado en su porción distal y participa en funciones voluntarias, mientras que en la parte proximal predomina la presencia de músculo liso con influencia en funciones involuntarias (**Figura 5**) (Fine & Reuter, 2012). Cerca del 75% de las neoplasias malignas de próstata se originan en la zona periférica, menos frecuentes son los adenocarcinomas de la zona central y de transición (Bracarda & cols., 2005).

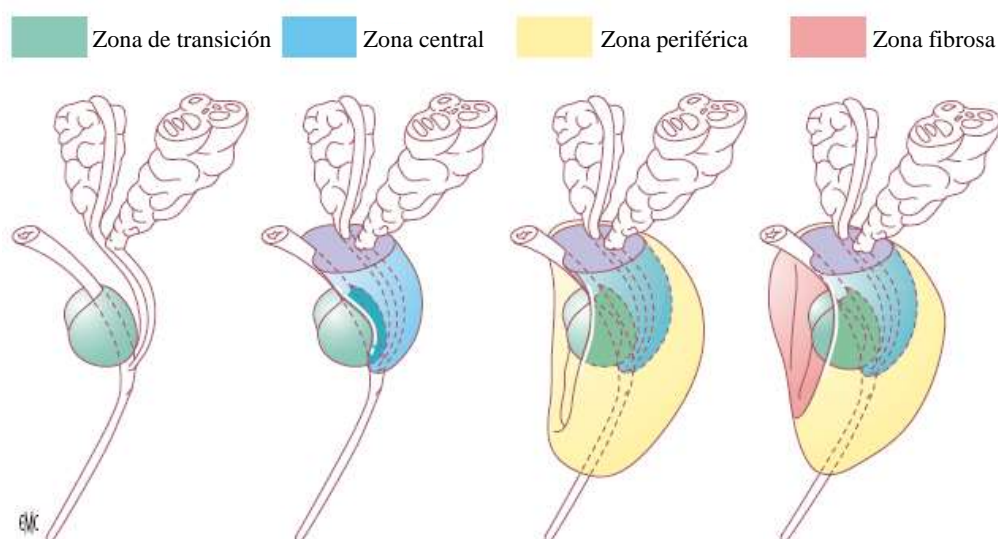


Figura 5. División zonal de la próstata según McNeal. Imagen de Bastien y cols., 2012.

Histológicamente la próstata se clasifica como una glándula tubuloalveolar compuesta, en ella se distinguen glándulas mucosas, submucosas y principales formadas por epitelio cilíndrico simple que desembocan directamente en la uretra. En los conductos se distinguen cuerpos amiláceos formados por glucoproteínas calcificadas cuya abundancia se relaciona de manera proporcional a la edad de los individuos. La próstata secreta un líquido seroso con abundantes lípidos, enzimas proteolíticas, fosfatasa ácida, fibrinolisisina y ácido cítrico que modulan la actividad de los espermatozoides (Resnick & Thompson, 2000).

La próstata recibe inervación simpática proveniente de ganglios hipogástricos periféricos y parasimpática de los nervios pélvicos hipogástricos, durante los tratamientos quirúrgicos contra el cáncer de próstata es precisa la conservación intacta de estos nervios pues también regulan la actividad de otros órganos reproductivos (Hammerich & cols., 2009).

Cáncer de próstata

Aunque se desconocen las causas que dan origen al cáncer de próstata, existen factores que influyen en su aparición. Uno de los más importantes es la edad, pues la mayoría de individuos diagnosticados con esta enfermedad son hombres mayores a 65 años, lo que indica que existe una relación directa entre la edad del individuo y la probabilidad de padecer cáncer de próstata (Bracarda & cols., 2005).

Otros aspectos importantes a considerar como factores de riesgo para la aparición de cáncer de próstata son el origen étnico y el medio ambiente, ya que se ha observado mayor prevalencia en poblaciones americanas descendientes de pueblos africanos con respecto a las que tienen orígenes asiáticos (Attard & cols., 2016) y es en esta última población donde existe la menor prevalencia de cáncer de próstata (Damber & Aus, 2008).

Distintos estudios demuestran que existe un riesgo mayor de padecimiento en individuos migrantes lo que sugiere la participación de factores ambientales (Parkin & cols., 1997). Uno de los más importantes es la dieta; el alto consumo de carnes rojas, grasas saturadas y leche que se observa en países occidentales podría estar relacionado con la elevada tasa de incidencia en esta región del mundo con respecto a regiones asiáticas donde la alimentación es rica en soya y baja en grasas (Damber & Aus, 2008).

La probabilidad también aumenta cuando existen antecedentes de cáncer de próstata en familiares de primer y segundo grado (principalmente hermanos) y se ha encontrado un gen relacionado directamente con la aparición de cáncer de próstata hereditario (HPC1) localizado en el brazo largo del cromosoma 1 (Bracarda & cols., 2005), se aclare que conforme el cáncer progresa las mutaciones de distintos genes aumentan y existe la pérdida casi total de la diferenciación celular (Abate-Shen & Shen, 2000).

La progresión del cáncer de próstata se evalúa a través de la observación de muestras de tejido tumoral y la obtención de un valor en la escala de Gleason. Esta escala consta de cinco niveles de diferenciación glandular donde el nivel 1 corresponde a glándulas bien formadas y diferenciadas de tamaño uniforme y el nivel 5 a tejido difuso con células de tamaños variados y muy pocas glándulas visibles, infiltración, pérdida de la lámina basal y necrosis; el valor total de Gleason se obtiene sumando los valores de los dos niveles más identificados en la muestra. Otra forma de pronóstico es la evaluación TNM (siglas de Tumor, Nodo, Metástasis) que consiste en evaluar en los individuos la presencia de: Tumores sólidos, Nodos linfáticos regionales afectados y Metástasis (Hammerich & cols., 2009; Bracarda & cols., 2005).

Tratamientos

Una vez diagnosticado el cáncer de próstata y la etapa en que se encuentra se establece un pronóstico que ayudará a seleccionar el tratamiento adecuado en cada caso, dependiendo el grado de malignidad y la extensión de la enfermedad, así como el estado y las condiciones de cada individuo afectado. Los tratamientos pueden ser con fines curativos o paliativos (Damber & Aus, 2008).

Dentro de los tratamientos con objetivo curativo el de mayor elección para el cáncer de próstata localizado es la prostatectomía radical que consiste en la resección total de la próstata junto con las vesículas seminales y los nodos linfáticos cercanos. Las mayores desventajas que ofrece este procedimiento son la incontinencia urinaria y la disfunción eréctil, sin embargo, existe la recuperación total de los pacientes a un año de la cirugía siempre y cuando se siga una buena técnica quirúrgica (Bracarda & cols., 2005; Attard &

cols., 2016; Damber & Aus, 2008). Existen además otras alternativas terapéuticas: la radioterapia, la braquiterapia y la terapia hormonal.

Estos tratamientos pueden ser combinados mostrando en el caso de la terapia hormonal junto con radioterapia una mayor eficacia evitando la reincidencia. No obstante, estos tratamientos poseen la desventaja de efectos adversos como hemorragias espontáneas y toxicidad rectal y/o vesical (Bracarda & cols., 2005). Debido a estos inconvenientes se ha tratado de establecer otra modalidad de tratamiento efectivo contra el cáncer de próstata.

Terapia fotodinámica

En 1993 se aprobó el uso de la terapia fotodinámica (TFD) en individuos con cáncer de pulmón, esófago, estómago y aparato genitourinario en varios países de la Unión Europea y América del norte (Sanabria & cols., 2013). El objetivo de este tipo de terapia es la inducción de la muerte celular en tumores sólidos y lesiones premalignas a través de la producción de agentes citotóxicos (Liu & Wang, 2015); para esto utiliza tres elementos: fotosensibilizadores no tóxicos administrados por vía sistémica, estimulación luminosa en el rango del espectro visible capaz de excitar al fotosensibilizador (con longitud de onda específica) y oxígeno molecular principalmente proporcionado por la vasculatura del tejido irradiado (Mroz & cols., 2011).

Los fotosensibilizadores (FS) tienen uso en la industria ambiental, química y médica. En la clínica las porfirinas fueron los primeros fotosensibilizadores utilizados y son derivados de pigmentos naturales (Fresnadillo, 2005). En la actualidad los FS más representativos son derivados de las porfirinas y las ftalocianinas las cuales pueden ser orgánicas o sintéticas. Ambos fármacos comparten una estructura tetrapirrol en cuyo centro se unen átomos metálicos, esta estructura está basada en la de la protoporfirina, componente de la hemoglobina (Castano & cols., 2004).

Debido a su naturaleza química se deben considerar algunos aspectos importantes en la selección de los FS en los tratamientos. Es sabido que estos fármacos poseen selectividad ligera a alta por el tejido tumoral, esto permite que la eficacia del estímulo luminoso sea mayor y se optimicen las dosis terapéuticas. La mayoría de los FS son transportados por

lipoproteínas de baja densidad (LDL) hacia los tejidos, pero además se conoce afinidad por algunas estructuras subcelulares i.e. la mayoría de las porfirinas se encuentran en liposomas y las ftalocianinas tienden a localizarse principalmente en la mitocondria pues son altamente hidrofóbicas (Allison & Sibata, 2010).

La longitud de onda a la que un FS es excitado también es importante, pues de ello dependerá la profundidad de penetración en el tejido tratado durante la terapia; se ha establecido que a mayor valor de longitud de onda mayor profundidad de penetración, por lo que está recomendado que los FS respondan a longitudes de onda entre 600 y 800nm. El rango de estimulación de porfirinas y ftalocianinas está entre 630 y 690 nm lo que los vuelve a buenas opciones en la clínica (Agostinis & cols., 2011), algunas porfirinas como Photofrin y ftalocianinas como Photosens son utilizadas en la medicina y la veterinaria actualmente (Allison & Sibata, 2010; Macdonald & Dougherty, 2001).

Otro aspecto importante es el tiempo de absorción del fármaco y la duración de la sensibilidad cutánea a la luz como consecuencia de la administración sistémica del FS, en el caso de algunas ftalocianinas los individuos son tratados una hora o dos después de la administración sistémica y su eliminación total tarda cerca de una semana, sin embargo, la fotosensibilidad se puede mantener de uno a ocho días; esto representa una ventaja respecto a las porfirinas pues estas necesitan ser incubadas durante 24 a 48 horas y permanecen en el organismo hasta por tres meses (Sharman & cols., 1999).

Una vez seleccionada y administrada, la sustancia fotosensibilizadora o fotosensibilizador se distribuye, posteriormente el sitio de interés es fotoestimulado y absorbe la energía de los fotones emitidos por la fuente luz, el FS modifica su configuración electrónica al estado excitado triplete pasando por el intermediario estado singlete y de esta manera puede llevar a cabo dos tipos de reacciones para producir especies reactivas de oxígeno (Sharman & cols., 1999).

En la reacción tipo I se lleva a cabo la transferencia de electrones del FS excitado a distintos sustratos biológicos, esto tiene como consecuencia la formación de radicales capaces de reaccionar con oxígeno molecular para que finalmente se constituyan especies

reactivas de oxígeno (ROS) citotóxicas entre ellas el oxígeno singlete, radical superóxido, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno (Postiglione & cols., 2016).

En la reacción tipo II el FS interactúa directamente con oxígeno molecular para formar oxígeno singlete de alta reactividad pero de vida media muy corta (Sharman & cols., 1999).

Los niveles elevados de ROS y oxígeno singlete crean un ambiente de estrés agudo en la célula que puede llevar a las células a responder de distintas maneras dentro de las cuales se incluye la activación de cascadas apoptóticas, aunque se han reportado otras vías de señalización (**Figura 6**) (Görlach & cols., 2015).

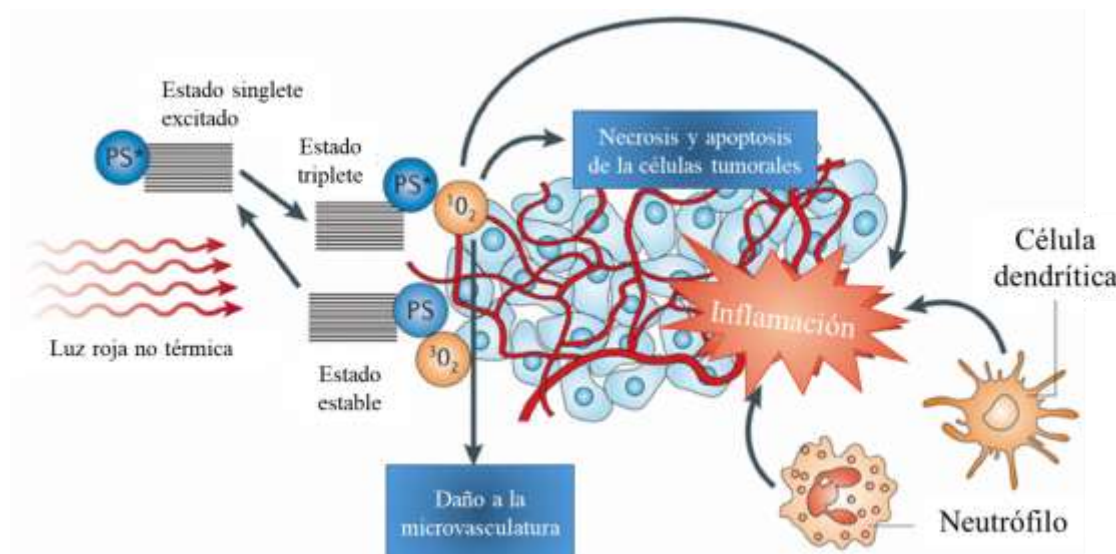


Figura 6. Mecanismo de acción durante la terapia fotodinámica. El FS absorbe la luz que permite modificar su estado energético. A partir de un sistema de entrecruzamiento se generan el estado singlete excitado y el estado triplete. Como se describe en el texto a través de dos reacciones es producido oxígeno singlete y especies reactivas de oxígeno que pueden matar directamente a las células tumorales por necrosis o apoptosis, destruir la vasculatura y producir una respuesta inflamatoria. Tomado y modificado de Castano y cols., 2006.

La eficacia de la TFD no sólo depende del tipo de FS; de hecho, hay varios factores muy importantes que deben ser tomados en cuenta en el diseño del tratamiento; estos son la sensibilidad relativa del tejido a la terapia, la presión parcial de oxígeno en el tejido y de manera muy importante la dosis de luz administrada; a grandes rasgos esta dosis está

determinada por la potencia y el tiempo del estímulo luminoso que dan como resultado tasas de fluencia específicas. El tipo de recurso luminoso y la utilización de difusores de luz para una mejor distribución del tratamiento en la neoplasia es una consideración igual de importante (Mroz & cols., 2011).

Señal de calcio intracelular durante la terapia fotodinámica

Varios artículos han reportado aumento en los niveles de calcio (Ca^{2+}) intracelular durante la TFD en diversas líneas celulares, el uso de ese modelo de experimentación permite mediciones puntuales y da las facilidades para un mejor diseño experimental al poder manipular mejor las variables involucradas.

Ben-Hur y colaboradores en 1991 estudiaron los cambios en las concentraciones de Ca^{2+} en células CHO (del inglés Chinese Hamster Ovary) después de la aplicación de TFD con el FS Aluminio-Cloro-Ftalocianina (AICIPc), ellos observaron un incremento máximo de la concentración de Ca^{2+} (de $\sim 300\text{nM}$ basales a $\sim 1100\text{ nM}$) después de 5 minutos de fotoestimulación a 150 Watts con una fluencia final de $200\text{W}/\text{m}^2$. Además, proponen que esta señal favorece el inicio de la citotoxicidad durante la fotoestimulación al evaluar la supervivencia celular. En 1993, Agarwal y su equipo estudiaron la generación de apoptosis en células de linfoma de ratón de la línea L5178Y posterior a la TFD con AICIPc con estímulos luminosos de 500W, ellos observaron que los niveles máximos de Ca^{2+} intracelular se alcanzaban de 40-60 segundos de iniciada la fotoestimulación y esta elevación correspondía con un aumento en los niveles relativos de Inositol-tri-fosfato (IP_3), también proponen la consecuente activación de la Fosfolipasa A_2 (PLA_2) como un mecanismo generador de apoptosis.

En 1998 se estudió la TFD en una línea células de carcinoma escamoso humano (HSC-2) con el FS Photofrin (derivado de porfirina), se registraron aumentos en los niveles de Ca^{2+} intracelular 30 minutos, una y dos horas después de la fotoestimulación; se detectó fragmentación del ADN por análisis electroforético, lo que corrobora la efectividad del tratamiento para disminuir la viabilidad celular y favorece la teoría de que el Ca^{2+} intracelular favorece la muerte tumoral a través de su liberación de los almacenes

intracelulares y la consecuente activación de factores de transcripción y vías apoptóticas (Tajiri & cols., 1998).

En cuanto al estudio de estos procesos en cáncer de próstata, se ha caracterizado parcialmente el aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular en respuesta a distintos tratamientos, pero no durante la TFD. Por ejemplo, en células de la línea de cáncer de próstata PC-3, Chang y colaboradores observaron un aumento del Ca^{2+} intracelular después del tratamiento con resveratrol (compuesto de origen natural propuesto como tratamiento contra el cáncer) de 1 a $10\mu\text{M}$ dependiente de la dosis, posteriormente evaluaron el efecto del ion en la proliferación celular post-tratamiento, al remover el Ca^{2+} intracelular la viabilidad celular disminuyó, de esta manera concluyeron que el Ca^{2+} podría estar favoreciendo la supervivencia celular en lugar de activar vías apoptóticas (Chang & cols., 2013). Con los mismos propósitos se han probado otros posibles compuestos, como Celecoxib (Wang & cols., 2012), Timol (Yeh & cols., 2017) o di-indol-metano (Tsai & cols., 2012) con observaciones similares en la misma línea celular. Debido a esto la línea PC-3 es un buen modelo para estudiar los cambios intracelulares de Ca^{2+} durante la TFD.

Aunque los daños a las células tumorales se han explicado como consecuencia a una importante producción de radicales libres y ROS (Postiglione & cols., 2016), otros mecanismos menos estudiados pueden ser un facilitador terapéutico.

Efecto espectador y comunicación intercelular

Existen investigaciones donde se muestra que durante la TFD y otros tipos de radioterapias se produce daño en células que no son expuestas directamente a la radiación, este proceso ha sido denominado “efecto espectador”. Shao y colaboradores demostraron que al transferir el medio de células irradiadas T98G glioblastoma humano a fibroblastos humanos (AG01522) estos aumentaban sus niveles de Ca^{2+} intracelular de un 70-90% de sus niveles basales, también observaron que óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno facilitan la respuesta de células espectadoras (Shao & cols., 2006).

Un interesante reporte de Calì y colaboradores, demuestra la activación de la señal de Ca^{2+} en células de carcinoma de ratón (C26GM) no irradiadas por TFD y un aumento en los

niveles de óxido nítrico. Esta respuesta fue dependiente de la distancia entre las células estimuladas y las células cercanas, alcanzando un radio de hasta 80 μm , una observación importante fue que la aplicación de un bloqueador de uniones comunicantes y hemicanales disminuyó drásticamente el efecto espectador y por lo tanto el porcentaje de células apoptóticas. El reporte concluye que existe una participación primordial de la proteína conexina 43 en la propagación del daño celular (Calì & cols., 2015).

Las uniones comunicantes y hemicanales son estructuras en la membrana celular a través de las cuales es posible el paso de una amplia variedad de moléculas que participan en la señalización y comunicación intercelular y que permiten el intercambio de sustancias entre el medio intra y extracelular. Estas estructuras están compuestas por una clase de proteína llamada conexina (Cx) presente en vertebrados e invertebrados y capaz de formar ensamblajes funcionales de dos tipos que permiten el intercambio de información entre las células y su medio ambiente. Cada Cx está conformada por cuatro segmentos transmembrana con sus dos extremos terminales y un asa localizada en el citosol y dos asas extracelulares. La asociación de seis conexinas en la membrana celular origina hemicanales o conexones los cuales participan en el intercambio de algunas moléculas entre la célula y su medio externo.

La unión de dos hemicanales entre células adyacentes forma uniones comunicantes o de hendidura (gap junction) y permite el paso de moléculas de una célula a otra (**Figura 7**). Aunque está ampliamente aceptado que estas moléculas deben tener una masa menor a 1.2 kDa (como segundos mensajeros) las propiedades de permeabilidad y señalización de estos ensamblajes están definidas por el tipo de Cx que los conforma (Zhou & Jiang, 2014). Se conoce que Cx43 muestra una selectividad de 100 a 300 veces mayor por nucleótidos que Cx32 y es también permeable a especies reactivas de oxígeno. Además, existen varios tipos de Cx cuyos ensamblajes son selectivos a inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) siendo la más importante Cx32, seguida de Cx43 y Cx26 (Weber & cols., 2004).

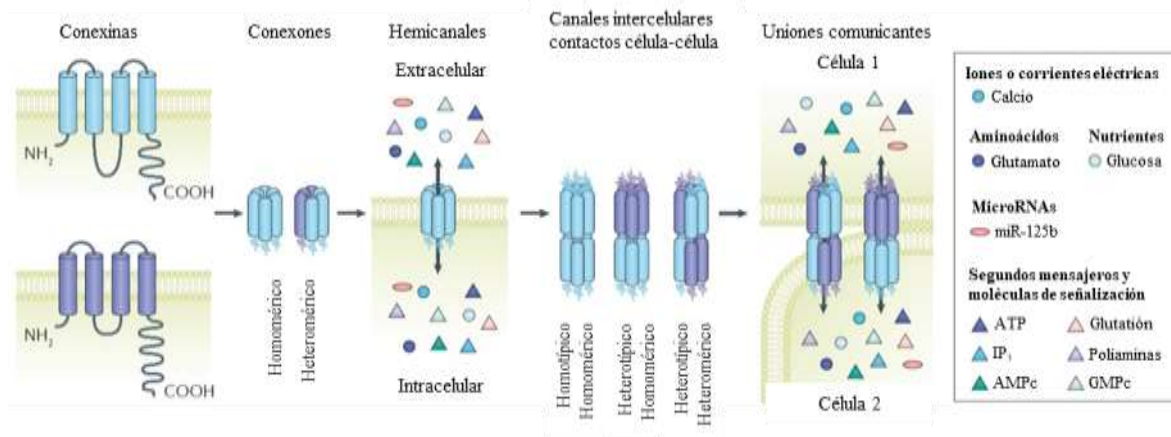


Figura 7. Ensamble de las conexinas en hemicanales y uniones comunicantes. Cada conexina consiste en cuatro segmentos transmembrana, la unión de cuatro conexinas forma un hemicanal homomérico o heteromérico que a su vez puede unirse a hemicanales de células adyacentes para formar uniones homotípicas y heterotípicas que permiten el paso de distintas moléculas. Tomado y modificado de Aasen & cols., 2016.

