



BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA  
DE PUEBLA



Instituto de Fisiología

Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento de Farmacia

**“Estudio del efecto de la fotoestimulación sobre el nivel del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en células de cáncer de mama y la participación de la comunicación intercelular mediada por conexinas en su propagación”**

Para obtener el título de:  
Licenciado en Químico Farmacobiólogo

Presenta:  
Araceli Andrade Zarate

Director de Tesis  
Dr. Fabián Galindo Ramírez

Asesor Interno:  
Dr. Rubén Antonio Vázquez Roque

Comité Revisor:  
Dr. Alfonso Daniel Díaz Fonseca  
Dra. María de Guadalupe Muñoz Arenas  
Dr. José Everardo Avelino Cruz

Puebla, Puebla, 22 de Octubre del 2018

*Al ser más especial de mi vida,  
mi madre.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Debo agradecer de manera especial y sincera al Dr. Fabian Galindo Ramírez por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas, ha sido un aporte invaluable. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Rubén Antonio Vázquez Roque por su colaboración dedicada a este trabajo. A los miembros del jurado el Dr. Alfonso Daniel Diaz Fonseca, a la Dra. María de Guadalupe Muñoz Arenas y al Dr. José Everardo Avelino Cruz por sus aportaciones y tiempo dedicado a este trabajo.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento al Ing. Coris Alin Vera del Razo por su importante aporte y participación en el desarrollo de esta tesis. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad y paciencia.

## Índice

INTRODUCCION .....	4
Estadios del cáncer de mama .....	5
Terapias antitumorales .....	7
Terapia fotodinámica .....	7
Línea celular MCF-7.....	10
Homeostasis de calcio y cáncer .....	12
Conexinas y gap junctions .....	15
Conexina 43 .....	20
OBJETIVOS.....	22
METODOLOGIA.....	22
Cultivo celular .....	22
Detección del tipo de muerte celular por anexina V y Yoduro de Propídio.....	22
Determinación de la propagación de la onda de $Ca^{2+}$ generada por la terapia fotodinámica. ...	23
Determinación de la participación de las conexinas en la propagación de la señal mediada por $Ca^{2+}$ generada por la terapia fotodinámica. ....	24
Determinación de la presencia de la conexina 43 mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta.....	24
Análisis estadístico.....	25
RESULTADOS.....	26
DISCUSION.....	38
CONCLUSIONES.....	45
REFERENCIAS.....	46

## INTRODUCCION

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células que puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo (1). Entre los indicadores más utilizados para conocer la problemática del cáncer se encuentra la incidencia y mortalidad que provoca. Lo referente a la incidencia se expresa como el número absoluto de casos nuevos que ocurren en una población definida por año o bien el número de casos nuevos por cada 100,000 personas al año, estos datos proporcionan una aproximación del riesgo de desarrollar cáncer y en la mayoría de los casos este punto se ve ligado a la edad. La mortalidad se refiere al número absoluto de personas que mueren a causa de cáncer por año o de igual manera puede expresarse como el número de muertes por cáncer por cada 100,000 personas. Cabe mencionar que la mortalidad se ve influenciada por la incidencia, así como por la naturaleza de la enfermedad y la eficacia del tratamiento (2).

Actualmente el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, en 2012 se registraron 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes debido a esta causa (1). De acuerdo con GLOBOCAN en ese mismo año el tipo de cáncer con mayor tasa de mortalidad en la población de ambos sexos fue el de pulmón, en el segundo sitio se encuentra el cáncer de hígado mientras que el cáncer de mama se ubica en el quinto lugar a nivel mundial. Sin embargo los de mayor incidencia son el cáncer de pulmón, el cáncer de mama y el cáncer de colon (3).