En cuanto a su regulación, tanto hemicanales como uniones comunicantes modifican sus propiedades de permeabilidad por diversos factores, uno de los más interesantes es la relación y asociación de distintas Cxs para acoplarse y formar poros funcionales; con base en secuencias homólogas en las diferentes Cxs, se han clasificado tres grupos principales (alfa, beta y un tercer grupo que incluye a las Cx gamma, delta y épsilon, **tabla 1**), de acuerdo con esta separación existen restricciones en cuanto a la capacidad de las Cx para asociarse entre sí. Así, es posible encontrar de manera natural uniones comunicantes y hemicanales homoméricos, es decir, que están constituidos completamente de un sólo tipo de Cx, la forma más abundante de uniones comunicantes consiste en dos hemicanales homoméricos pero cada uno compuesto de una Cx diferente (unión heterotípica) (Koval & cols., 2014).

Grupo	Conexina
Grupo 1 Alfa	Cx40, Cx46, Cx50, Cx62, Cx59, Cx37, Cx43.
Grupo 2 Beta	Cx25, Cx30.3, Cx31.1, Cx31, Cx26, Cx30, Cx32
Grupo 3	Gamma: Cx45, Cx47, Cx31.3; Delta: Cx36, Cx31.9, Cx40.1; Épsilon: Cx23.

Tabla 1. Clasificación de las conexinas. De acuerdo con la homología en la secuencias de varias Cxs se han clasificado tres grupos principales. Las Cxs de cada grupo pueden formar hemicanales heteroméricos. Datos de Koval & cols., 2014.

Se ha estudiado la presencia de las Cxs en líneas tumorales de diferentes estadios, hasta hace algunos años se pensaba que la baja expresión de Cxs estaba directamente relacionada con procesos de invasión y metástasis, pues las Cxs están presentes en el tejido sano permitiendo la adherencia, facilitando la organización celular y participando en la transferencia de moléculas de señalización, sin embargo, se ha demostrado su presencia aún en estadios tardíos y líneas celulares metastásicas (Czyż & cols., 2012), su función, aunque no muy clara el día de hoy, parece residir en la comunicación intercelular que median estas proteínas y su participación en el proceso de extravasación.

En distintas líneas celulares de cáncer de próstata se ha reportado la expresión de Cx43; Zhang y colaboradores en 2015 realizan un análisis de varias Cxs con líneas celulares que representan distintas etapas de cáncer de próstata, relacionan a la Cx43 con estadios avanzados y mecanismos de extravasación e invasión pues se encuentra en altas concentraciones en células PC-3 (clasificada con un alto grado de malignidad). Tate y colaboradores en 2006 reportan la expresión de Cx26 en células PC-3 y plantean que esta Cx se relaciona de manera directa con el potencial metastásico tumoral (Tate & cols., 2006; Mehta & cols., 1999). Otros tipos de Cx localizados en cáncer de próstata son la Cx45 y Cx32, sin embargo, su función hasta el día de hoy no se ha esclarecido (Aasen, 2015; Czyż & cols., 2012).

Sistema de segundos mensajeros

El IP₃ es una molécula que actúa como segundo mensajero y es generada a partir del fosfatidilinositol 4,5-difosfato a través de la reacción catalizada por la fosfolipasa C (PLC) que lo separa en IP₃ soluble y Diacil-glicerol (DAG) anclado a la membrana; clásicamente la PLC es activada por la fracción alfa de la proteína G_q (Karp & Patton, 2008). Una vez producido, el IP₃ puede unirse a receptores específicos presentes en la membrana del retículo endoplásmico y aparato de Golgi conocidos como IP₃R.

Los IP₃R son receptores tetraméricos con una masa de aproximadamente 1200 kDa. El extremo C-terminal de cada subunidad forma seis dominios transmembrana con el quinto y el sexto constituyendo el poro de un canal permeable a Ca⁺², mientras que el extremo N-

terminal se encuentra del lado citosólico y contiene el sitio de unión para el IP₃ y otras moléculas reguladoras, existen tres isoformas de este receptor (IP₃R1, IP₃R2 e IP₃R3) codificadas por diferentes genes (Bultynck & cols., 2003). La unión de IP₃ a su sitio en el IP₃R provoca un cambio conformacional que promueve la apertura del canal (Hanson & cols., 2004). Se sugiere que la activación de estos receptores es responsable de la generación de ondas de Ca⁺² intracelular y su propagación entre grupos celulares que provocan la activación de cascadas de señalización específicas (Leybaert & Sanderson, 2012).

La actividad de IP₃ termina cuando éste es metabolizado mediante dos vías; la primera es una serie de desfosforilaciones mediadas por fosfatasas específicas para obtener inositol libre o mio-inositol pasando por distintos intermediarios y la segunda vía permite la formación de otros inositol polifosfatos a través de la fosforilación de IP₃ a inositol 1,3,4,5 tetrakisfosfato por la 3-cinasa, esta molécula es precursora de otros mensajeros y participa en el reciclaje del IP₃. Se ha propuesto que durante la TFD la señal de Ca⁺² podría propagarse a través de la vía del IP₃, debido a que existe comunicación intercelular mediada por hemicanales y uniones comunicantes que permiten el paso de esta molécula; estas estructuras también son permeables a ATP y ROS, moléculas que junto con Ca⁺² son capaces de activar enzimas como la PLC y la PLA2 para producir IP₃ y expandir la señal de Ca⁺² (Berridge, 1987).

Mecanismos de muerte celular

Debido a la presencia de las estructuras y moléculas previamente descritas en líneas celulares de cáncer de próstata se propone que durante la TFD la generación de muerte celular es facilitada por incrementos en las concentraciones de Ca⁺² intracelular [Ca⁺²]_i mediadas por la activación de los receptores acoplados a proteína G_q y el incremento de IP₃.

Dentro de las vías de muerte celular se encuentra la apoptosis o muerte celular programada; existen dos vías que provocan apoptosis, una se da por factores externos (vía extrínseca) y la otra por estimulación interna (vía intrínseca) ambas incluyen la activación de caspasas.

Sin embargo, estas vías comparten elementos que llevan a cabo el objetivo final (Karp & Patton, 2008).

Como se mencionó antes, algunos FS se unen principalmente a membranas externas así como a las de organelos intracelulares, se ha propuesto que la aplicación de TFD activa varios mecanismos: el FS incrustado en las membranas produce daño de manera inicial provocando la pérdida de la integridad membranal y permitiendo la salida de mensajeros importantes, i.e. la mitocondria puede liberar citocromo c, procaspasas y ATP para producir muerte celular, mientras que en el retículo endoplásmico se facilita la fuga de Ca^{2+} lo que influye también en el estado de la membrana mitocondrial y favorecer la apertura del PTPm (poro de transición de permeabilidad mitocondrial) (La Rovere & cols., 2016; Castano y cols., 2005).

Además, la producción de ROS y radicales libres producidos mediante la TFD también son capaces de provocar la liberación de citocromo c, SMAC/DIABLO y/o Bcl-2; el aumento de calcio intracelular y su unión a proteínas moduladoras como calmodulina favorece el ensamble de Bcl-2 con la membrana mitocondrial y su unión con Bax para producir apoptosis debido a la generación de estrés celular (Hanson & cols., 2004).

Estas cascadas de señalización podrían transmitirse a través de conexiones y uniones comunicantes las cuales permiten el paso de mensajeros como el IP_3 , Ca^{+2} , nucleótidos y ROS desencadenando apoptosis en una red celular tumoral.

Justificación

El cáncer de próstata provoca la mayor incidencia de cáncer y tasa de mortalidad en la población masculina mexicana, debido a esto el desarrollo de procedimientos que reduzcan el número de efectos secundarios y permitan un tratamiento localizado y poco invasivo adquiere importancia en investigación.

Diversos componentes de las células tumorales tienen la capacidad de regular el crecimiento, diferenciación, proliferación e invasión y pueden ser blancos potenciales para el desarrollo de alternativas terapéuticas. Tanto la modulación de la homeostasis de Ca^{+2} intracelular como la comunicación intercelular impactan de manera importante en el control de la supervivencia, la muerte, la capacidad invasiva y el poder metastásico de las células. Estos procesos pueden ser aprovechados para desarrollar tratamientos que combatan eficazmente el cáncer.

La TFD es un recurso emergente para el tratamiento de cáncer y otras lesiones. En 2015 en México se aprobó el uso de TFD contra el cáncer de próstata en etapas tempranas de neoplasias localizadas (Secretaría de Salud, 2015). Se ha observado que este procedimiento induce a la muerte celular, sin embargo, no existen reportes sobre los mecanismos moleculares que se llevan a cabo en cáncer de próstata y se desconoce si existe participación de Cxs que propaguen las sustancias producidas en la TFD u otras señales como Ca^{+2} e IP_3 .

El empleo de técnicas de biología molecular, microscopía y fototerapia en cultivos celulares hace posible el estudio de estos mecanismos, ayuda a la comprensión de las vías de señalización en la muerte celular y permite perfeccionar la metodología de los tratamientos contra el cáncer.

Hipótesis

La propagación de la señal de Ca^{2+} generada por la fotoestimulación se ve favorecida por la presencia de conexinas localizadas en las células tumorales PC-3. Esta condición puede modificar la viabilidad celular.

Objetivo general

Estudiar la señal de Ca^{+2} generada por la activación de un FS y los mecanismos que participan en su propagación intercelular.

Objetivos particulares

- 1) Corroborar la presencia de las Cxs reportadas en la línea celular PC-3 mediante técnicas de inmunofluorescencia.
- 2) Detectar el cambio en el nivel de Ca^{2+} intracelular como consecuencia de la fotoestimulación.
- 3) Bloquear farmacológicamente las Cxs y evaluar los efectos de la fotoestimulación en esta nueva condición (viabilidad celular, nivel de Ca^{2+} y su propagación).
- 4) Evaluar los efectos de la fotoestimulación sobre la viabilidad celular.

Metodología

Cultivo celular

Para realizar este proyecto se utilizó la línea celular PC-3 (ATCC), línea tumoral derivada de cáncer de próstata. Las células fueron mantenidas en un medio MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos 1X en frascos de 25cm². Las células se mantuvieron en una incubadora a 37 °C con 5 % de CO₂.

Para la realización de los ensayos se corroboró que las células presentaran una confluencia del 70 al 80% en vidrios circulares de 12mm de diámetro. Cuando las células estuvieron listas, se incubaron con el FS AICIPc (20 μM) y posteriormente fueron colocadas en la cámara de registro con solución extracelular donde se fotoestimularon durante 60 segundos en una potencia promedio de 3.45 mW/cm² que resultó en una tasa de fluencia de 0.0135 J/cm² (Veenhuizen & Stewart, 2015), finalmente se observaron los cambios generados y se procedió al análisis.

La solución extracelular empleada para realizar estas pruebas tuvo la siguiente composición (mM): NaCl, 144; KCl, 5.4; MgCl₂, 1; CaCl₂, 2.5; ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), 5; D-glucosa, 5.6 (pH ajustado a 7.4 con NaOH) (Laniado & cols., 2001).

Detección de las conexinas por técnicas de inmunofluorescencia

Para corroborar la participación de la Cxs en la propagación de la señal de Ca²⁺ intercelular es necesario demostrar su presencia y localización en la línea celular de estudio. Mediante la técnica de inmunofluorescencia se pudo visualizar la expresión y localización de las Cx43 y Cx26, dos tipos de conexinas que se han reportado en la línea celular PC-3 y que podrían participar en la propagación de la señal intercelular de Ca²⁺. Para esto se llevó a cabo el siguiente procedimiento.

Una vez que las células se encontraban a una confluencia de 70-80% se procedió con el protocolo para detección de Cxs por inmunofluorescencia.

- 1) Las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 5 minutos a una temperatura de -8°C .
- 2) Se permeabilizaron las células y saturaron los sitios de unión inespecífica con tritón al 0.1% disuelto en BSA al 2% por una hora.
- 3) Se incubaron por la noche a 4°C con el anticuerpo primario (uno específico para Cx26 y otro para Cx43) en una dilución 1:200 con BSA al 1%.
- 4) La mañana siguiente las células se incubaron a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario por dos horas diluido 1:400.
- 5) Se realizó el marcaje de los filamentos de actina con faloidina incubada a 4°C por una hora.
- 6) Se montó la muestra en medio de montaje con DAPI para marcar los núcleos celulares.
- 7) Finalmente se observaron en microscopio confocal Nikon C2 invertido.

NOTA: Entre cada uno de estos pasos se realizaron 3 a 4 lavados de 5 minutos con DPBS.

Estudio de la generación y propagación de la señal de calcio intercelular

Detección de cambios en el nivel de Ca^{+2} intracelular generados por la terapia fotodinámica

Se realizó el análisis fluorométrico en células tumorales las cuales fueron marcadas con una sonda para Ca^{+2} , el Fluo-4FF AM (Invitrogen). Las células se incubaron con el AM éster de Fluo-4FF $10\mu\text{M}$, el cuál es permeable a través de la membrana celular. La incubación con la sonda se realizó a 37°C durante 45 minutos y excitación del fluoróforo se efectuó con un haz de luz cuya longitud de onda fue de 488 nm. Para medir la propagación de la onda de Ca^{+2} generada por la fotoactivación se empleó el microscopio invertido Nikon C2. La secuencia de imágenes fue adquirida empleando el software NIS-elements (Nikon, Japón).

Determinación de la participación de las conexinas en la propagación de la señal mediada por Ca^{+2} generada por la terapia fotodinámica

En este caso, se evaluó la señal de Ca^{+2} en condiciones control y en presencia de bloqueadores de gap junctions y hemicanales, carbenoxolona (CBX 100 μ M), el ácido flufenámico (FFA 100 μ M) y ácido 18- β -glicirretínico (18- β -GRA 100 μ M).

El análisis de estos experimentos se realizó con el programa ImageJ, que permite examinar las regiones de interés (ROI) y mide la intensidad de fluorescencia. Los valores serán mostrados como $\Delta f/f_0$, donde f_0 representa la fluorescencia basal durante los primeros 10 segundos de registro.

Para su análisis primero se midió la distancia que hay entre la célula estimulada y las adyacentes a ésta, se obtuvo el área bajo la curva de respuesta, el valor máximo de intensidad de fluorescencia y el momento del registro donde se observó el valor máximo.

Ensayo de viabilidad celular

Para determinar si hay cambios en la viabilidad celular después de la TFD tanto en condiciones normales como en presencia de bloqueadores de estructuras formadas por Cxs se utilizó el ensayo de Anexina V, el kit comercial permite la detección de células necróticas y apoptóticas.

La Anexina V se une a fosfatidilserina del lado extracelular una vez iniciada la apoptosis, ya que en condiciones normales este fosfolípido de membrana se encuentra del lado intracelular. Por otro lado, el yoduro de propidio es capaz de unirse a ácidos nucleicos expuestos en procesos de necrosis celular. Estos cambios fueron monitoreados mediante un microscopio confocal Nikon C2-invertido, mediante la emisión de señales específicas para anexina V y yoduro de propidio. La siguiente tabla muestra la clasificación del estado celular de acuerdo a la señal emitida en el ensayo.

<i>Estado celular</i>	<i>Anexina V</i>	<i>Yoduro de propidio</i>
<i>Ningún proceso de muerte</i>	Negativo	Negativo
<i>Apoptosis</i>	Positivo	Negativo
<i>Necrosis</i>	Positivo	Positivo

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en este trabajo no se distribuyen de manera normal, por lo que para realizar el análisis estadístico y evaluar si hubo diferencias estadísticamente significativas entre cada par de grupos se utilizó una prueba *U de Mann-Whitney* que compara los valores de las medianas y para comparar más de dos grupos se realizó un *análisis de varianza de rangos Kruskal-Wallis* seguidos de la prueba *U*. Para la descripción de los resultados como cambios porcentuales entre grupos se utilizaron los valores del promedio y el error estándar.

De acuerdo con esto, los gráficos presentados en la sección de resultados muestran los datos de cada grupo, su promedio y error estándar, acompañados de la simbología correspondiente en aquellos casos donde hubo diferencias estadísticamente significativas.

Resultados

Detección de las conexinas por la técnica de inmunofluorescencia

Se determinó cualitativamente la presencia y localización de la Cx43 y la Cx26 a través de la técnica de inmunofluorescencia indirecta. La **Figura 8** y la **Figura 9** muestran el marcaje para cada tipo de Cx en la línea celular PC-3; en rojo se muestran los filamentos de actina y en azul los núcleos, mientras que ambas Cxs se encuentran marcadas en verde. Cx43 y Cx26 fueron identificadas en la línea celular PC-3; la Cx43 se identificó principalmente en el citoplasma y membrana celular como se observa en la **Figura 8**, algunos puntos más intensos pueden identificarse en los bordes de la membrana. Un descubrimiento importante fue la localización subcelular de la Cx26 y su escasa presencia en la membrana (**Figura 9**); este aspecto que se discute posteriormente.

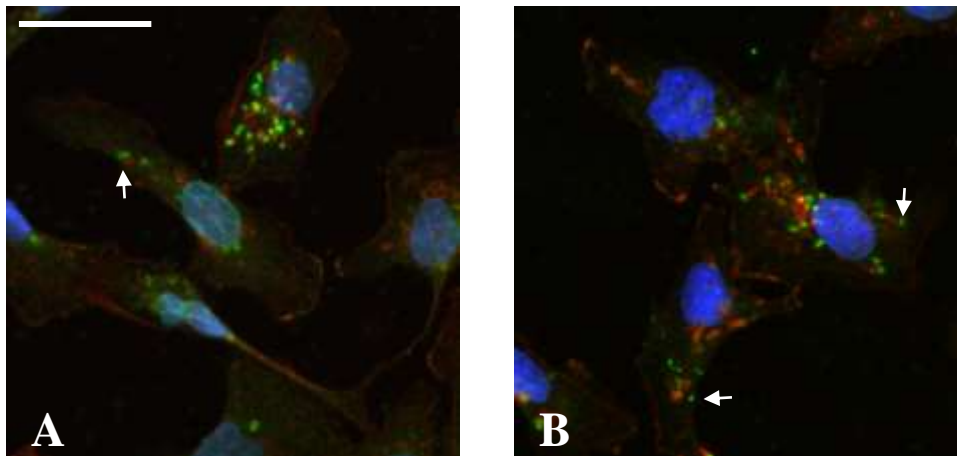


Figura 8. Localización de la Cx43 en células PC-3. Dos imágenes representativas de la línea celular PC-3 en las que se observa marcaje en verde para Cx43; los filamentos de actina se observan marcados en rojo con faloidina y los núcleos en azul marcados con DAPI. La localización de Cx43 es principalmente citosólica y membranal las flechas indican la presencia de la Cx en la membrana celular. Barra de escala, 30 μ m.

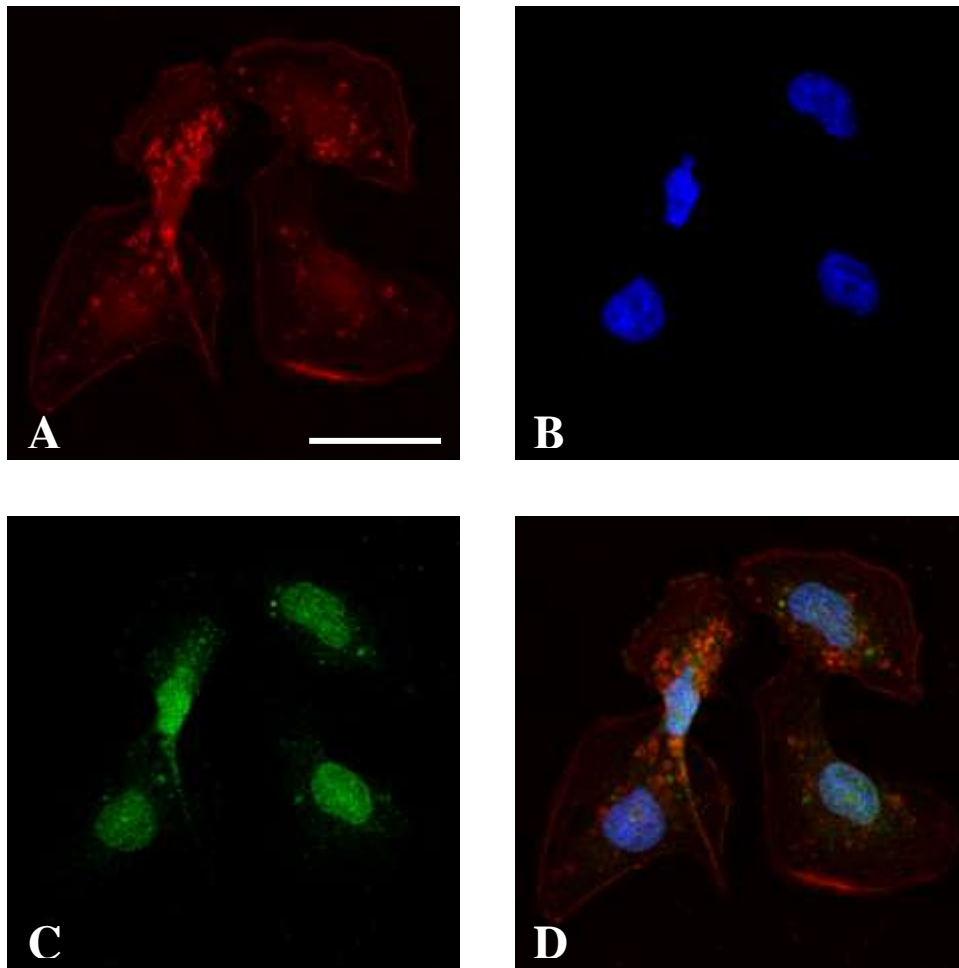


Figura 9. Localización de la Cx26 en células PC-3. A. Se observan los filamentos de actina en rojo marcados con faloidina. B. Imagen que demuestra la localización de los núcleos en azul marcados con DAPI. C. Identificación de la Cx26 en verde, la cual se puede observar en los mismos sitios donde se encuentra el núcleo y en la región periférica de éste. D. Superposición de A, B y C donde el marcador en azul y verde queda superpuesto casi completamente. Barra de escala, 30 μm .

Detección de los cambios en el nivel de calcio intracelular y la participación de conexinas en la propagación de la señal de calcio.

Como se mencionó en la metodología, se realizó el análisis fluorométrico para detectar cambios en el nivel intracelular de Ca^{2+} en condiciones control y con la administración de inhibidores inespecíficos de uniones comunicantes y hemicanales. En esta sección se muestran los registros en imágenes para cada condición: antes, durante y posterior a la fotoestimulación, junto con el análisis de fluorescencia representado por gráficos de $\Delta f/f_0$ vs Tiempo (s) de cada una de las células (en ROIs) señalando la distancia entre la célula estimulada y la adyacente; para cada sección también se muestra el total de células evaluadas en cada caso, clasificadas por rangos de distancia con su respectivo promedio y error estándar. Estos datos se utilizaron en la prueba estadística para comparar entre grupos control y grupos tratados con inhibidores.

Bloqueador inespecífico FFA

Los registros mostrados en la **Figura 10** (control) y **Figura 11** (administración de FFA) indican que las células tratadas con FFA presentan una tendencia al decremento en la señal de Ca^{2+} generada. Un análisis más profundo permitió corroborar este comportamiento para validar que existen cambios causados por el bloqueo de hemicanales, uniones comunicantes o ambas. Se realizaron comparaciones entre rangos de distancia que van desde $0\mu\text{m}$ hasta $19.53\mu\text{m}$ (**Figura 12-14**); de acuerdo con el número total de células evaluadas ($n=83$), se tomaron tres intervalos de distancia y se comparó de cada uno el grupo control y grupo tratado. Como se menciona en los métodos se evaluó el área bajo la curva, el valor máximo de intensidad de fluorescencia y el momento en el tiempo donde se registraba este valor máximo.

Control

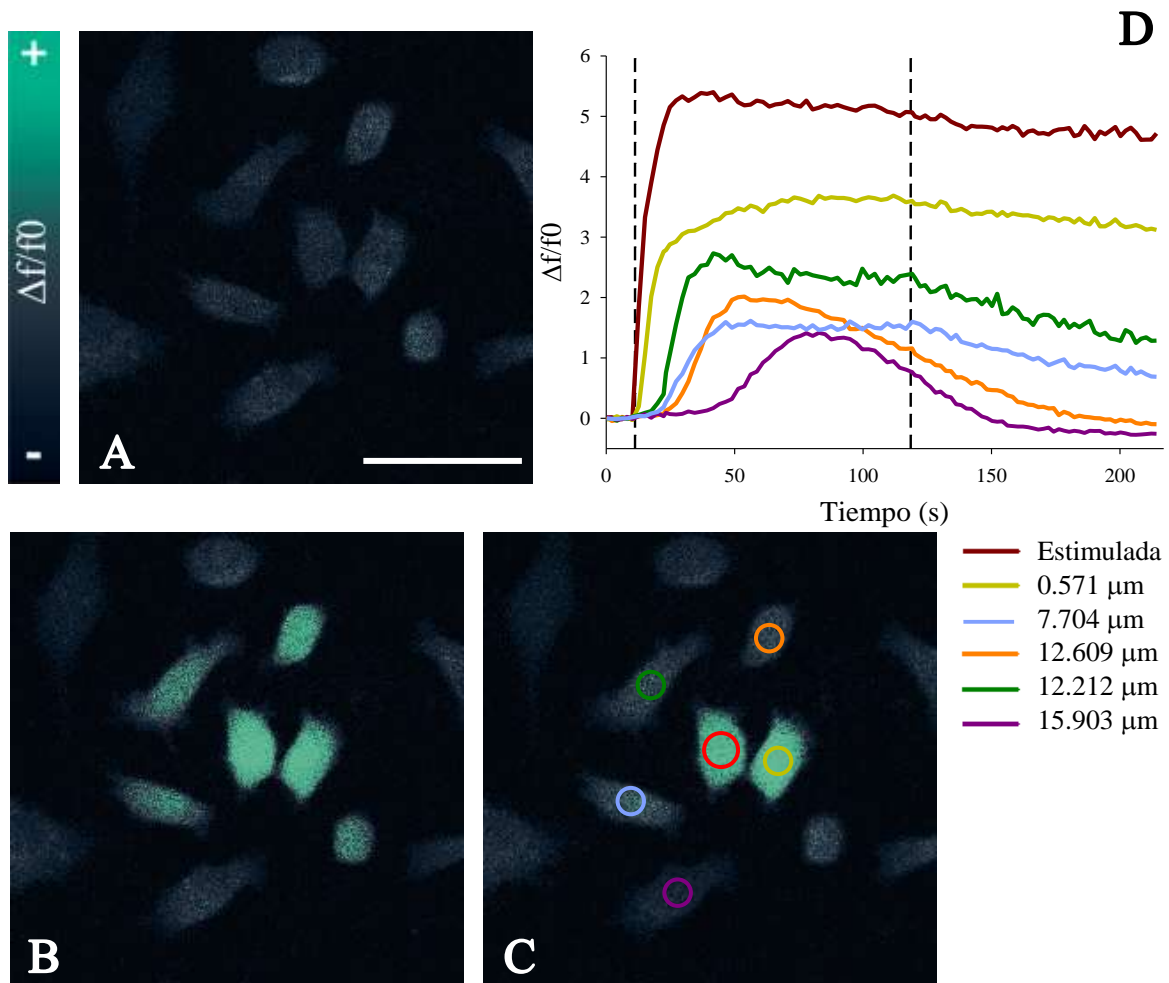


Figura 10. Representación de un registro control de fotoestimulación en células de la línea tumoral PC-3. Se observan tres capturas que representan el protocolo de fotoestimulación (**A**, **B**, **C**), en **A** se muestran las células previo al estímulo luminoso corresponde al periodo f_0 , **B** representa las células durante el tiempo de fotoestimulación (60 segundos) y puede verse desde los primeros segundos un aumento en la intensidad de fluorescencia que se mantiene en las células más cercanas pero que decae en distancias más largas. **C** representa los últimos segundos del registro, en esta imagen está señalada por medio de un círculo rojo la única célula que fue directamente fotoestimulada y las demás células en colores correspondientes al gráfico **D**. **D** representa los cambios en $\Delta f/f_0$ vs Tiempo (s) para cada célula analizada por ROIs, considerando la distancia intercelular, las líneas punteadas representan el inicio y el fin de la fotoestimulación. Barra de escala, 50 μm .

FFA 100 μ M 30 minutos

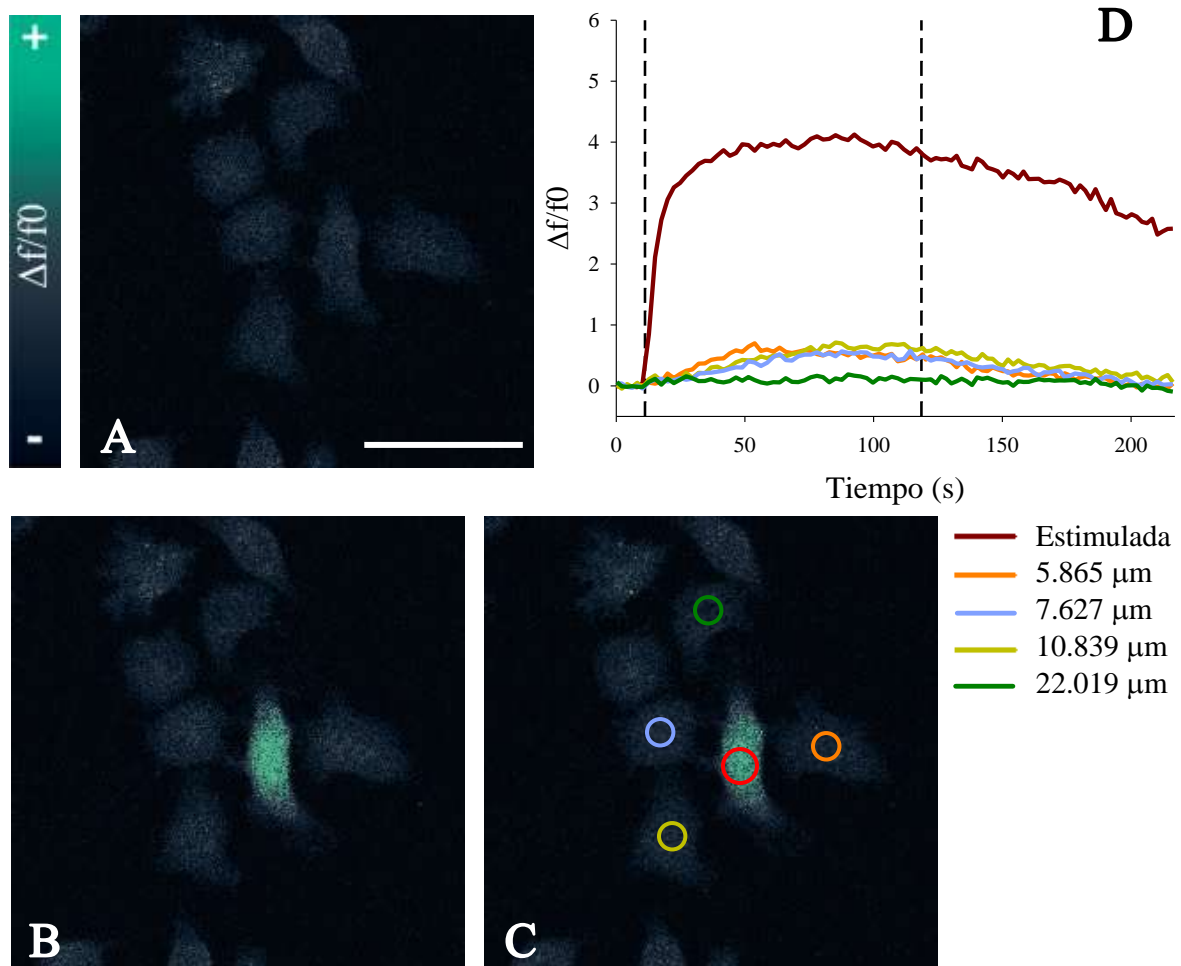


Figura 11. Representación de un registro de fotoestimulación en células de la línea tumoral PC-3 con la administración de FFA. Las células fueron tratadas con FFA 100 μ M durante treinta minutos. Se observan tres capturas que representan el protocolo de fotoestimulación (A, B, C), en A se muestran las células previo al estímulo luminoso y corresponde al periodo f_0 , B representa las células durante el periodo de fotoestimulación por 60 segundos, en este caso se observa un decaimiento de la intensidad de fluorescencia respecto al registro control en varios rangos de distancia. C representa los últimos segundos del registro, en esta imagen está señalada por medio de un círculo rojo la única célula que fue directamente fotoestimulada y las demás células en colores correspondientes al gráfico D. D representa los cambios en $\Delta f/f_0$ vs Tiempo (s) para cada célula analizada por ROIs, considerando la distancia intercelular, las líneas punteadas representan el inicio y el fin de la fotoestimulación. Barra de escala, 50 μ m.

Posterior a la realización de los experimentos se hizo el análisis de ROI para evaluar estadísticamente las diferencias entre los grupos control y los tratados con FFA; para esta condición se analizaron un total de 83 células. Tanto en el área bajo la curva (**Figura 12**) como en el valor máximo de intensidad de fluorescencia (**Figura 13**) se puede observar que existe cierta dependencia de la distancia en cualquiera de los parámetros, de esta manera se establecería que un mayor rango de distancia entre la célula irradiada y la adyacente representa un decaimiento mayor en cualquiera de las dos categorías antes mencionadas, mientras que a distancias menores la respuesta será mayor tanto en el valor de área bajo la curva como de valor máximo de $\Delta f/f_0$. Esta suposición fue corroborada tras realizar un análisis de regresión donde el grupo tratado y el grupo control presentaron una pendiente de valor negativo (resultados no mostrados).

De acuerdo con la **Figura 12** no existen cambios significativos entre los grupos control y tratado con FFA a distancias menores a 10 μm , no obstante, en este valor se pueden observar diferencias entre ambos grupos ($p < 0.001$), donde existe una reducción del 82% en el grupo tratado con FFA respecto al promedio del área bajo la curva. Esto permite suponer que la propagación de la señal de Ca^{2+} tiene una mayor dependencia por hemicanales a partir de este rango de distancia y lo mismo es concluido de la **Figura 13** donde la reducción es del 78.7% de las células tratadas con FFA respecto al control en el valor máximo de intensidad de fluorescencia para células que están alejadas por más de 10 μm de la célula irradiada ($p = 0.001$).

Para el caso del tiempo donde se registró el valor máximo de intensidad de fluorescencia no se demostró ninguna relación con la distancia, por lo que no fue necesario tomar en cuenta dicha variable para el análisis estadístico (**Figura 14**). Al evaluar el tiempo del valor máximo $\Delta f/f_0$, los cambios resultaron estadísticamente significativos ($p = 0.006$) y de acuerdo a los datos se comprueba que en aquellas células tratadas con FFA el tiempo en alcanzar el valor máximo es más prolongado que en el caso de las células sin ningún tratamiento con bloqueadores; en las células control se registró un tiempo promedio de 97.37 ± 6.975 s mientras que en el tratado con FFA el tiempo promedio fue 129.278 ± 6.85 s. Sin embargo, considerando que sólo hay diferencias significativas de otras variables en rangos de distancia mayores a 10 μm se puede afirmar que las células más cercanas a

aquella que es fotoestimulada tratadas con FFA logran alcanzar los mismos valores que las células control pero lo logran en tiempos más prolongados.

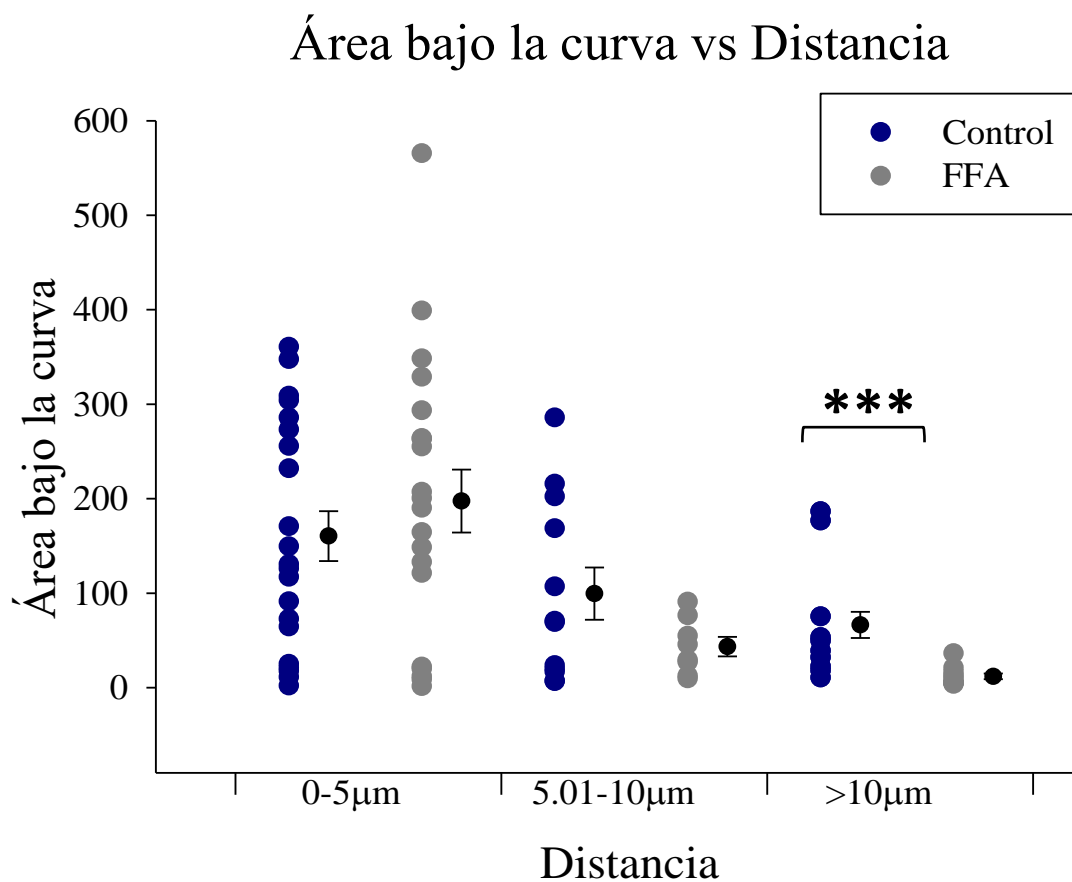


Figura 12. Gráfica del área bajo la curva contra la distancia para las células tratadas con FFA. La gráfica representa el área bajo la curva de cada célula registrada y el rango de distancia en el que se clasificó, cada célula está representada por puntos en azul y gris que representan el grupo control y tratado respectivamente. A la derecha de estos se encuentran en negro los puntos representativos del promedio y el error estándar. Se realizó una prueba U de Mann-Whitney para cada par de grupos. “*” p<0.05, “**”p<0.01, “***”p<0.001, n=83.

Valor máximo $\Delta f/f_0$ vs Distancia

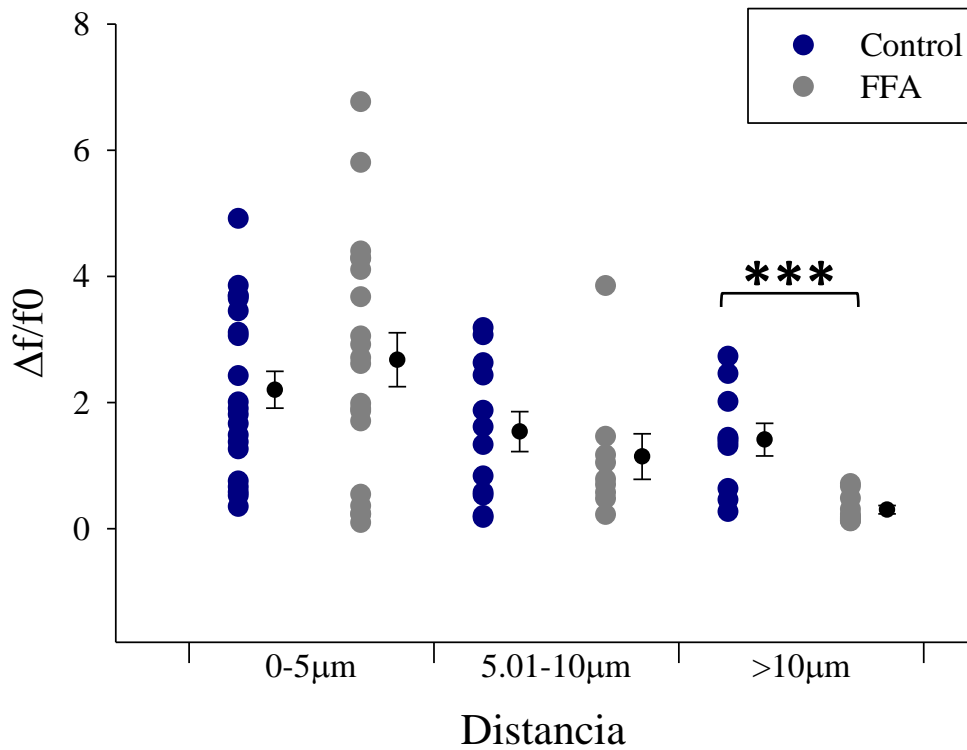


Figura 13. Gráfica del valor máximo de intensidad de fluorescencia contra la distancia para las células tratadas con FFA. La gráfica representa el valor máximo de la relación $\Delta f/f_0$ de cada célula registrada y su respectivo rango de distancia, cada célula está representada por puntos en azul y gris que representan el grupo control y tratado respectivamente. A la derecha de estos se encuentran en negro los puntos representativos del promedio y el error estándar. Se realizó una prueba U de Mann-Whitney para cada par de grupos. “*” $p < 0.05$, “***” $p < 0.01$, “****” $p < 0.001$, $n = 83$.