Esto es de gran importancia debido a que en la población femenina el tipo de cáncer más común a nivel mundial es el de mama. En 2012 se diagnosticaron 1,67 millones de nuevos casos (25% de todos los casos de cáncer incidente). Además, en todos los tipos de cáncer presentados en mujeres este se ha convertido en la principal causa de muerte (4,5). Solo en América Latina se han diagnosticado 408, 200 casos de cáncer de mama y 92, 000 muertes por esta

causa y se estima que estas cifras incrementarían un 46 % para 2030 (6). La mayor incidencia de cáncer de mama en la región se presenta en Bahamas, seguido de Uruguay y Estados Unidos, mientras que la mayor tasa de mortalidad se presenta en Bahamas, Trinidad y Tobago y Uruguay (7).

En México desde 2006 el cáncer de mama cobra más vidas al año que el cáncer cervicouterino, teniendo como referencia que en 1980 la probabilidad de morir a causa de cáncer cervicouterino era dos veces mayor que el de mama, esto se observó en 2008 donde las mujeres mexicanas entre 30 y 60 años tenían un mayor riesgo de morir por esta causa, además se estima que la edad de ocurrencia se da una década antes que en las mujeres de USA y Europa pues durante el periodo de 2000-2006 el 50 % de los casos reportados ocurrieron en personas menores de 50 años. Sin embargo, anteriormente el cáncer de mama era considerado una enfermedad de mayor frecuencia en mujeres con altos ingresos, pero hoy en día se sabe que en realidad es un problema que afecta a las mujeres de todas las clases sociales (8). En 2012 en la población femenina mexicana se han presentado 20, 444 nuevos casos, convirtiéndose en la principal causa de muerte, mientras que el cáncer cervicouterino se sitúa en el segundo sitio como causa de muerte (9,10).

### Estadios del cáncer de mama

El avance en la comprensión de la epidemiología, la biología y la base molecular del cáncer de mama, ha permitido saber que es una enfermedad heterogénea que se puede dividir en varios subtipos distintos, por lo tanto, la clasificación adecuada de los tumores es importante para estudiar la etiología del cáncer de mama, así como para predecir el curso clínico y tomar decisiones relacionadas con el tratamiento de este padecimiento. La clasificación de los subtipos de cáncer de mama se realiza basándose en características tales como: estadio, grado, histología y perfil genético del tumor, pero también se pueden incluir características fenotípicas o genotípicas del paciente. Es importante mencionar que los sistemas de clasificación varían, por lo que la distinción entre los subtipos de la enfermedad no solo puede traducirse en diferencias en el resultado clínico,

sino que también implican diferencias en la etiología tumoral. Por lo que la etapa y el grado del tumor son de uso general por los patólogos para describir la severidad y la agresividad de cánceres de mama. Los dos atributos son medidas informativas de forma independiente en la predicción del curso de la enfermedad y son utilizados como guía en el tratamiento del cáncer de mama, del mismo modo el tipo histológico del tumor es útil para la caracterización de la biología tumoral (11).

### Estadios del Cáncer de Mama

Etapa 0	Tis	N0	M0
Etapa IA	T1*	N0	M0
Etapa IB	T0	N1mi	M0
	T1*	N1mi	M0
Etapa IIA	T0	N1**	M0
	T1*	N1**	M0
	T2	N0	M0
Etapa IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Etapa IIIA	T0	N2	M0
	T1*	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Etapa IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Etapa IIIC	Any T	N3	M0
Etapa IV	Any T	Any N	M1

Tabla 1. Estadificación del cáncer de mama. Tis: *carcinoma in situ*; N1mi: *micrometástasis*; Any T: *ningún tamaño reportado*; Any N: *ninguna extensión a ganglios reportada* (33).