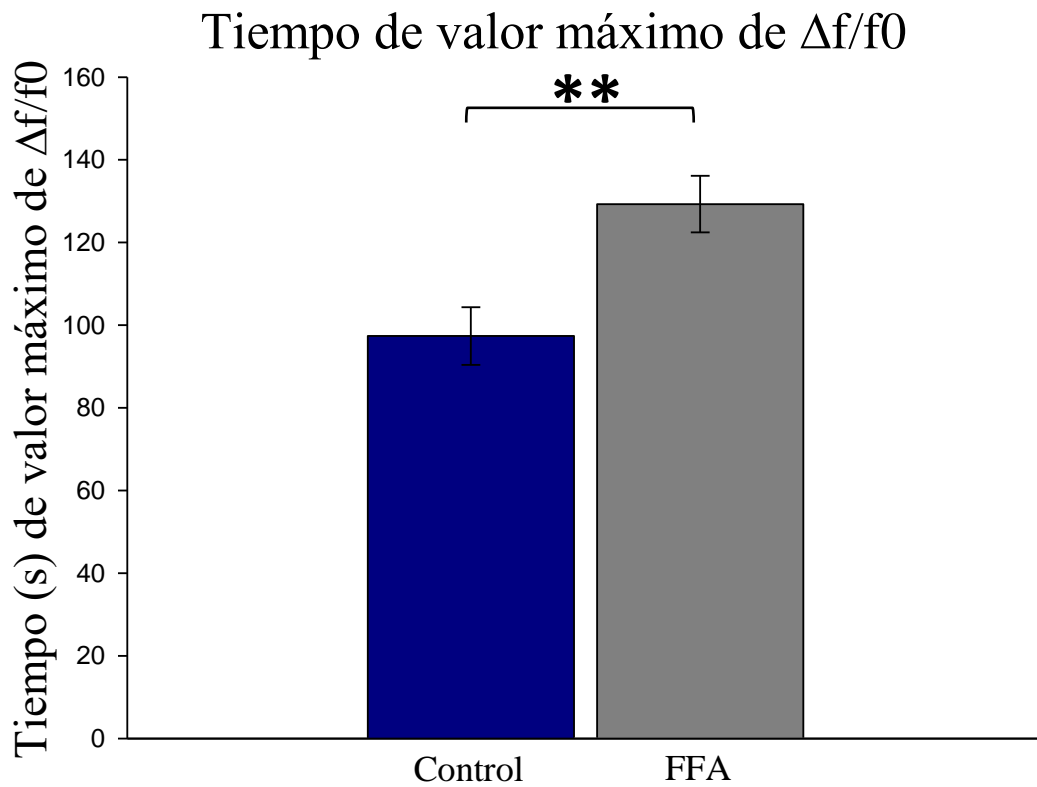


Figura 14. Gráfica del tiempo (s) del valor máximo de intensidad de fluorescencia para las células tratadas con FFA. La gráfica representa el momento del registro donde se ubica el valor máximo de la relación $\Delta f/f_0$ de cada célula registrada, cada grupo está representado por barras que simbolizan el promedio y el error estándar. Se realizó una prueba U de Mann-Whitney para cada par de grupos. “*” $p < 0.05$, “**” $p < 0.01$, “***” $p < 0.001$, $n = 83$.

Bloqueador inespecífico 18-β-GRA

Al evaluar el efecto del 18-β-GRA sobre la propagación de la señal de Ca^{2+} durante los registros, se visualizó el decremento de la señal dependiente de la distancia; los cambios en la intensidad debido a la administración de fármaco se corroboraron posteriormente en el análisis estadístico. Las distancias estudiadas en esta sección se encontraron entre 0 y 12.769 μm y el número total de células analizadas fue de 53. La **Figura 15** representa un registro control y se acompaña del registro donde las células fueron tratadas con 18-β-GRA 100 μM (**Figura 16**).

En contraste con lo observado para el tratamiento con FFA, al evaluar el área bajo la curva hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y tratado, pero en este caso a distancias entre 0 y 5 μm ($p=0.042$) (**Figura 17**), donde el grupo tratado durante 30 minutos con 18-β-GRA mostró una reducción del 39% con respecto al valor promedio del grupo control. Este contraste respecto a lo descrito para FFA se discute más adelante.

Por otro lado, al comparar el valor máximo entre los grupos control y tratado para dos rangos de distancia ambos intervalos resultaron con diferencias significativas (**Figura 18**); para el intervalo de 0 a 5 μm se observó una reducción del 38.5% de grupo tratado con 18-β-GRA respecto al control ($p=0.017$), mientras que en el intervalo cuya distancia es mayor a 5 μm la reducción fue de 59.27% en el grupo tratado ($p=0.025$). De acuerdo con lo observado en la **Figura 18**, este bloqueador inespecífico reduce el valor máximo de $\Delta f/f_0$, sin embargo, de acuerdo con los resultados del área bajo la curva esta reducción no provoca cambios en la respuesta total de las células en rangos de distancia mayores a 5 μm .

Para el caso del tiempo donde se registra el valor máximo de intensidad no hubo diferencias significativas, este comportamiento de los datos puede observarse en la **Figura 19**.

Control

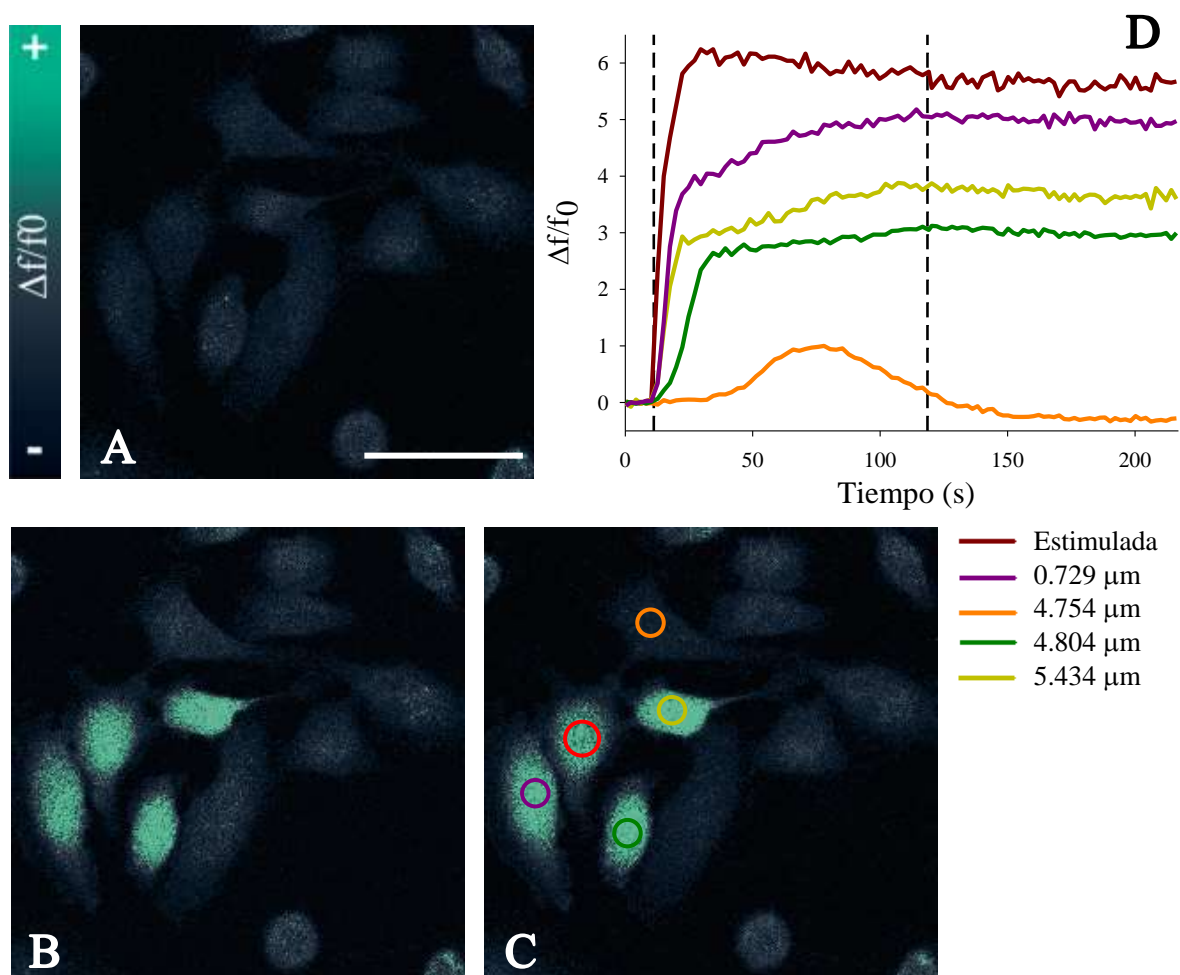


Figura 15. Representación de un registro control de fotoestimulación en células de la línea tumoral PC-3 antes de la aplicación del bloqueador inespecífico 18- β -GRA. Se observan tres capturas que representan el protocolo de fotoestimulación (A, B, C), en A se muestran las células previo al estímulo luminoso y corresponde al periodo f_0 de 10 segundos, B representa las células durante la fotoestimulación, en este caso, al igual que en otros controles se evidencia desde los primeros segundos de estimulación un aumento en la intensidad de fluorescencia mantenido hasta después de la fotoestimulación, sólo la señal de una célula con distancia de 4.754 μm de la célula estimulada decae, C representa los últimos segundos del registro, en esta imagen está señalada por medio de un círculo rojo la única célula que fue directamente fotoestimulada y las ROIs que corresponden cada célula en el gráfico D. D representa los trazos correspondientes a los cambios en la intensidad de fluorescencia de cada célula a través del análisis de ROIs, considerando la distancia intercelular; las líneas punteadas representan el inicio y el fin de la fotoestimulación. Barra de escala, 50 μm .

18-β-GRA 100 μM 30 minutos

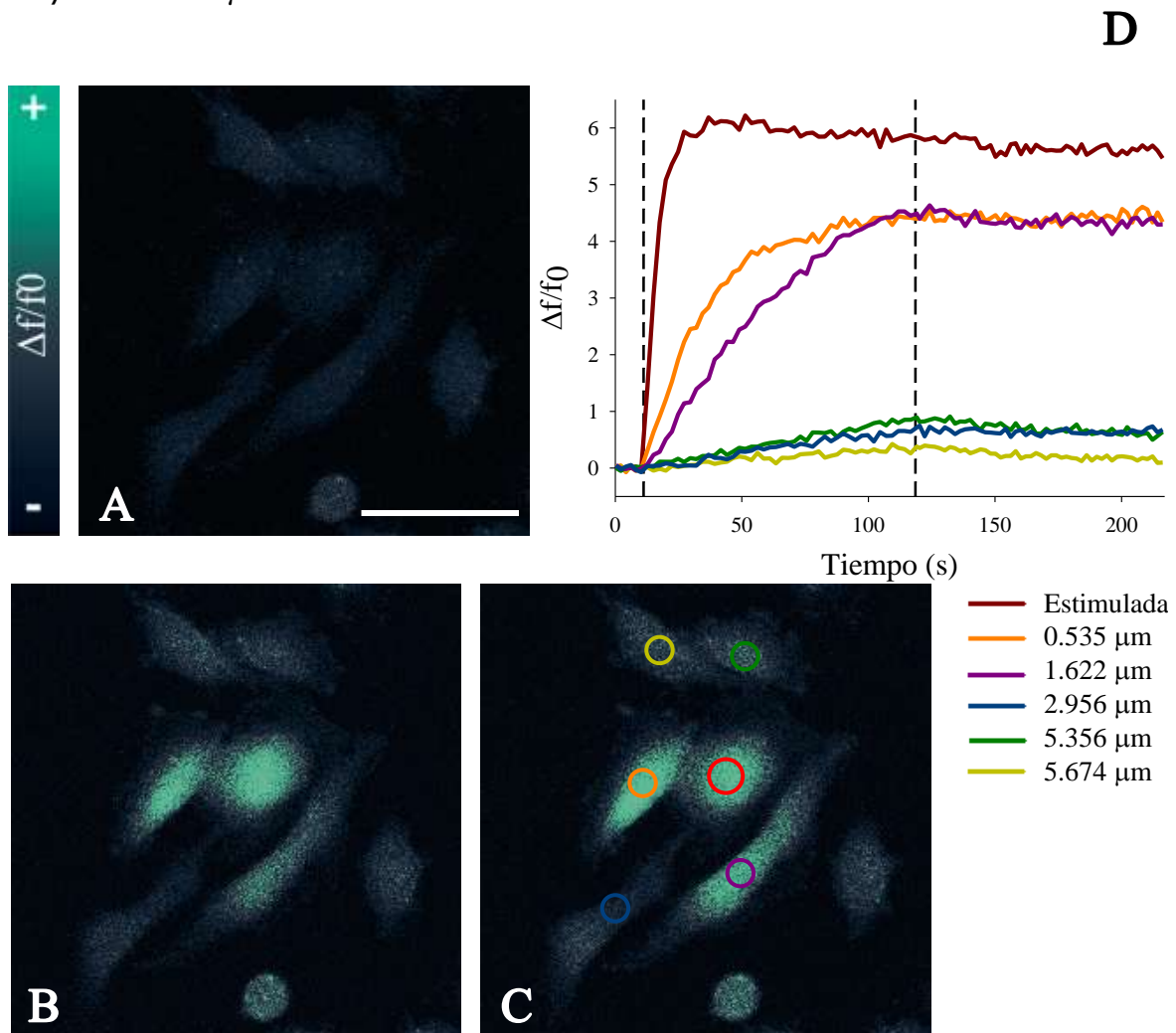


Figura 16. Representación de un registro de fotoestimulación en células de la línea tumoral PC-3 tras la administración de 18-β-GRA. Las células fueron tratadas con 18-β-GRA 100 μM durante treinta minutos. Se observan tres capturas que representan el protocolo de fotoestimulación (**A**, **B**, **C**), en **A** se muestran las células antes del fotoestímulo y corresponde al periodo f_0 , **B** representa las células durante la fotoestimulación (60 segundos), no se observan cambios evidentes en la intensidad de fluorescencia respecto al registro control. **C** representa los últimos segundos del registro, en esta imagen está señalada por medio de un círculo rojo la única célula que fue directamente fotoestimulada y las células correspondientes a ROIs del gráfico **D**. **D** representa los trazos correspondientes a los cambios en la intensidad de fluorescencia de cada célula, considerando la distancia intercelular, es evidente un comportamiento de la señal que es dependiente de la distancia intercelular. Las líneas punteadas representan el inicio y el fin de la fotoestimulación. Barra de escala, 50 μm.

Área bajo la curva vs Distancia

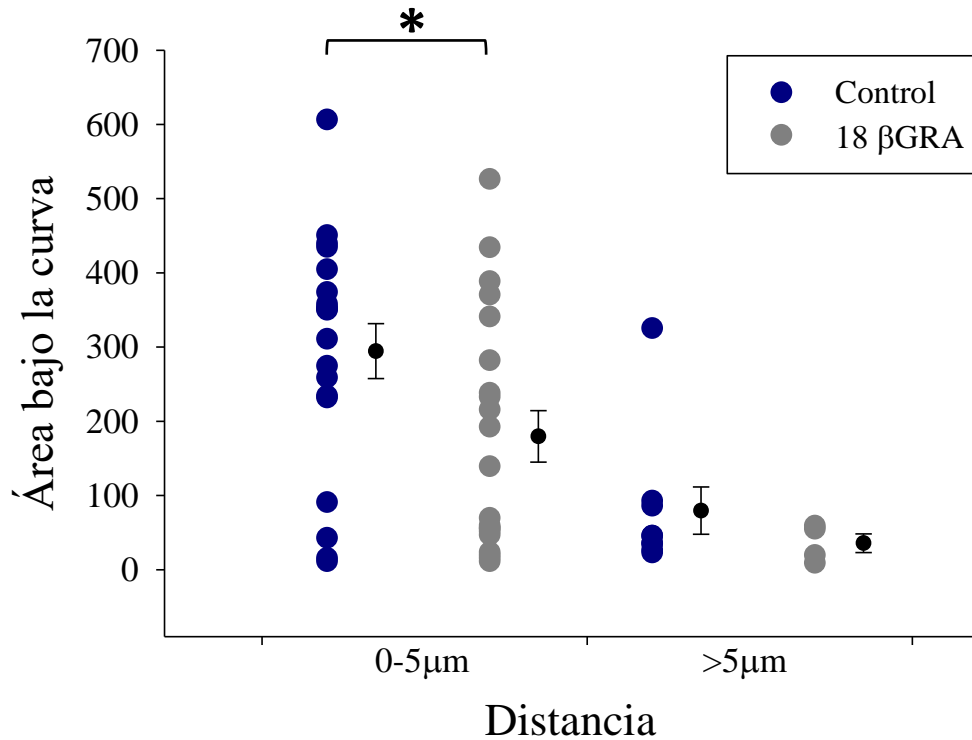


Figura 17. Gráfica del área bajo la curva contra la distancia para las células tratadas con 18-β-GRA. La gráfica representa el área bajo la curva de cada célula registrada y el rango de distancia en el que se clasificó, cada célula está representada por puntos en azul y gris que representan el grupo control y tratado respectivamente. A la derecha de estos se encuentran en negro los puntos representativos del promedio y el error estándar. Se realizó una prueba U de Mann-Whitney para cada par de grupos. “*” p<0.05, “**” p<0.01, “***” p<0.001, n=53.

Valor máximo $\Delta f/f_0$ vs Distancia

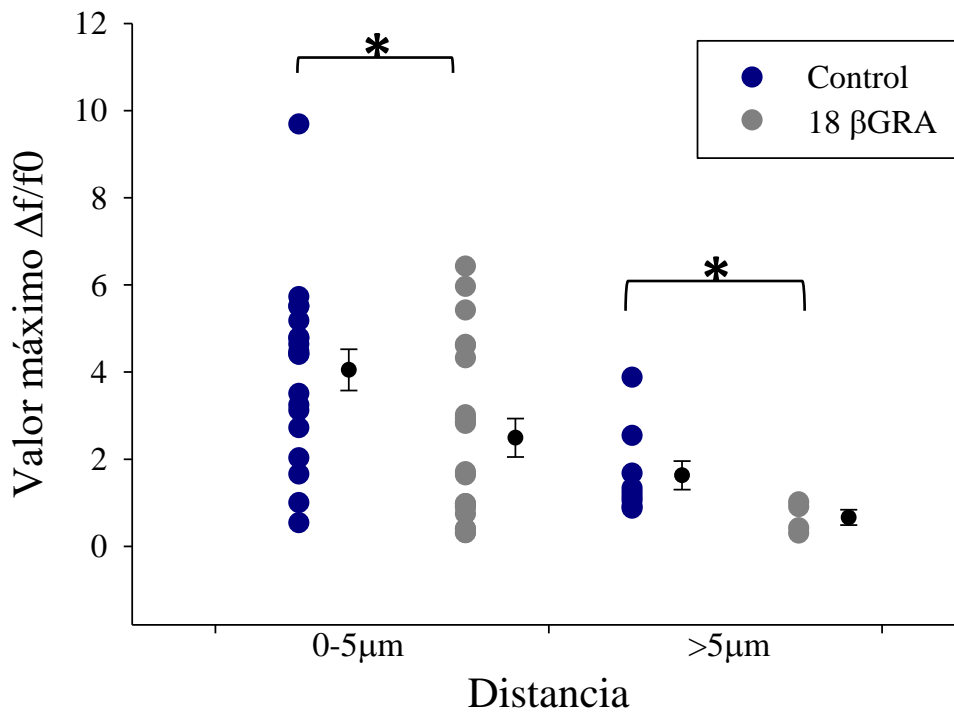


Figura 18. Gráfica del valor máximo de intensidad de fluorescencia contra la distancia para las células tratadas con 18- β -GRA. La gráfica representa el valor máximo de la relación $\Delta f/f_0$ de cada célula registrada y su respectivo rango de distancia, cada célula está representada por puntos en azul y gris que representan el grupo control y tratado respectivamente. A la derecha de estos se encuentran en negro los puntos representativos del promedio y el error estándar. Se realizó una prueba U de Mann-Whitney para cada par de grupos. “*” $p < 0.05$, “**” $p < 0.01$, “***” $p < 0.001$, $n = 53$.

Tiempo de valor máximo de $\Delta f/f_0$

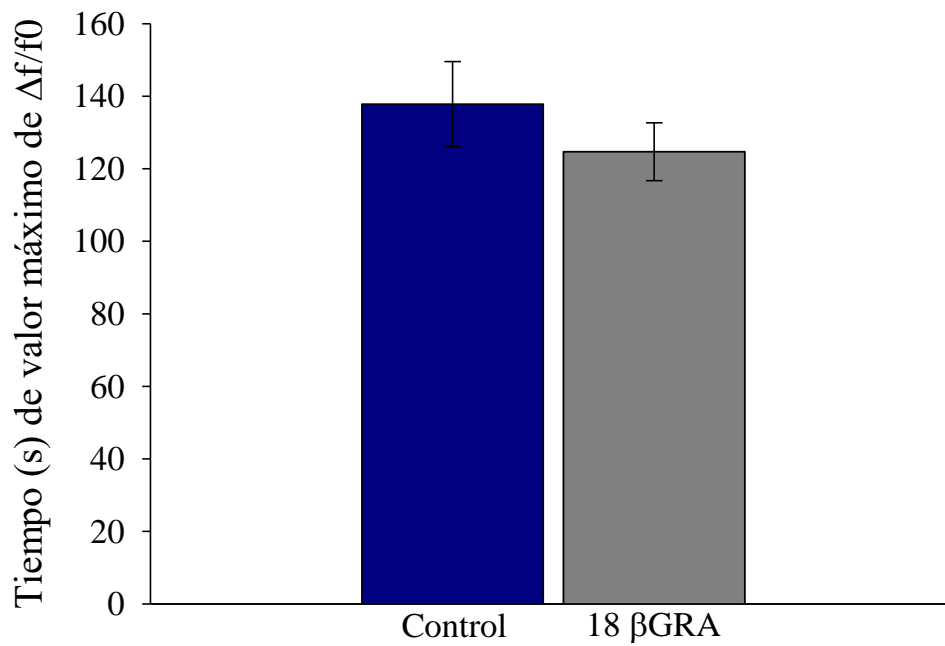


Figura 19. Gráfica del tiempo (s) del valor máximo de intensidad de fluorescencia para las células tratadas con 18- β -GRA. La gráfica representa el momento del registro donde se ubica el valor máximo de la relación $\Delta f/f_0$ de cada célula registrada, cada grupo está representado por barras que simbolizan el promedio y el error estándar. Se realizó una prueba U de Mann-Whitney para cada par de grupos, sin embargo, para esta variable no hubo diferencias significativas entre los grupos. n=53.

Bloqueador inespecífico CBX

Como parte de esta sección experimental también se utilizó el bloqueador CBX el cuál, presenta una menor afinidad por las uniones comunicantes y hemicanales como se discute posteriormente.

En la **Figura 20** está representado un registro control para esta condición que, comparado con el de la **Figura 21** no existen diferencias en la intensidad de fluorescencia visibles. Para estos ensayos se analizó un total de 65 células que se encontraban a distancias entre 0 y 21.054 μm .

Se sabe que tanto el 18- β -GRA como CBX son derivados del mismo compuesto, por esta razón resulta interesante observar en el caso de la administración de CBX que no existen diferencias significativas entre ninguno de los grupos en el área bajo la curva (**Figura 22**); al analizar el valor máximo de $\Delta f/f_0$ tampoco se encontraron diferencias significativas (**Figura 23**) ni para el tiempo donde se registró el valor máximo de intensidad (**Figura 24**). Más adelante se discute con detalle este aspecto.

Control

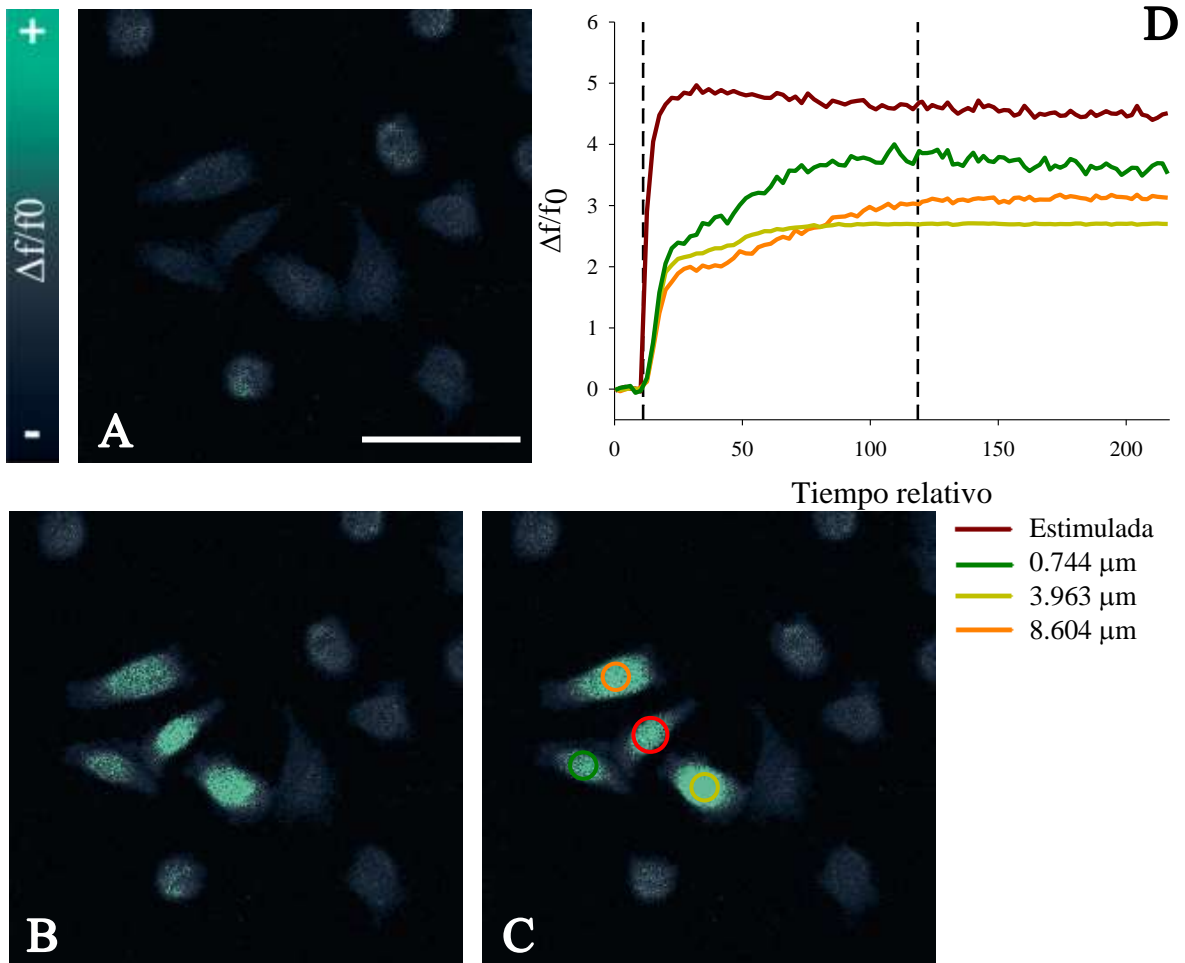


Figura 20. Representación de un registro control de fotoestimulación en células de la línea tumoral PC-3 antes de la administración de CBX. Se observan tres capturas que representan el protocolo de fotoestimulación (A, B, C), en A se muestran las células previo al estímulo luminoso, es decir, en condiciones basales. B representa las células durante la fotoestimulación y C representa los últimos segundos del registro, en esta imagen está señalada por medio de un círculo rojo la única célula que fue directamente fotoestimulada y las células que corresponde a ROIs del gráfico D. D representa los trazos correspondientes a los cambios en la intensidad de fluorescencia de cada célula, considerando la distancia intercelular. En este caso se puede observar que la señal persiste incluso a una distancia de aproximadamente 8 μm , las líneas punteadas representan el inicio y el fin de la fotoestimulación, puede observarse que el aumento en la intensidad de fluorescencia persiste posterior a la estimulación. Barra de escala, 50 μm .

CBX 100 μ M 30 minutos

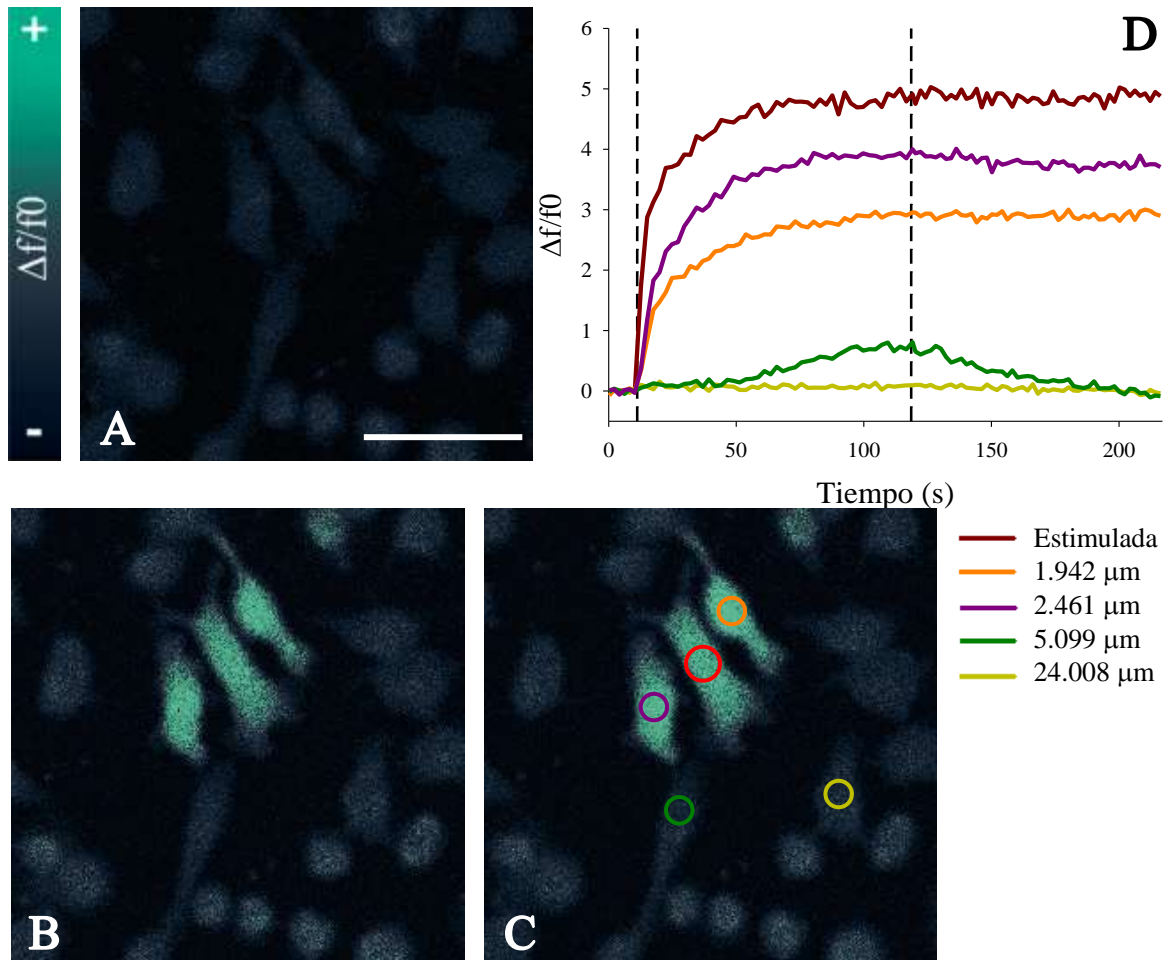


Figura 21. Representación de un registro de fotoestimulación en células de la línea tumoral PC-3 posterior a la administración de CBX 100 μ M por treinta minutos. Las capturas representan las etapas del protocolo de fotoestimulación (A, B, C), en A se muestran las células previo al estímulo luminoso y corresponde al periodo f_0 , B representa las células durante la estimulación y C representa los últimos segundos del registro, en esta imagen está señalada por medio de un círculo rojo la única célula que fue directamente fotoestimulada y en otros colores las células correspondientes al gráfico D. D representa los trazos correspondientes a los cambios en la intensidad de fluorescencia de cada célula a través del análisis de ROIs considerando la distancia intercelular. En contraste con el registro control se observa que la señal decae a partir de cerca de 5 μ m de distancia. Las líneas punteadas representan el inicio y el fin de la fotoestimulación. Barra de escala, 50 μ m.

Área bajo la curva vs Distancia

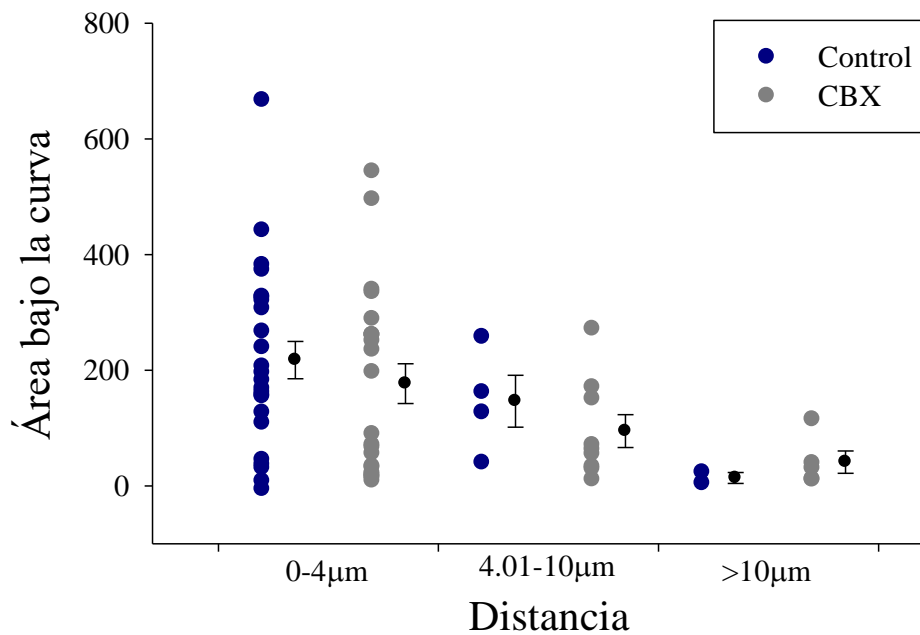


Figura 22. Gráfica del área bajo la curva contra la distancia para las células tratadas con CBX. La gráfica representa el área bajo la curva de cada célula registrada y el rango de distancia en el que se clasificó, cada célula está representada por puntos en azul y gris que representan el grupo control y tratado respectivamente. A la derecha de estos se encuentran en negro los puntos representativos del promedio y el error estándar. Se realizó una prueba U de Mann-Whitney para cada par de grupos. “*” $p < 0.05$, “**” $p < 0.01$, “***” $p < 0.001$, $n = 65$.

Valor máximo de $\Delta f/f_0$ vs Distancia

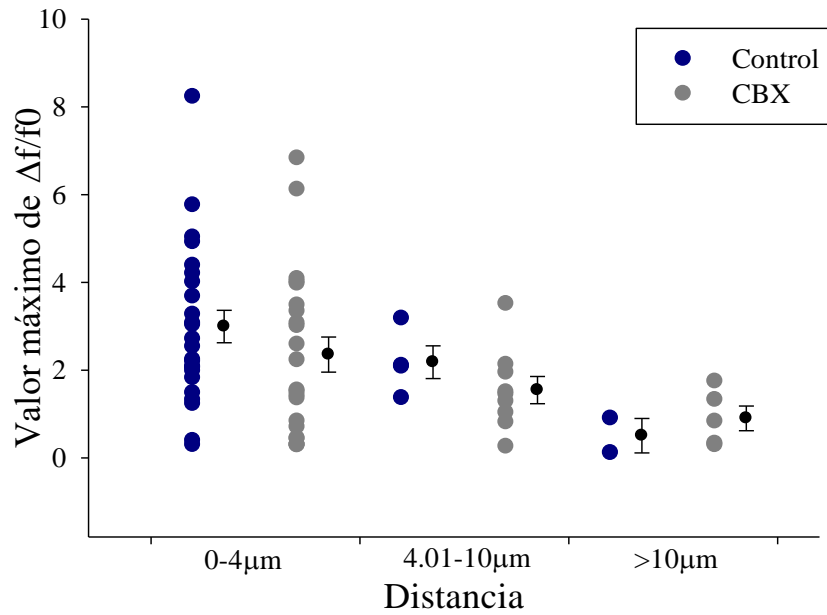


Figura 23. Gráfica del valor máximo de intensidad de fluorescencia contra la distancia para las células tratadas con CBX. La gráfica representa el valor máximo de la relación $\Delta f/f_0$ de cada célula registrada y su respectivo rango de distancia, cada célula está representada por puntos en azul y gris que representan el grupo control y tratado respectivamente. A la derecha de estos se encuentran en negro los puntos representativos del promedio y el error estándar. Se realizó una prueba U de Mann-Whitney para cada par de grupos. “*” $p < 0.05$, “**” $p < 0.01$, “***” $p < 0.001$, $n = 65$.

Tiempo de valor máximo de $\Delta f/f_0$

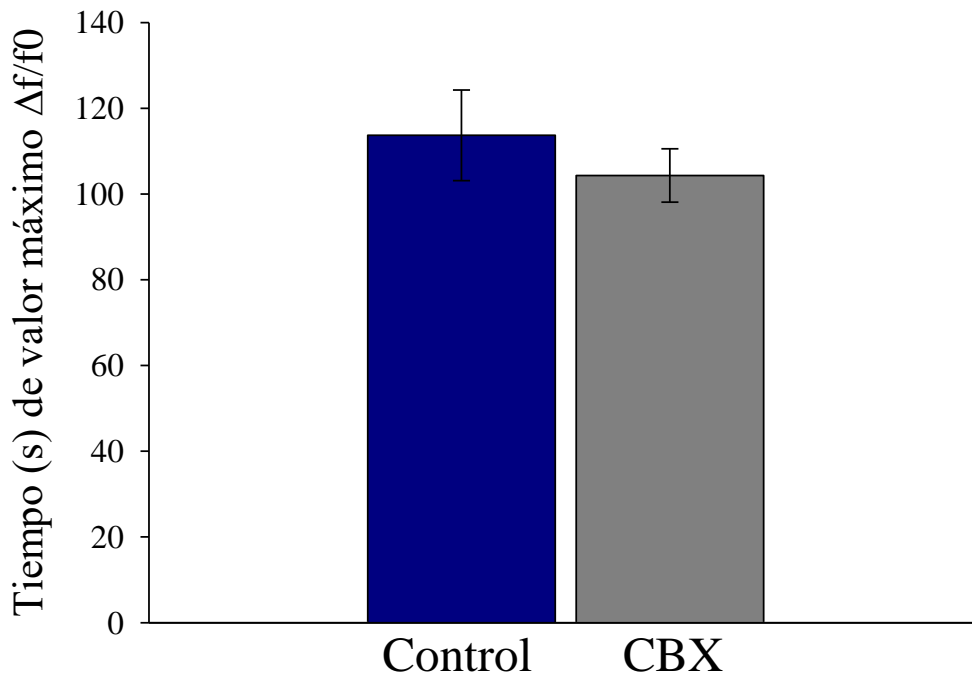


Figura 24. Gráfica del tiempo (s) del valor máximo de intensidad de fluorescencia para las células tratadas con CBX. La gráfica representa el momento del registro donde se ubica el valor máximo de la relación $\Delta f/f_0$ de cada célula registrada, cada grupo está representado por barras que simbolizan el promedio y el error estándar. Se realizó una prueba U de Mann-Whitney para cada par de grupos. “*” $p < 0.05$, “**” $p < 0.01$, “***” $p < 0.001$, al igual que para las otras variables este tratamiento no modificó significativamente los resultados. $n=65$.

Ausencia de calcio del medio extracelular

Para evaluar la importancia de la presencia de Ca^{2+} extracelular, se realizó el protocolo de estimulación con una solución libre de Ca^{2+} ; se analizaron un total de 109 células que se clasificaron en el grupo control, en las que fueron tratadas de 2.5 a 5 minutos con la solución sin Ca^{2+} y de 10 a 15 minutos, por lo que se realizaron comparaciones entre estos tres grupos. Las distancias intercelulares se encontraron en el rango de 0 a 20.406 μm .

El registro control para esta sección se presenta en la **Figura 25** en la cual no hay ninguna diferencia visible respecto al registro donde se utiliza una solución extracelular sin Ca^{2+} por cinco minutos (**Figura 26**), sin embargo, el total de células se analizó posteriormente y como se observa en la **Figura 27** y **Figura 28** la tendencia sobre la relación lineal entre el área bajo la curva y la distancia es evidente en las tres condiciones. En cuanto al área bajo la curva únicamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas en distancias mayores a 10 μm (**Figura 27**) entre la condición control y el mantenimiento de las células en solución libre de Ca^{2+} de 10 a 15 minutos donde los valores se redujeron un 96.9% ($p=0.019$). Esto indicaría que el principal recurso de Ca^{2+} para la propagación de la onda de Ca^{2+} intercelular proviene de almacenes subcelulares como el retículo endoplásmico y la mitocondria en las regiones más cercanas a la célula irradiada, aunque a distancias más alejadas el Ca^{2+} sí podría jugar un papel importante en la propagación de la señal intercelular. Además, se evaluó si los niveles de Ca^{2+} extracelular son importantes para la generación de la señal de Ca^{2+} en la célula irradiada, los resultados tampoco fueron significativos por lo que se puede inferir que el inicio de la señal es dependiente de recursos internos del ion (resultados no mostrados).

Al evaluar el valor máximo de intensidad de fluorescencia los resultados fueron parecidos a los del área bajo la curva, encontrando diferencias estadísticamente significativas únicamente entre la condición control y las células tratadas con solución libre de Ca^{2+} de 10 a 15 minutos en distancias mayores a 10 μm ($p=0.019$) (**Figura 28**), en este caso la reducción del valor máximo fue del 82.56% respecto al control. Para el tiempo donde aparece el valor máximo no hubo diferencias significativas (**Figura 29**), pero se observa durante la fotoestimulación en el medio libre de Ca^{2+} que para tiempos de tratamiento cortos (de 2.5 a 5 minutos) hay una reducción del tiempo en el que aparece el valor máximo

de $\Delta f/f_0$ y lo opuesto se observa en tiempos de tratamiento más largos (10 a 15 minutos) donde el valor máximo aparece con retraso; estos cambios no pueden adjudicarse al tratamiento.