En muchos hospitales y centros médicos se usa el sistema TNM de estadificación como método principal en sus informes de cáncer, el sistema TNM se basa en lo siguiente: la letra **T** se refiere al tamaño y extensión del tumor principal (tumor primario), la **N** se refiere a la extensión de cáncer que se ha diseminado a los ganglios o nódulos linfáticos cercanos y la **M** se refiere a si el cáncer ha tenido metástasis. Estas letras pueden ser seguidas de números los cuales brindaran más información; en el caso de la letra T puede llevar números de 1-4 donde mientras más grande sea el numero indica que mayor es el tamaño del tumor principal, pero también puede llevar un 0 o una X, donde el 0 indica que no puede encontrarse el tumor primario y la X señala que no se puede medir el tumor; en el caso de NX indica que no puede medirse la presencia de células

tumorales en los ganglios linfáticos cercanos, en N0 no hay cáncer en los ganglios linfáticos mientras que en N1-N3 se refiere al número y ubicación de los ganglios linfáticos afectados y cuanto más grande es el número más son los ganglios afectados, finalmente la MX señala que no puede medirse la metástasis y M0 indica que el cáncer no se ha diseminado a otras partes mientras que M1 se refiere a que el cáncer se ha diseminado. En la siguiente tabla se muestra la clasificación del cáncer de mama según American Joint Committee on Cancer (Tabla 1) (12). Sin embargo, una detección temprana del cáncer puede ayudar a emplear un tratamiento adecuado cuyo objetivo es curar o prolongar la vida de los pacientes y a quienes sobreviven a la enfermedad garantizar una mejor calidad de vida (1).

### Terapias antitumorales

Existen diferentes maneras para tratar el cáncer y se pueden dividir en tratamientos locales y sistémicos; dentro de los locales se tiene a la cirugía y radioterapia que consisten en atacar directamente al tumor sin afectar otra parte del cuerpo, mientras que los sistémicos son aquellos en los que se administran medicamentos vía oral o directamente al torrente sanguíneo. Se consideran sistémicos porque pueden alcanzar a las células cancerosas en cualquier parte del cuerpo, en este grupo se encuentra la quimioterapia, terapia hormonal e inmunoterapia (13). Así mismo el tratamiento del cáncer es altamente especializado y requiere la participación de varias disciplinas. Por lo que al tratar el padecimiento se debe estar familiarizado con la historia natural del cáncer y con los principios y funciones potenciales de la cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y otras nuevas modalidades (14). Una de las nuevas modalidades emergentes es la terapia fotodinámica (TFD) que se ha utilizado para tratar varios tumores sólidos, incluyendo tumores en etapas tempranas y como método paliativo en cánceres avanzados, además de que esta terapia se puede combinar con otras (15).

### Terapia fotodinámica

Este último tratamiento es poco común, su desarrollo inició desde 1900 cuando un estudiante de medicina Alemán descubrió el efecto fotodinámico de la acridina y la