Control

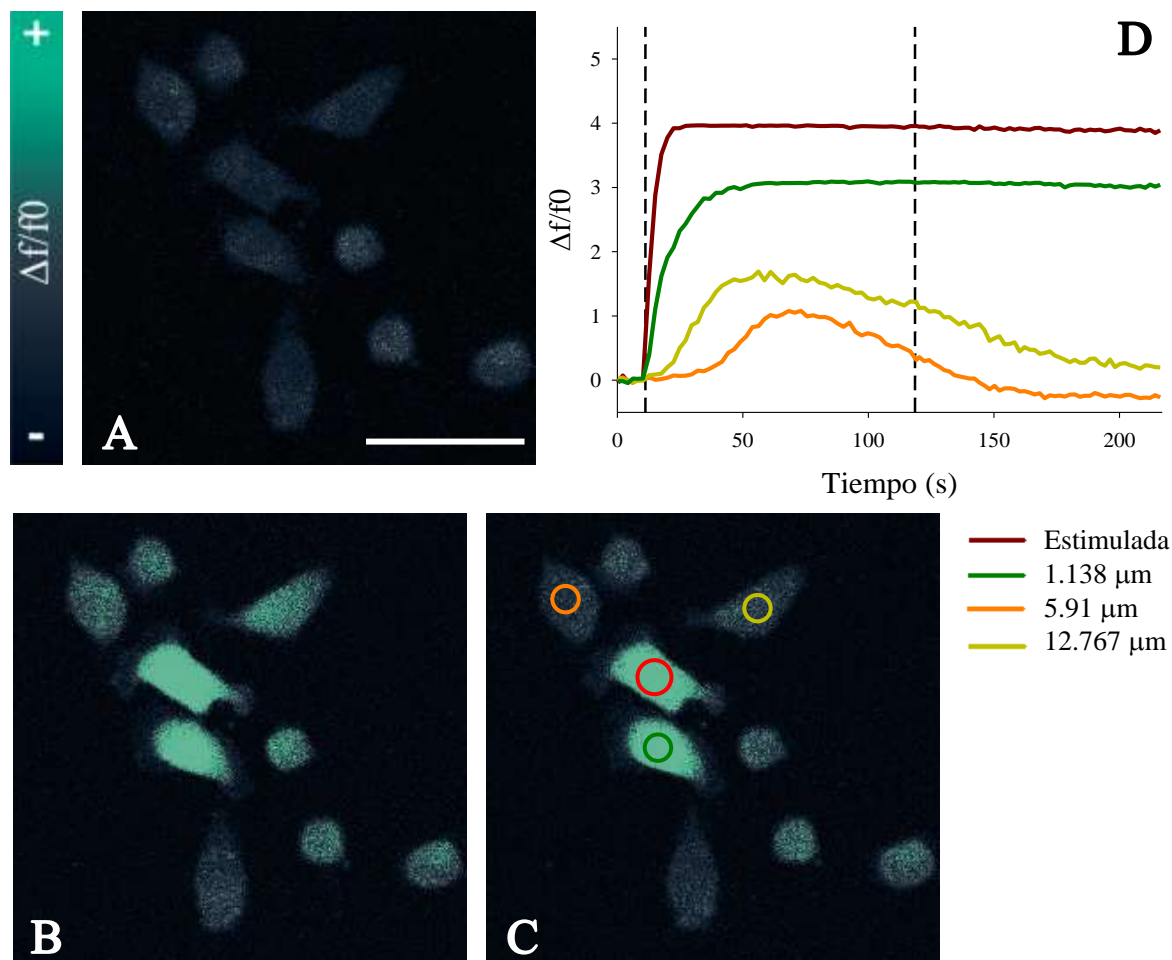


Figura 25. Representación de un registro control de fotoestimulación en células de la línea tumoral PC-3 previo a la eliminación de calcio extracelular. Se observan tres capturas que representan el protocolo de fotoestimulación (A, B, C), en A se muestran las células previo al estímulo luminoso, B representa las células durante la estimulación y C representa los últimos segundos del registro, en esta imagen está señalada por medio de un círculo rojo la única célula que fue directamente fotoestimulada y en otros colores las células que corresponden al gráfico D. D representa los trazos correspondientes a los cambios en la intensidad de fluorescencia de cada célula a través del análisis de ROIs considerando la distancia intercelular, en este caso algunas células del registro muestran un decremento en la intensidad de fluorescencia a pesar de ubicarse en una distancia de poco más de 5 μm . Las líneas punteadas representan el inicio y el fin de la fotoestimulación. Barra de escala, 50 μm .

Ausencia de Calcio extracelular por 5 minutos

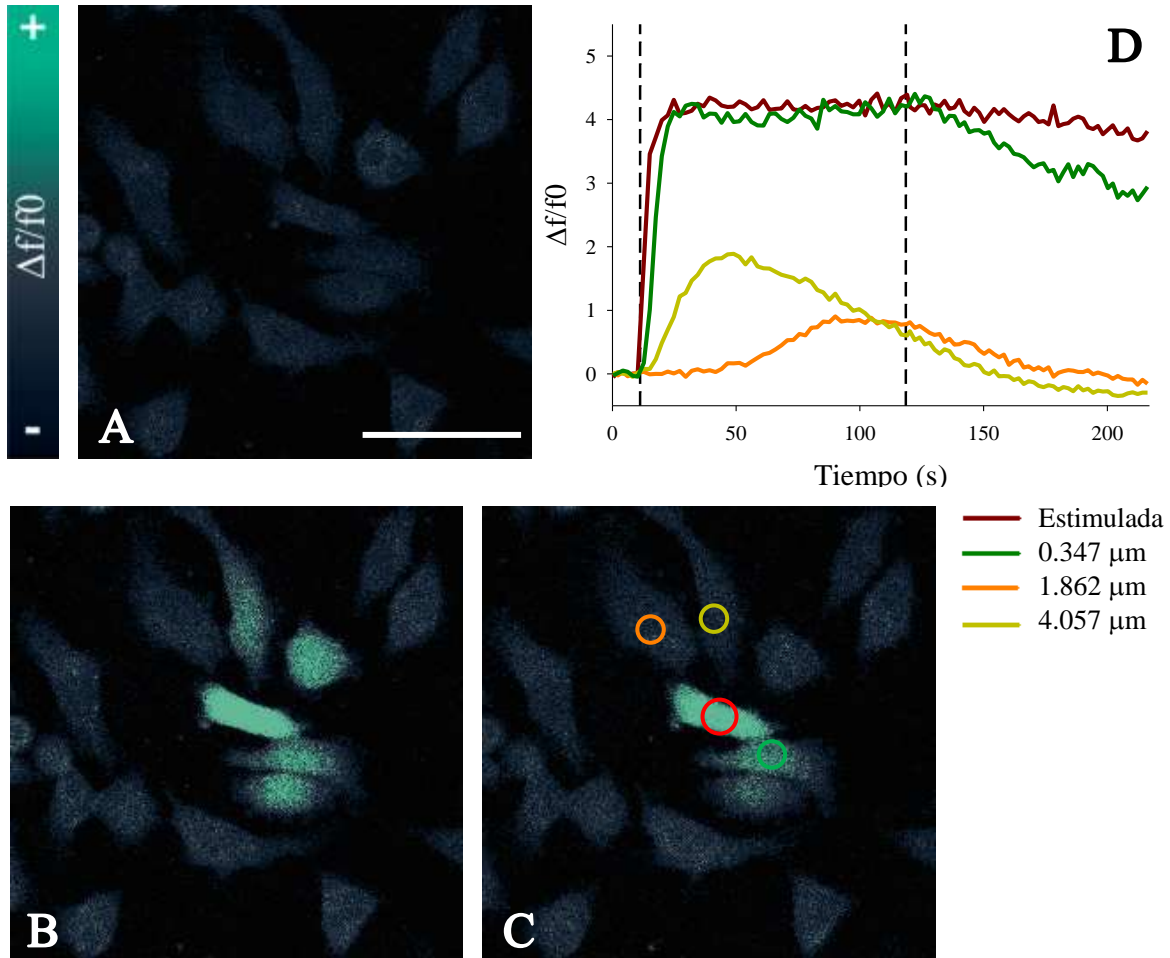


Figura 26. Representación de un registro de fotoestimulación en células de la línea tumoral PC-3 en ausencia de calcio extracelular por cinco minutos. Se observan tres capturas que representan el protocolo de fotoestimulación (A, B, C), en A se muestran las células previo al estímulo luminoso y corresponde al periodo f_0 , B representa las células durante la estimulación y C representa los últimos segundos del registro, en esta imagen está señalada por medio de un círculo rojo la única célula que fue directamente fotoestimulada y con otros colores las células que corresponden a ROIs del gráfico D. D representa los trazos correspondientes a los cambios en la intensidad de fluorescencia de cada célula, considerando la distancia intercelular, el decremento en la señal puede observarse a partir de 1.8 μm de distancia. Las líneas punteadas representan el inicio y el fin de la fotoestimulación. Barra de escala, 50 μm .

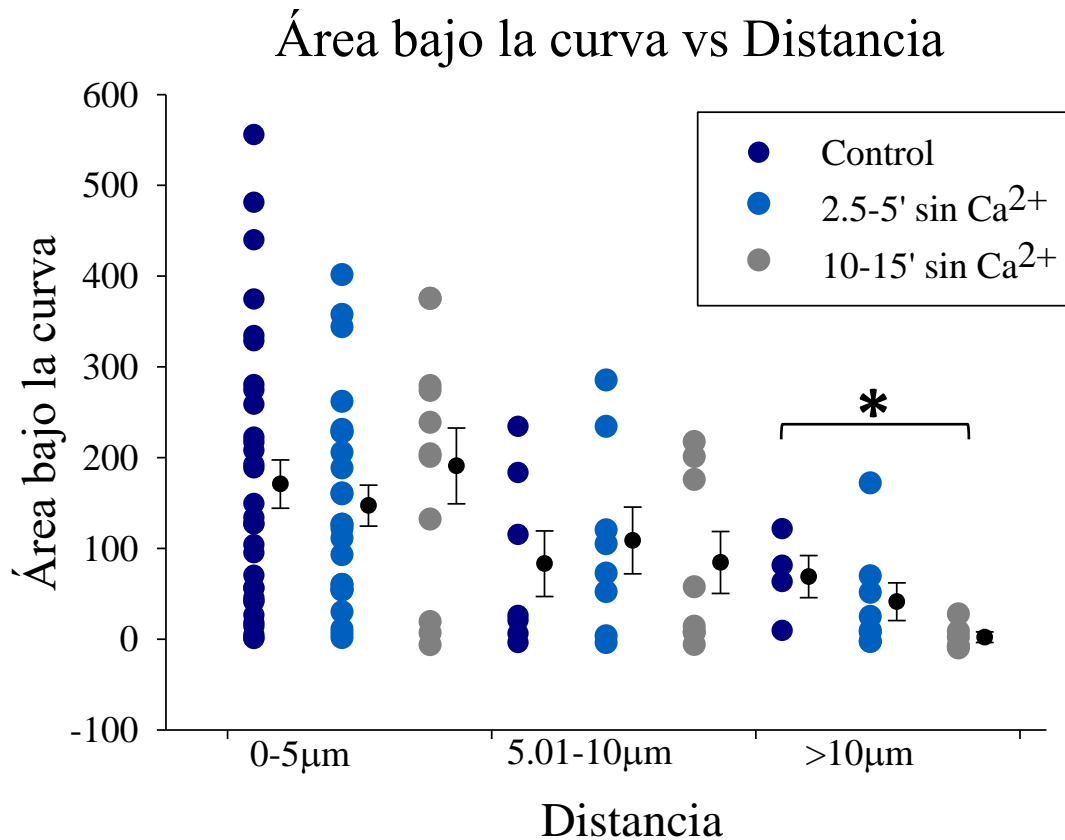


Figura 27. Gráfica del área bajo la curva contra la distancia de la para las células que fueron tratadas con solución extracelular libre de calcio y EGTA. La gráfica representa el área bajo la curva de cada célula registrada y el rango de distancia en el que se clasificó, cada célula está representada por puntos en azul y gris que representan el grupo control y tratado respectivamente. A la derecha de estos se encuentran en negro los puntos representativos del promedio y el error estándar. Se realizó una prueba U de Mann-Whitney para cada par de grupos. “*” $p < 0.05$, “**” $p < 0.01$, “***” $p < 0.001$, $n = 109$.

Valor máximo de $\Delta f/f_0$ vs Distancia

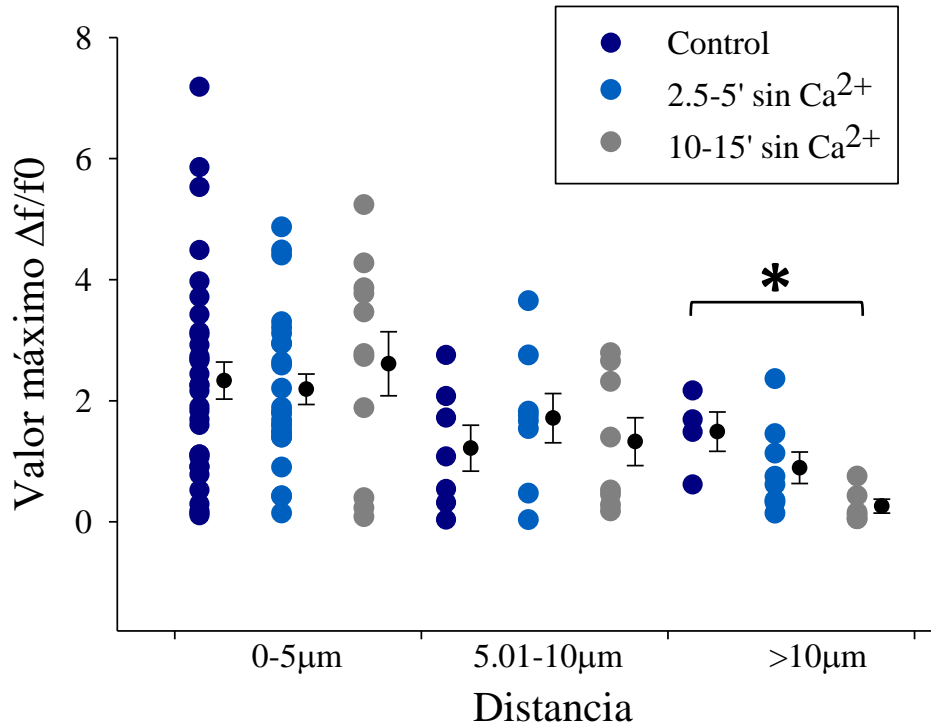


Figura 28. Gráfica del valor máximo de intensidad de fluorescencia contra la distancia para las células que fueron tratadas con solución extracelular libre de calcio y EGTA. La gráfica representa el valor máximo de la relación $\Delta f/f_0$ de cada célula registrada y su respectivo rango de distancia, cada célula está representada por puntos en azul y gris que representan el grupo control y tratado respectivamente. A la derecha de estos se encuentran en negro los puntos representativos del promedio y el error estándar. Se realizó una prueba U de Mann-Whitney para cada par de grupos. “*” $p < 0.05$, “**” $p < 0.01$, “***” $p < 0.001$, $n = 109$.

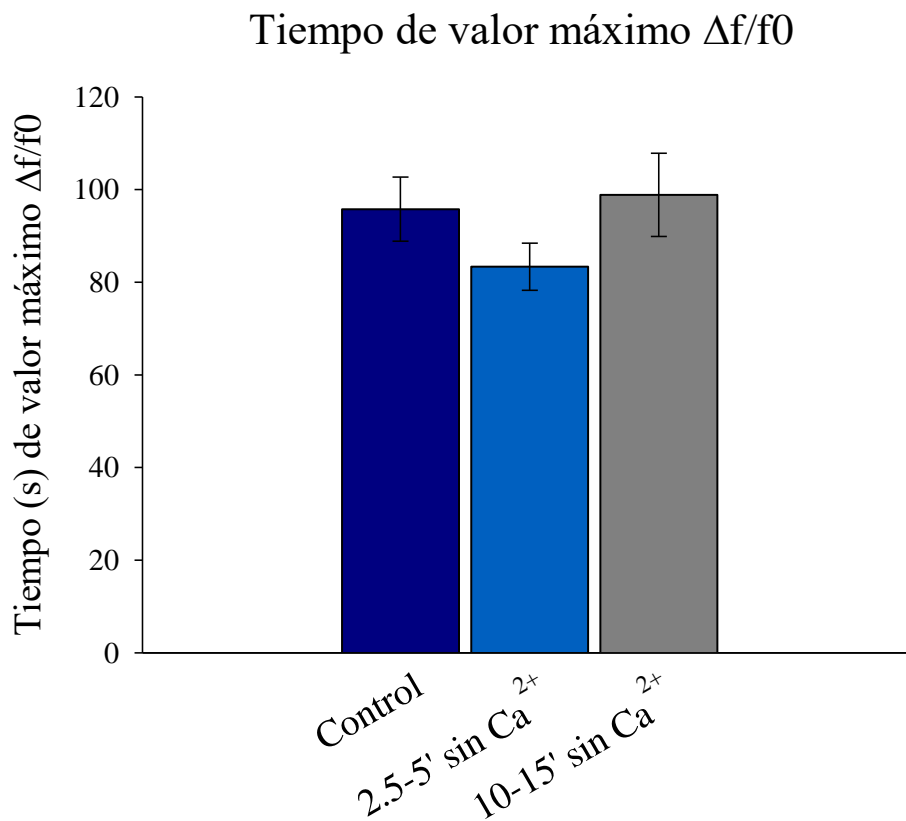


Figura 29. Gráfica del tiempo (s) del valor máximo de intensidad de fluorescencia para las células que fueron tratadas con solución extracelular libre de calcio. La gráfica representa el momento del registro donde se ubica el valor máximo de la relación $\Delta f/f_0$ de cada célula registrada, cada grupo está representado por barras que simbolizan el promedio y el error estándar. Se realizó una prueba U de Mann-Whitney para cada par de grupos. Estos tratamientos no modificaron significativamente los resultados. n=109.

Evaluación de la viabilidad celular posterior a la TFD

Una vez determinada la concentración del FS y la potencia necesaria para generar una onda de Ca^{2+} intercelular se determinó si ésta era una dosis suficiente para provocar muerte celular (necrosis, apoptosis o ambas). Bajo estas condiciones se observaron cambios morfológicos que parecían evidenciar modificaciones en la viabilidad (**Figura 30**). No obstante, al realizar las pruebas correspondientes no hubo cambios en la viabilidad celular en el grupo control o en alguno de los grupos tratados en un lapso aproximado de una hora de monitoreo. Estos resultados podrían atribuirse a la dosis de luz empleada; pues al aplicar un fotoestímulo con una potencia aproximada de $5\text{mW}/\text{cm}^2$ se observaron cambios en la viabilidad que indicaban principalmente la presencia de células apoptóticas 25 minutos después de aplicada la TFD, las células espectadoras y la célula irradiada presentan modificaciones morfológicas (**Figura 31**). Estos resultados confirman lo revisado por Veenhuizen y Stewart en 1995 donde, para algunos tipos celulares la dosis de luz influye de manera importante en la eficacia de la TFD.

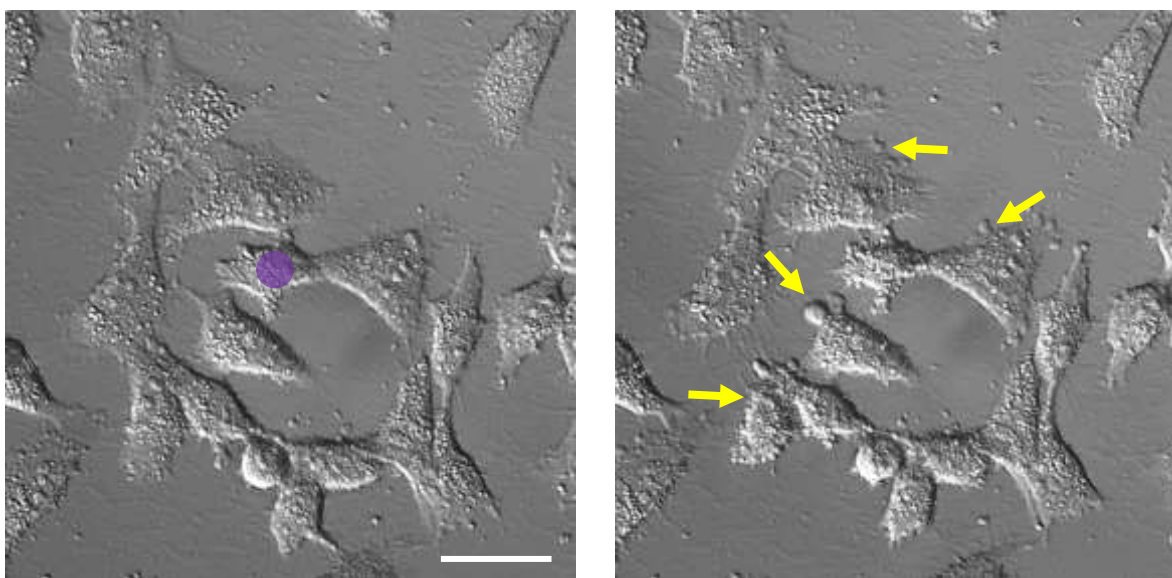


Figura 30. Ensayo de viabilidad celular. La estimulación de una sola célula de la línea tumoral PC-3 con una potencia promedio de 3.45 mW produce cambios morfológicos en células cercanas, sin embargo, al aplicar el protocolo de Anexina V no se emite señal que indique muerte celular de ningún tipo. La figura **A** indica la morfología de las células previa a la aplicación de TFD, en un círculo morado está señalada la célula que fue fotoestimulada, mientras que **B** muestra cambios en la morfología treinta minutos después de la fotoestimulación; las flechas amarillas indican cambios evidentes en la forma de las células, principalmente la formación de vesículas. Barra de escala, $30\ \mu\text{m}$.

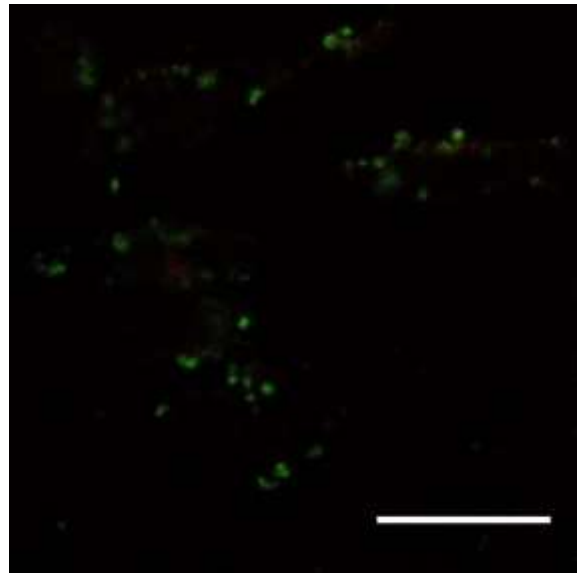
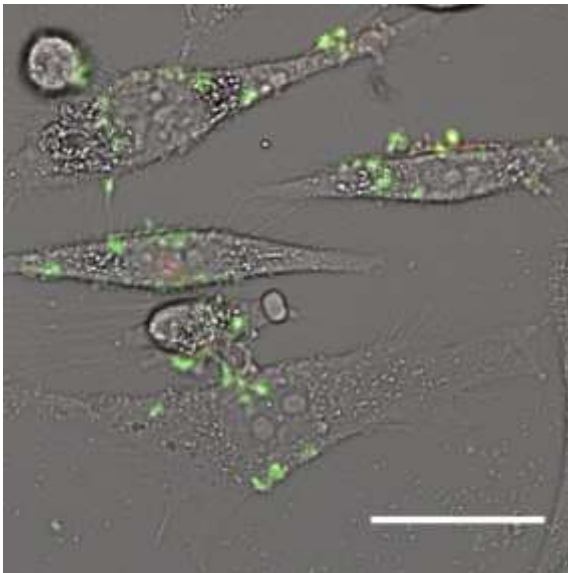
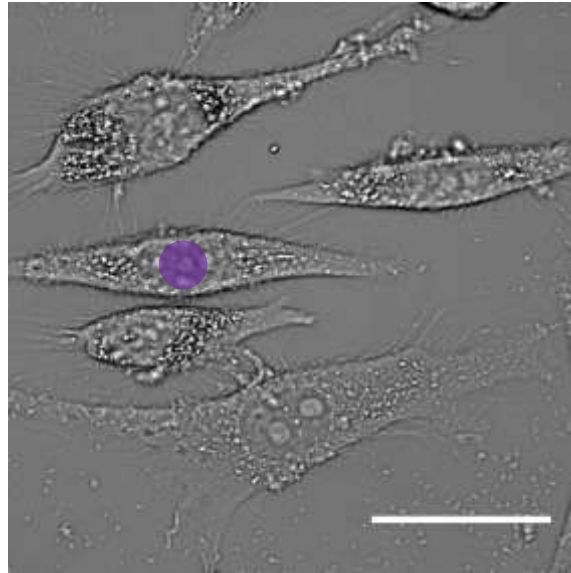


Figura 31. Modificación de la viabilidad celular. La estimulación de una sola célula de la línea tumoral PC-3 con una potencia aproximada de 5 mW produce cambios morfológicos en células cercanas, en la figura **A** se muestran las células previo a la aplicación de PDT y se señala en morado la célula que fue directamente fotoestimulada, **B** y **C** corresponden a capturas 30 minutos después de la fotoestimulación con los marcadores Anexina V en verde y yoduro de propidio en rojo. En la célula estimulada puede observarse marcaje rojo en lo que correspondería al núcleo, además en ésta y las células cercanas se identifican vesículas marcadas que indican apoptosis. Barra de escala, 50 nm.

Discusión

El principal objetivo de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas es brindar a los individuos enfermos un tratamiento efectivo contra sus padecimientos; en el caso del cáncer, conforme éste progresa se disminuyen las posibilidades de un tratamiento realmente curativo, pero existen procedimientos que disminuyen los síntomas y mejoran la calidad de vida. Para que cualquiera de estas terapias pueda ser aplicada en pacientes es necesario comenzar esclareciendo los mecanismos de acción que producen el efecto terapéutico y conforme se avance en este aspecto se puede estudiar la interacción del órgano blanco con otros elementos.

La TFD como alternativa de curación ha sido valorada en el área dermatológica y oncológica, utilizándose para tratar el cáncer de piel, lesiones premalignas y neoplasias en mucosas (Sharman y cols., 1999; Kübler, 2005); con el desarrollo de difusores y FS de nueva generación esta terapia ahora es utilizada para tratar tumores localizados de acceso más restringido con resultados variables (Zaak y cols., 2003; Azzouzi y cols., 2017; Hoorelbeke y cols., 2018). Si bien, se le atribuye el efecto citotóxico al oxígeno singlete y otros radicales es posible que otros componentes estén involucrados y su manipulación mejore el tratamiento.

El uso de cultivos celulares permite un mejor control de las variables en el estudio de procesos específicos; en este caso el inicio y propagación de la señal de Ca^{2+} causado por la terapia fotodinámica ha sido escasamente estudiado en cáncer de próstata, la línea celular tumoral PC-3 se ha caracterizado por ser un modelo experimental idóneo para el estudio de compuestos de importancia terapéutica en cáncer de próstata que producen cambios en el Ca^{2+} intracelular, además en estas células ya se ha determinado la expresión de proteínas implicadas en la comunicación intercelular; todos estos aspectos permitieron el cumplimiento del objetivo general de este trabajo.

De acuerdo con lo reportado en los métodos y resultados, en la preparación de la línea celular tumoral PC-3 se encontraron grupos de células donde cada unidad se encontraba próxima a otra, pero fue difícil la localización de grupos cuyas células se hallaran directamente relacionadas (cuya distancia intercelular fuera $0\mu\text{m}$), lo que limitó el estudio

de las uniones comunicantes, no obstante, los hemicanales formados por Cxs también forman poros o canales funcionales que permiten la comunicación de la célula con el medio extracelular, por lo que se pudo evaluar el papel de estas estructuras en la propagación de la señal de Ca^{2+} causada por la TFD.

Los resultados inmunofluorescencia del presente trabajo sugieren la presencia de Cxs a nivel membranal y subcelular. Un hecho interesante es la ausencia en la membrana celular de Cx26 pero su abundante presencia nuclear (**Figura 8**). La Cx43 también fue localizada en el núcleo, sin embargo, puede observarse marcaje a nivel periférico y membranal (**Figura 9**). La localización citoplasmática de Cx43 y en mucho menor abundancia de Cx26 puede incluir organelos como retículo endoplásmico y red de Golgi, lugares donde se lleva a cabo la maduración de estas proteínas pues su vida media en la membrana es de cuatro a seis horas. El transporte de Cx hacia la membrana puede ocurrir a través de la red Golgi o por el transporte directo vía microtúbulos (Laird, 2006).

En cuanto a la localización perinuclear de Cxs, Otori y colaboradores reportan en una serie de muestras de tejido de carcinoma hepático de ratón la presencia nuclear de Cx32, esta Cx fue caracterizada y se encontró una mutación por sustitución en el codón 220 (arginina por histidina), la funcionalidad no fue determinada (Otori y cols., 1998). La localización aberrante de Cxs podría tener importancia en el control de la progresión tumoral al influir en la transcripción de algunos genes de la familia Bcl-2 (Kanczuga-Koda y cols., 2005).

Krutovskikh y colaboradores en el año 2000, trabajando en células de carcinoma epidermoide (A431) y tras generar una proteína Cx43 con mutaciones en la región formadora de poro del tercer segmento transmembrana reportaron la relocalización de ésta principalmente en el núcleo con actividad de poro deficiente, al evaluar cambios en el crecimiento *in vitro* no se encontraron diferencias significativas, pero al ser inyectadas de manera subcutánea en ratones su tasa de crecimiento se aceleró respecto a su control negativo.

La transfección de un fragmento mutado de Cx43 en células HeLa permitió corroborar su transporte hacia el núcleo, al evaluar si este fragmento influía en la tasa de crecimiento de la línea celular se concluyó que era capaz de inhibir la proliferación en el séptimo día de

crecimiento, pero no en días previos (Dang y cols., 2003). Los mecanismos que subyacen estos procesos aún permanecen sin dilucidar.

Con el objetivo de evaluar la participación de las Cxs en su conformación de hemicanal o unión comunicante en la terapia fotodinámica y la propagación de la señal a células espectadoras se utilizaron tres bloqueadores inespecíficos de estas estructuras; Eskandari y colaboradores demuestran la selectividad del fenamato FFA al bloqueo de casi el 100% de la corriente provocada por estructuras formadas por Cx50 y Cx46, tanto uniones comunicantes como hemicanales funcionales. Este artículo también referencia que FFA presenta selectividad por el bloqueo de hemicanales compuestos por Cx38 (Eskandari y cols., 2002). Aunque en la actualidad se desconoce el sitio de unión preciso de FFA en uniones comunicantes y hemicanales; se demostró que la forma no cargada del fármaco tiene la capacidad de difundir a través de la membrana debido a su hidrofobicidad y se propone que es capaz de provocar cambios conformacionales en las Cxs tanto de uniones comunicantes como de hemicanales para regular su permeabilidad (Srinivas & Spray, 2003). Juszczak y Swiergiel realizan una revisión de los bloqueadores más utilizados y mencionan la selectividad de FFA por uniones comunicantes formadas por Cx43 pero no se menciona si por hemicanales formados por este tipo de Cx también.

En cuanto a la participación de las Cxs en la generación de la onda de Ca^{2+} , se carece de evidencias experimentales en líneas celulares de cáncer de próstata pero se sabe que en cultivos celulares de glioma con baja expresión de Cxs la propagación de la señal de Ca^{2+} está inhibida mientras que en aquellas células con Cx43 expresada abundantemente se observa el fenómeno contrario (Cotrina & cols, 1998). Se piensa que en estas células tanto uniones comunicantes como hemicanales son altamente funcionales y que estos últimos facilitan la generación de ondas de Ca^{2+} y la liberación de otras moléculas al medio, principalmente ATP; estos mecanismos propician la expansión de la señal de Ca^{2+} (Stout & cols., 2002). De acuerdo con los resultados mostrados en el presente trabajo la onda de Ca^{2+} producida durante la TFD bajo las condiciones descritas en la metodología es capaz de propagarse por poco más de 20 μm (esta distancia únicamente entre la célula que es directamente fotoestimulada y células que la encaran), a esta distancia el aumento del Ca^{2+} intracelular fue en promedio dos veces el nivel basal de Ca^{2+} en los ensayos control (datos

numéricos no mostrados). Lo revisado por Leybaert y colaboradores en 2016 indica que concentraciones de Ca^{2+} intracelular de hasta 500 nM provocan la apertura de hemicanales liberando moléculas que favorecen la propagación de la señal de Ca^{2+} (Hoorelbeke y cols., 2018).

Es importante discutir sobre los mecanismos de regulación de uniones comunicantes, pero principalmente de hemicanales, a los cuales se atribuye la respuesta de Ca^{2+} observada y analizada en este trabajo; existe una regulación importante de estructuras formadas por Cxs dada por la concentración de Ca^{2+} extracelular e intracelular y es controversial debido a que esta misma molécula puede pasar a través de uniones comunicantes y hemicanales. Se sabe que la concentración extracelular de Ca^{2+} influye en el estado de estos poros; en el caso de hemicanales no asociados a uniones comunicantes la disminución de Ca^{2+} extracelular a 0.01 mM o menos permite la apertura de hemicanales posiblemente influyendo sobre las interacciones entre conexinas (Li & cols., 1996). Estos resultados no se corroboraron en el modelo experimental de este trabajo; la aplicación de bloqueadores inespecíficos de uniones comunicantes y hemicanales en ausencia de Ca^{2+} extracelular no produjeron ningún cambio significativo (resultados no mostrados); de acuerdo con algunos trabajos pueden existir excepciones en la activación de hemicanales a bajas concentraciones de Ca^{2+} extracelular, como en el caso de Cx43 donde este ion participaría en la formación de complejos que facilitan el transporte de NAD^+ y no directamente sobre hemicanales (Bruzzone & cols., 2001), Cx50 (Zampighi & cols., 1999) entre otras.

El Ca^{2+} intracelular tiene un rol importante en la modulación de la apertura de uniones comunicantes, desde la década de los setenta se descubrió que concentraciones intracelulares de Ca^{2+} de hasta 300 nM produce el cierre de uniones comunicantes como un mecanismo de protección de daño a células cercanas con las que se tiene comunicación directa, también existen algunos reportes en donde el aumento de Ca^{2+} intracelular favorece el acople de uniones comunicantes (Leybaert & cols., 2016). En el caso de hemicanales, se ha estudiado que el aumento en el nivel intracelular de Ca^{2+} favorece, en lugar de inhibir, la apertura de estas estructuras, provocando un efecto máximo cuando el Ca^{2+} tiene una concentración intracelular de 500 nM, y un decaimiento de la activación de hemicanales a partir de esta concentración con un efecto de inhibición máximo en 1 μM . Estos

mecanismos parecen ser provocados por actividad enzimática dependiente del complejo Ca^{2+} -Calmodulina y la activación de proteínas cinasas y han sido demostrados en sistema nervioso (Alev & cols., 2008; De Pina-Benabou & cols., 2001; De Vuyst & cols., 2006). Por otro lado, modificaciones covalentes como la fosforilación también regulan la permeabilidad de hemicanales; esto se demostró al utilizar una Cx43 con una mutación en el sitio de acción de PKC, el resultado fue que los hemicanales formados por esta Cx permanecieron abiertos provocando influjo de diversas moléculas a las células (Sáez & cols., 2005; Bao & Altenberg, 2004)

De acuerdo con lo presentado en la sección de resultados, hubo diferencias estadísticamente significativas en las variables área bajo la curva, valor máximo de intensidad de fluorescencia y tiempo del valor máximo para las células que fueron tratadas con FFA y cuya distancia fue mayor a $10\mu\text{m}$ de la célula estimulada (**Figuras 14 y 15**), esto sugiere la participación de hemicanales en este rango, además, los resultados obtenidos por los ensayos de inmunofluorescencia y lo reportado por Zhang en 2015 se infiere que el tipo de Cx involucrada en la propagación de la onda de Ca^{2+} intercelular es Cx43 aunque otras también podrían estar participando en generación de este mecanismo en células espectadoras éstas pueden ser Cx45, Cx50 o Cx46, Cxs menos estudiadas en líneas tumorales de próstata.

Para el caso del 18- β -GRA y CBX, ambos son derivados del ácido glicirretínico de diferente solubilidad de los que se desconoce el mecanismo de acción por el cuál disminuyen la permeabilidad de hemicanales y uniones comunicantes a corto plazo, pero se ha propuesto que estos fármacos podrían modificar la fluidez de la membrana o unirse a Cx provocando cambios conformacionales; a largo plazo, se propone que el mecanismo de acción del 18- β -GRA es a través de la desfosforilación de Cxs y la activación de proteínofosfatasas (tipo 1 y 2A), o bien desensamblando placas de uniones comunicantes (Goldberg & cols., 1996), éstas enzimas podrían tener otros blancos que también participen en la propagación del Ca^{2+} extracelular (Guan y cols., 1996), este mecanismo de desensamble también se propone para otros fármacos derivados del ácido glicirretínico. Las pruebas realizadas con el bloqueador 18- β -GRA indicaron que existen diferencias significativas en el valor máximo de intensidad de fluorescencia (**Figura 18**), aunque al

evaluar la respuesta total a través del área bajo la curva sólo hubo cambios estadísticamente significativos en el rango de distancia de 0 a 5 μm (**Figura 17**). Este bloqueador inespecífico presenta cierta selectividad para bloquear hemicanales compuestos por Cx46 y Cx50 al igual que FFA (Eskandari y cols., 2002), y tanto FFA como 18- β -GRA son utilizados indistintamente como bloqueadores de uniones comunicantes y hemicanales formados por cualquier tipo de Cx observándose resultados ante su administración (Sáez & cols., 2005).

No existen reportes sobre la especificidad de CBX hacia algún tipo de Cx, sin embargo, ha sido utilizada para bloquear uniones comunicantes formadas por Cx43 y Cx26 (Weissman y cols., 2004; Plotkin y cols., 2002; Eskandari y cols., 2002) y se ha corroborado que reducen la conductancia de uniones comunicantes de un 60 a 80% aun en concentraciones máximas (100 μM) (Rozental y cols., 2001). Por otro lado, Kamermans y colaboradores estudiaron la respuesta de células horizontales en retina de pez carpa (donde se han identificado heminales formados por Cx26), al administrar CBX tras un estímulo luminoso en la retina del modelo animal experimental se produjo una hiperpolarización de las células horizontales causada por el bloqueo de los hemicanales. Este reporte indica que CBX ha sido probado satisfactoriamente para bloquear hemicanales formados por Cx26, pero no hay reportes de selectividad a otro tipo de hemicanales. En la sección de resultados de este trabajo se indica que Cx26 no tiene localización membranal en la línea celular PC-3 y por lo tanto no está participando en la comunicación célula-medio (como hemicanal) (**Figura 8**). Además, no hubo diferencias significativas en ninguna de las variables de las células tratadas con CBX (**Figuras 20-24**), sin embargo, como se mencionó antes se observa una tendencia a la disminución de la señal en todos los intervalos de distancia donde se administró CBX.

Tras la administración de inhibidores de Cxs en todos los casos existe una propensión a la disminución en la respuesta global de intensidad de fluorescencia (área bajo la curva) de las células tratadas respecto al control que se observa mejor en distancias intercelulares mayores a 5 μm . Esta tendencia es visible en cada uno de los gráficos correspondientes (FFA, **Figura 12**; 18- β -GRA, **Figura 17**; CBX, **Figura 22**), las pruebas estadísticas nos indican que si bien existe este comportamiento puede no ser significativo; pero permite

corroborar la participación de la Cxs y sus estructuras relacionadas en la propagación de la onda intercelular de Ca^{2+} , sin que estas estructuras sean las únicas involucradas.

Una importante observación de esta sección de resultados es la relación de dos de las variables medidas respecto a la distancia (área bajo la curva y valor máximo de intensidad de fluorescencia). Calì y colaboradores en 2015 describen una relación lineal entre el nivel de Ca^{2+} intracelular y la distancia entre la célula irradiada y las espectadoras. Sus resultados demuestran que la señal de Ca^{2+} aumenta conforme la distancia se hace más larga en un rango de 20 a 100 μm cuando hay espacios intercelulares muy estrechos; en este trabajo se indica algo opuesto, esto es, un decremento en la señal a mayores distancias siempre y cuando exista un espacio intercelular relativamente grande. Esto sugiere que la presencia de uniones comunicantes presentes cuando los espacios intercelulares son mínimos pueden participar en la propagación de la señal de Ca^{2+} y el efecto espectador. El trabajo de Calì demuestra que el bloqueo de uniones comunicantes con FFA disminuye el porcentaje de células muertas.

Se demostró mediante experimentos realizados en ausencia de Ca^{2+} extracelular que la onda de Ca^{2+} continúa generándose como consecuencia de la TFD, estos resultados permiten concluir que la fuente de origen del Ca^{2+} necesario para la generación de ondas intercelulares proviene de almacenes intracelulares, principalmente retículo endoplásmico y en menor proporción de mitocondria y lisosomas, como lo describe Hoorelbeke y colaboradores en 2018. Además esta señal puede ser transmitida a través de mensajeros permeables vía hemicanales, dentro de los más importantes se encuentra el ATP e IP_3 , que se ha demostrado ambos participan en la generación de aumentos de Ca^{2+} intracelular; el ATP a través de la activación tanto de sus receptores ionotrópicos como metabotrópicos; se ha reportado que los receptores a nucleótidos de los tipos P2Y1, P2Y2, P2Y6 y P2Y11 están acoplados a una proteína Gq (Wei et al, 2011), esto quiere decir que su activación estimula la producción de IP_3 a través de la PLC como se mencionó antes. Todos estos han sido localizados en líneas celulares de cáncer de próstata junto con P2X5 y P2X7 (Burnstock, 2010).

Como se ha descrito anteriormente, diversos artículos mencionan un aumento de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular durante y después de la aplicación de TFD, Ben-Hur y

colaboradores utilizando células CHO indican aumentos transitorios en la $[Ca^{2+}]$ intracelular de más del 300%, por otro lado, Agarwal y colaboradores observaron un aumento de cuatro veces la concentración basal de Ca^{2+} intracelular tras la TFD en células de linfoma de ratón de la línea L5178Y, sin embargo, no existen reportes sobre la respuesta del Ca^{2+} intracelular después de la TFD y la participación de las Cxs en la propagación de dicha señal en ninguna línea celular tumoral de próstata.

Los resultados obtenidos mostraron que existe un aumento del nivel de Ca^{2+} intracelular de cuatro a seis veces los niveles basales en las células estimuladas de los experimentos control. Estos resultados concuerdan con varios estudios sobre la generación de aumentos en la $[Ca^{2+}]$ en células de la línea PC-3, en todos estos trabajos la $[Ca^{2+}]$ basal es de 50 ± 2 nM y aumenta hasta 250nM. Yeh y colaboradores en 2017 lograron activar la señal de Ca^{2+} en células PC-3 tras la administración de varias dosis de timol, Wang y su equipo en 2012 lo lograron por la administración del antiinflamatorio celecoxib y Tsai y colaboradores en el mismo año obtuvieron resultados similares al tratar las células con el compuesto de origen natural diindolilmetano. En estos trabajos también se evalúa la viabilidad celular posterior a la generación de un incremento en la $[Ca^{2+}]$ intracelular concluyendo que este ion tiene un papel importante en la supervivencia y no en la muerte de la línea celular tumoral PC-3.

No hay reportes sobre de los mecanismos que apagan la señal de Ca^{2+} posterior a la fotoestimulación, no obstante, se sugiere que se realizan los procesos autorregulados descritos para Ca^{2+} en otros sistemas, ya sea a través de la actividad de atpasas en la membrana celular que permiten el eflujo de Ca^{2+} al espacio extracelular (PMCA), intercambiadores Na^+-Ca^{2+} , la recaptura de Ca^{2+} por el retículo y la mitocondria. Estos mecanismos incluso pueden favorecer que la señal provocada no sea suficiente para provocar muerte celular y activar mecanismos de supervivencia tras daños subletales (Carafoli, 2007).

Un aspecto importante a considerar es la viabilidad celular después de la TFD; con la potencia de estimulación luminosa del protocolo establecido para este trabajo (3.45 mW/cm^2) se pudo generar una onda de Ca^{2+} que se propagó en células espectadoras, sin embargo, como se describe en los resultados, las pruebas de viabilidad no indicaron muerte

celular aún en condiciones control; esto correspondería a estímulos subletales que pueden activar vías de rescate y resistencia celular tumoral (Castano y cols., 2005).

Chang y colaboradores evaluaron la señal de Ca^{2+} en células PC-3 producida por la administración de resveratrol en un rango de concentraciones de 0 a 10 μ M justificando que estas dosis producían muerte celular en líneas de cáncer de mama (MDBA-231 y MCF-7) al evaluar la viabilidad celular de su modelo experimental encontraron resultados contradictorios, pues se promovía la proliferación. Este equipo propone un papel dual del fármaco resveratrol; dosis menores a 10 μ M promueven la supervivencia pero concentraciones más altas favorecen la muerte celular. Un comportamiento similar al producido por los cambios en la concentración de resveratrol lo podrían provocar cambios en la tasa de fluencia del estímulo luminoso, por lo que se sugiere que potencias más altas de estimulación generarían la onda de Ca^{2+} intercelular y promoverían la muerte, suposición consistente con lo que reportan Veenhuizen & Stewart en 1995.

La utilización de AIClPc en la TFD de células PC-3 junto con la fotoestimulación produjeron una respuesta de Ca^{2+} como era esperado, sin embargo, la dosis de luz parece ser insuficiente para producir muerte celular. La TFD *in vivo* involucra más de un tipo celular, diferencias en las condiciones de oxigenación y variaciones en la penetración de la luz. Estudios como el presentado aquí facilitan el diseño de tratamientos curativos, paliativos o preventivos contra el cáncer de próstata y amplían el panorama que se tiene en la actualidad sobre terapias emergentes que pueden complementar los procedimientos utilizados de manera más frecuente.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se ha concluido lo siguiente:

- El FS AICIPc junto con la fotoestimulación es capaz de provocar cambios en el nivel de calcio intracelular, tanto de células irradiadas como de células cercanas.
- Existe una relación inversa entre el aumento del nivel de calcio intracelular y su radio de propagación; con lo estudiado en el presente trabajo se puede concluir que el radio de propagación va más allá de 25 μm .
- La fuente de calcio necesaria para la generación de la señal calcio intercelular durante y posterior a la TFD en la línea celular tumoral PC-3 proviene principalmente de almacenes intracelulares.
- La Cx43 y Cx26 se encuentran presentes en la línea celular tumoral PC-3, mientras la Cx43 participa mediando la propagación de ondas de calcio entre otras acciones aún por dilucidar, otras conexinas como la Cx26 pueden mediar respuestas independientes de uniones comunicantes o hemicanales.
- El bloqueo parcial de uniones comunicantes, pero principalmente de hemicanales en la línea celular PC-3 disminuye la intensidad de la onda de calcio producida por TFD.

Perspectivas

Los resultados indicaron que la señal de Ca^{2+} generada tras la fotoestimulación con los parámetros no fue suficiente para generar muerte celular en la línea PC-3. Existen reportes donde un rango de potencia de 0.275 a 5.5 mW/cm^2 produce diferencias en la viabilidad celular que depende de la fluencia en la TFD con AICIPc, es posible que en células PC-3 este factor pueda tener mayor variabilidad (Veenhuizen & Stewart, 1995). La caracterización de esta variable y la viabilidad celular en líneas de cáncer de próstata aportaría las herramientas suficientes para un mejor diseño terapéutico en individuos con cáncer de próstata.

Para corroborar si el aumento de Ca^{2+} intracelular favorece la muerte o la supervivencia celular ante las distintas dosis de fluencia, se propone administrar un quelante de Ca^{2+} intracelular como BAPTA-AM durante la fotoestimulación y realizar las pruebas de viabilidad celular. Para complementar este ensayo se podrían determinar el cambio preciso de la concentración de Ca^{2+} intracelular durante y después de la estimulación.

Ya se ha corroborado la participación de las Cxs en la propagación de la señal de Ca^{2+} , sin embargo, un análisis más claro podría realizarse con la administración de quelantes de radicales libres lo que definirá mejor la función de las Cxs durante la generación de la onda de Ca^{2+} y eliminaría el efecto producido por las especies reactivas de oxígeno que hasta hoy continúan siendo las protagonistas del efecto de la TFD. Finalmente sería muy enriquecedor caracterizar la localización y cuantificar la expresión de otras Cxs presentes en la línea celular tumoral PC-3 como Cx32, Cx50 y Cx46 con el objetivo de continuar aclarando el papel de las Cxs en el desarrollo de cáncer y promover su aprovechamiento en la terapéutica.

Respecto a un análisis más detallado sobre las vías de señalización que permiten la generación de ondas de Ca^{2+} intercelular se propone el estudio de los receptores purinérgicos en la propagación de Ca^{2+} intercelular, de acuerdo con los resultados sobre la ausencia de Ca^{2+} extracelular la comunicación estaría mediada por otras moléculas permeables a través de hemicanales como ATP e IP_3 .

Para terminar, la caracterización de la respuesta ante la TFD de líneas celulares tumorales permite un mejor diseño de los tratamientos que mejore los pronósticos y la calidad de vida del paciente. Uno de estos aspectos podría ser la utilización de TFD en cáncer de próstata como un tratamiento paliativo en etapas metastásicas o bien, la utilización de TFD en supervivencia activa o prevención cuando se sabe del riesgo de padecer o reincidir en el cáncer de próstata como se estudió en el trabajo de Azzouzi y colaboradores en 2017.

Bibliografía

- Aasen, T., Mesnil, M., Naus, C. C., Lampe, P. D., & Laird, D. W. (2016). Gap junctions and cancer: communicating for 50 years. *Nature Reviews Cancer*, 16(12), 775.
- Abate-Shen, C., & Shen, M. M. (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes & development*, 14(19), 2410-2434.
- Agarwal, M. L., Larkin, H. E., Zaidi, S. I. A., Mukhtar, H., & Oleinick, N. L. (1993). Phospholipase activation triggers apoptosis in photosensitized mouse lymphoma cells. *Cancer research*, 53(24), 5897-5902.
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., ... & Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(4), 250-281.
- Alev, C., Urschel, S., Sonntag, S., Zoidl, G., Fort, A. G., Höher, T., ... & Dermietzel, R. (2008). The neuronal connexin36 interacts with and is phosphorylated by CaMKII in a way similar to CaMKII interaction with glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 20964-20969.
- Allison, R. R., & Sibata, C. H. (2010). Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 7(2), 61-75.
- Attard G, Parker C, Eeles RA, Schröder F, Tomlins SA, Tannock I, Drake CG & de Bono JS. (2016). Prostate cancer. *Lancet*. Jan 2;387(10013):70-82.
- Azzouzi, A. R., Vincendeau, S., Barret, E., Cicco, A., Kleinclauss, F., van der Poel, H. G., ... & Alcaraz, A. (2017). Padeliporfin vascular-targeted photodynamic therapy versus active surveillance in men with low-risk prostate cancer (CLIN1001 PCM301): an open-label, phase 3, randomised controlled trial. *The Lancet Oncology*, 18(2), 181-191.

- Bao, X., Reuss, L., & Altenberg, G. A. (2004). Regulation of purified and reconstituted connexin 43 hemichannels by protein kinase C-mediated phosphorylation of Serine 368. *Journal of Biological Chemistry*.
- Bastien, L., Fourcade, R. O., Makhoul, B., Meria, P., & Desgrandchamps, F. (2012). Hiperplasia benigna de la próstata. *EMC-Urología*, 44(1), 1-14.
- Ben-Hur, E., Dubbelman, T. M. A. R., & Steveninck, J. V. (1991). Pthalocyanine-Induced Photodynamic Changes Of Cytoplasmic Free Calcium In Chinese Hamster Cells. *Photochemistry and photobiology*, 54(2), 163-166.
- Berridge, M. J. (1987). Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annual review of biochemistry*, 56(1), 159-193.
- Bracarda, S., de Cobelli, O., Greco, C., Prayer-Galetti, T., Valdagni, R., Gatta, G. de Braud, F. & Bartsch, G. (2005). Cancer of the prostate. *Critical reviews in oncology/hematology*, 56(3), 379-396.
- Bultynck, G., Sienaert, I., Parys, J., Callewaert, G., De Smedt, H., Boens, N., Dehaen, W. & Missiaen, L. (2003). Pharmacology of inositol trisphosphate receptors. *Pflügers Archiv*, 445(6), 629-642.
- Burnstock, G. (2010). The therapeutic potential of purinergic signalling. *Purinerg Signal*, 6, 2-2.
- Bruzzone, S., Guida, L., Zocchi, E., Franco, L., & De Flora, A. (2001). Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *The FASEB Journal*, 15(1), 10-12.
- Calì, B., Ceolin, S., Ceriani, F., Bortolozzi, M., Agnellini, A. H., Zorzi, V., ... & 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.

Carafoli, E. (2007). The unusual history and unique properties of the calcium signal. *Calcium: A Matter of Life or Death*. Chapter 1. 3-21.

Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1(4), 279-293.

Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2005). Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2(1), 1-23.

Castano, A. P., Mroz, P., & Hamblin, M. R. (2006). Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature reviews. Cancer*, 6(7), 535.

Chang, H. T., Chou, C. T., Chen, I. L., Liang, W. Z., Kuo, D. H., Huang, J. K., Shieh, P., & Jan, C. R. (2013). Mechanisms of resveratrol-induced changes in $[Ca^{2+}]_i$ and cell viability in PC3 human prostate cancer cells. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 33(5), 298-303.

Chang, H. T., Chou, C. T., Chen, I. L., Liang, W. Z., Kuo, D. H., Huang, J. K., Shieh, P. & Jan, C. R. (2013). Mechanisms of resveratrol-induced changes in $[Ca^{2+}]_i$ and cell viability in PC3 human prostate cancer cells. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 33(5), 298-303.

Cotrina, M. L., Lin, J. H. C., Alves-Rodrigues, A., Liu, S., Li, J., Azmi-Ghadimi, H., ... & Nedergaard, M. (1998). Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(26), 15735-15740.

Czyż, J., Szpak, K., & Madeja, Z. (2012). The role of connexins in prostate cancer promotion and progression. *Nature Reviews Urology*, 9(5), 274-282.

Damber JE & Aus G. (2008). Prostate cancer. *Lancet*. May 17;371(9625):1710-21.

Dang, X., Doble, B. W., & Kardami, E. (2003). The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. *Molecular and cellular biochemistry*, 242(1-2), 35-38.

De Pina-Benabou, M. H., Srinivas, M., Spray, D. C., & Scemes, E. (2001). Calmodulin kinase pathway mediates the K⁺-induced increase in Gap junctional communication between mouse spinal cord astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 21(17), 6635-6643.

De Vuyst, E., Decrock, E., Cabooter, L., Dubyak, G. R., Naus, C. C., Evans, W. H., & Leybaert, L. (2006). Intracellular calcium changes trigger connexin 32 hemichannel opening. *The EMBO journal*, 25(1), 34-44.

Eskandari, S., Zampighi, G. A., Leung, D. W., Wright, E. M., & Loo, D. D. F. (2002). Inhibition of gap junction hemichannels by chloride channel blockers. *Journal of Membrane Biology*, 185(2), 93-102.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D & Bray. (2013). F. GLOBOCAN 2012 v1.0. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>, acceso: 25/julio/2018.

Fine, S. W., & Reuter, V. E. (2012). Anatomy of the prostate revisited: implications for prostate biopsy and zonal origins of prostate cancer. *Histopathology*, 60(1), 142-152.

Fresnadillo, D. G. (2005). Fotosensibilización y el sensibilizador: síntesis, propiedades y limitaciones. *Solar Safe Water*, 14, 242-257.

Goldberg, G. S., Moreno, A. P., Bechberger, J. F., Hearn, S. S., Shivers, R. R., MacPhee, D. J., ... & Naus, C. C. (1996). Evidence that disruption of connexon particle arrangements in gap junction plaques is associated with inhibition of gap junctional communication by a glycyrrhetic acid derivative. *Experimental cell research*, 222(1), 48-53.

Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., & Krizanova, O. (2015). Calcium and ROS: a mutual interplay. *Redox biology*, 6, 260-271.

Guan, X., Wilson, S., Schlender, K. K., & Ruch, R. J. (1996). Gap-junction disassembly and connexin 43 dephosphorylation induced by 18 β -glycyrrhetic acid. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 16(3), 157-164.

Hajdu, S. I. (2004). Greco-Roman thought about cancer. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 100(10), 2048-2051

Hajdu, S. I. (2011). A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*, 117(5), 1097-1102.

Hammerich, K. H., Ayala, G. E., & Wheeler, T. M. (2009). Anatomy of the prostate gland and surgical pathology of prostate cancer. *Cambridge University, Cambridge*, 1-10.

Hanson, C. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2004). Cell signalling: IP₃ receptors channel calcium into cell death. *Current Biology*, 14(21), R933-R935.

Hoorelbeke, D., Decrock, E., Van Haver, V., De Bock, M., & Leybaert, L. (2018). Calcium, a pivotal player in photodynamic therapy?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*.

INEGI (2017). Estadísticas de salud en establecimientos particulares. Disponible en: http://www.inegi.org.mx/Sistemas/Olap/Proyectos/bd/continuas/salud/MobHospital.asp?s=est&c=33422&proy=esep_mobhospit

Juszczak, G. R., & Swiergiel, A. H. (2009). Properties of gap junction blockers and their behavioural, cognitive and electrophysiological effects: animal and human studies. *Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry*, 33(2), 181-198.

Kamermans, M., Fahrenfort, I., Schultz, K., Janssen-Bienhold, U., Sjoerdsma, T., & Weiler, R. (2001). Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina. *Science*, 292(5519), 1178-1180.

Kanczuga-Koda, L., Sulkowski, S., Koda, M., Skrzydlewska, E., & Sulkowska, M. (2005). Connexin 26 correlates with Bcl-xL and Bax proteins expression in colorectal cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, 11(10), 1544.

Karp, G., & Patton, J. G. (2008). Cell and molecular biology. John Wiley. 626-629.

Koval, M., Molina, S. A., & Burt, J. M. (2014). Mix and match: investigating heteromeric and heterotypic gap junction channels in model systems and native tissues. *FEBS letters*, 588(8), 1193-1204.

Krutovskikh, V. A., Troyanovsky, S. M., Piccoli, C., Tsuda, H., Asamoto, M., & Yamasaki, H. (2000). Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin43 on tumor cell growth in vivo. *Oncogene*, 19(4), 505.

Kübler, A. C. (2005). Photodynamic therapy. *Medical Laser Application*, 20(1), 37-45.

La Rovere, R. M., Roest, G., Bultynck, G., & Parys, J. B. (2016). Intracellular Ca²⁺ signaling and Ca²⁺ microdomains in the control of cell survival, apoptosis and autophagy. *Cell calcium*. 60(2), 74-87.

Laird, D. W. (2006). Life cycle of connexins in health and disease. *Biochemical Journal*, 394(3), 527-543.

Laniado, M. E., Fraser, S. P., & Djamgoz, M. (2001). Voltage-gated K⁺ channel activity in human prostate cancer cell lines of markedly different metastatic potential: Distinguishing characteristics of PC-3 and LNCaP cells. *The Prostate*, 46(4), 262-274.

Leybaert, L., & Sanderson, M. J. (2012). Intercellular Ca²⁺ waves: mechanisms and function. *Physiological reviews*, 92(3), 1359-1392.

- Leybaert, L., Lampe, P. D., Dhein, S., Kwak, B. R., Ferdinandy, P., Beyer, E. C., ... & Schulz, R. (2017). Connexins in cardiovascular and neurovascular health and disease: Pharmacological implications. *Pharmacological reviews*, *69*(4), 396-478.
- Li, H., Liu, T. F., Lazrak, A., Peracchia, C., Goldberg, G. S., Lampe, P. D., & Johnson, R. G. (1996). Properties and regulation of gap junctional hemichannels in the plasma membranes of cultured cells. *The Journal of cell biology*, *134*(4), 1019-1030.
- Liu, J., & Wang, Z. (2015). Increased oxidative stress as a selective anticancer therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 294303-294303.
- Macdonald, I. J., & Dougherty, T. J. (2001). Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, *5*(02), 105-129.
- McNeal, J. E. (1968). Regional morphology and pathology of the prostate. *American journal of clinical pathology*, *49*(3), 347-357.
- Mehta, P. P., Perez-Stable, C., Nadji, M., Mian, M., Asotra, K., & Roos, B. A. (1999). Suppression of human prostate cancer cell growth by forced expression of connexin genes. *Developmental genetics*, *24*(1-2), 91-110.
- Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B., & Hamblin, M. R. (2011). Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*, *3*(2), 2516-2539.
- Omori, Y., Krutovskikh, V., Mironov, N., Tsuda, H., & Yamasaki, H. (1996). Cx 32 gene mutation in a chemically induced rat liver tumour. *Carcinogenesis*, *17*(9), 2077-2080.
- Papac, R. J. (2001). Origins of cancer therapy. *The Yale journal of biology and medicine*, *74*(6), 391.
- Parkin, D. M., Whelan, S. L., Ferlay, J., Raymond, L., & Young, J. (1997). Cancer incidence in five continents VII. International agency for research on cancer, Lyon, France. *IARC Sci Pub*, (143).

- Plotkin, L. I., Manolagas, S. C., & Bellido, T. (2002). Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 8648-8657.
- Postiglione, I., Barra, F., Aloj, S. M., & Palumbo, G. (2016). Photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid and DNA damage: unravelling roles of p53 and ABCG2. *Cell Proliferation*, 49(4), 523-538.
- Resnick, M. I., & Thompson, I. M. (2000). *Advanced therapy of prostate disease* (Vol. 1). PMPH-USA. Chapter 14. 92-117.
- Rozental, R., Srinivas, M., & Spray, D. C. (2001). How to close a gap junction channel. *Connexin Methods and Protocols*. Humana Press. (pp. 447-476).
- Sáez, J. C., Retamal, M. A., Basilio, D., Bukauskas, F. F., & Bennett, M. V. (2005). Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1711(2), 215-224.
- Sanabria, L. M., Rodríguez, M. E., Cogno, I. S., Vittar, N. B. R., Pansa, M. F., Lamberti, M. J., & Rivarola, V. A. (2013). Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1835(1), 36-45.
- Selman, S. H. (2011). The McNeal prostate: a review. *Urology*, 78(6), 1224-1228.
- Shao, C., Lyng, F. M., Folkard, M., & Prise, K. M. (2006). Calcium fluxes modulate the radiation-induced bystander responses in targeted glioma and fibroblast cells. *Radiation research*, 166(3), 479-487.
- Sharman, W. M., Allen, C. M., & Van Lier, J. E. (1999). Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug discovery today*, 4(11), 507-517.
- Srinivas, M., & Spray, D. C. (2003). Closure of gap junction channels by arylaminobenzoates. *Molecular pharmacology*, 63(6), 1389-1397.

Stewart, B. W., & Wild, C. P. (2014). World Cancer Report 2014. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. *World Health Organization*, 630.

Stout, C. E., Costantin, J. L., Naus, C. C., & Charles, A. C. (2002). Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *Journal of Biological Chemistry*, 277(12), 10482-10488.

Sudhakar, A. (2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of cancer science & therapy*, 1(2), 1.

Tajiri, H., Hayakawa, A., Matsumoto, Y., Yokoyama, I., & Yoshida, S. (1998). Changes in intracellular Ca²⁺ concentrations related to PDT-induced apoptosis in photosensitized human cancer cells. *Cancer letters*, 128(2), 205-210.

Tate, A. W., Lung, T., Radhakrishnan, A., Lim, S. D., Lin, X., & Edlund, M. (2006). Changes in gap junctional connexin isoforms during prostate cancer progression. *The Prostate*, 66(1), 19-31.

Tsai, J. Y., Chou, C. T., Liu, S. I., Liang, W. Z., Kuo, C. C., Liao, W. C., ... & Jan, C. R. (2012). Effect of diindolylmethane on Ca²⁺ homeostasis and viability in PC3 human prostate cancer cells. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 32(5), 271-278.

Veenhuizen, R. B., & Stewart, F. A. (1995). The importance of fluence rate in photodynamic therapy: is there a parallel with ionizing radiation dose-rate effects?. *Radiotherapy and Oncology*, 37(2), 131-135.

Wang, J. L., Lin, K. L., Chou, C. T., Kuo, C. C., Cheng, J. S., Hsu, S. S., ... & Chen, I. S. (2012). Effect of celecoxib on Ca²⁺ handling and viability in human prostate cancer cells (PC3). *Drug and chemical toxicology*, 35(4), 456-462.

Weber, P. A., Chang, H. C., Spaeth, K. E., Nitsche, J. M., & Nicholson, B. J. (2004). The permeability of gap junction channels to probes of different size is dependent on connexin composition and permeant-pore affinities. *Biophysical journal*, 87(2), 958-973.

- Wei, Q., Costanzi, S., Liu, Q. Z., Gao, Z. G., & Jacobson, K. A. (2011). Activation of the P2Y₁ receptor induces apoptosis and inhibits proliferation of prostate cancer cells. *Biochemical pharmacology*, 82(4), 418-425.
- Weissman, T. A., Riquelme, P. A., Ivic, L., Flint, A. C., & Kriegstein, A. R. (2004). Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron*, 43(5), 647-661.
- Yeh, J. H., Chou, C. T., Chen, I. S., Lu, T., Lin, K. L., Yu, C. C., ... & Chang, W. T. (2017). Effect of Thymol on Ca²⁺ Homeostasis and Viability in PC3 Human Prostate Cancer Cells. *The Chinese journal of physiology*, 60(1), 32-40.
- Zaak, D., Sroka, R., Hoppner, M., & Khoder, W. (2003). Photodynamic therapy by means of 5-ALA induced PPIX in human prostate cancer—preliminary results. *Medical Laser Application*, 18(1), 91.
- Zampighi, G. A., Loo, D. D., Kreman, M., Eskandari, S., & Wright, E. M. (1999). Functional and morphological correlates of connexin50 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *The Journal of general physiology*, 113(4), 507-524.
- Zhang, A., Hitomi, M., Bar-Shain, N., Dalimov, Z., Ellis, L., Velpula, K. K., ... & Lathia, J. D. (2015). Connexin 43 expression is associated with increased malignancy in prostate cancer cell lines and functions to promote migration. *Oncotarget*, 6(13), 11640.
- Zhou, J. Z., & Jiang, J. X. (2014). Gap junction and hemichannel-independent actions of connexins on cell and tissue functions—An update. *FEBS letters*, 588(8), 1186-1192.