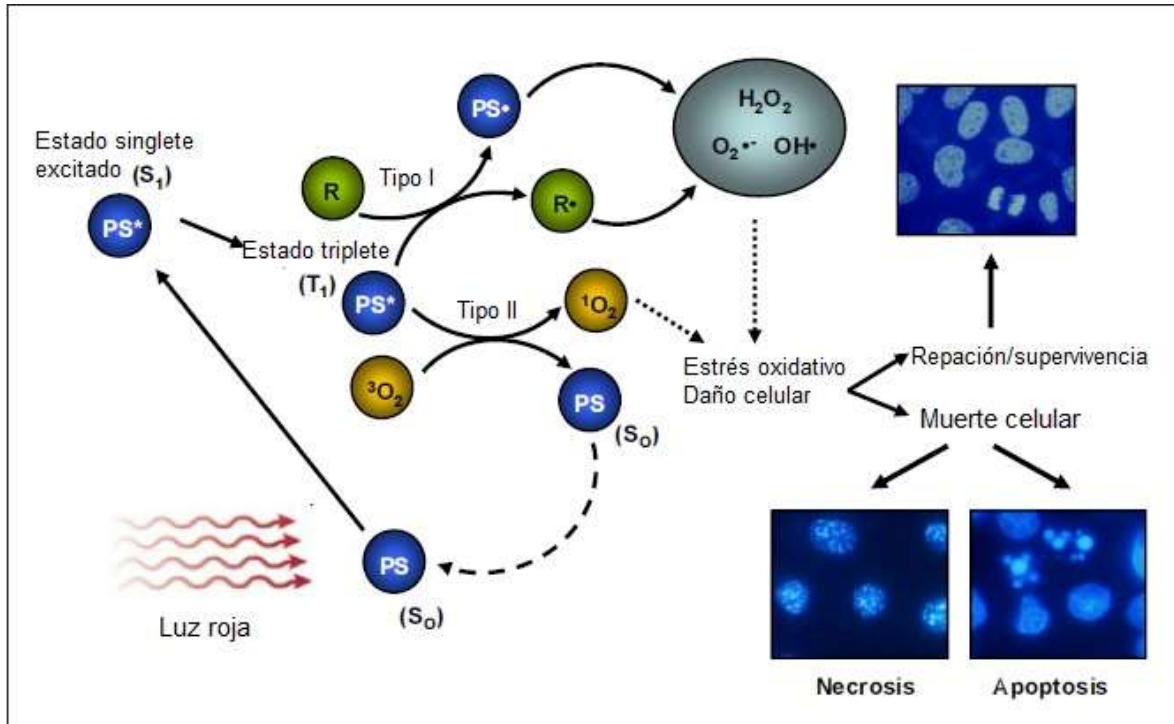
luz sobre los paramecios (16), por otra parte la era moderna de la TFD inicia en 1960 con los estudios de Lipson y Schwartz en la clínica Mayo quienes observaron que la inyección de preparaciones de hematoporfirina conducía a la fluorescencia de lesiones neoplásicas que se podían visualizar durante la cirugía (17).

El principio de la TFD consiste en administrar un compuesto denominado fotosensibilizador (FS) y aplicar una onda de luz dentro del rango de luz visible para generar una reacción fotoquímica que pueda producir especies reactivas de oxígeno (ERO), tales como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), entre otros (Figura 1). Esta producción de ERO después de la TFD se piensa que es la responsable de la destrucción de las células tumorales mediante múltiples mecanismos, entre los cuales se encuentra la apoptosis y necrosis celular, los cuales dependerán del FS utilizados, la dosis y el tipo de célula (18,19). Se sabe que el daño foto-oxidativo en moléculas clave asociadas a la membrana celular, así como estructuras intracelulares tales como los ácidos nucleicos son las responsables de desencadenar una serie de eventos para producir el daño celular (20).

El balance entre la necrosis y apoptosis después de la TFD depende de varios factores como la fluencia de la luz (que se refiere a la energía lumínica aplicada por unidad de área), la localización del FS, la tasa de fluencia (la velocidad a la que se suministra la fluencia de luz por unidad de área), la concentración de oxígeno y el tipo de célula (18).

Para un mejor efecto de la TFD se debe tener en cuenta las características ideales de un FS que presente una mínima toxicidad, sea selectivo al tejido y tenga mínimos efectos secundarios. Además, en comparación con el tejido normal, los tumores pueden retener preferentemente una mayor concentración del fotosensibilizador cuando éste es administrado por vía intravenosa. Para que pueda ser activado es necesario aplicar la dosis de luz ideal para causar la muerte celular en el tejido diana sin dañar el tejido sano, sin embargo, aún no es posible estandarizar una dosis de luz óptima. Actualmente los FSs utilizados tienen una

fuente de absorción de luz en la región roja del espectro de luz visible, puesto que es la más apropiada para penetrar en los tejidos (20).



**Figura 1. Principios de la terapia fotodinámica.** La TFD requiere de tres elementos: un FS, luz y oxígeno. Cuando se expone a longitudes de onda específicas de luz, el FS en su estado fundamental ( $S_0$ ) se convierte en un estado activado ( $S_1$ ), que es seguido por el paso a un estado excitado triplete ( $T_1$ ). La transferencia de energía a sustratos biológicos y oxígeno molecular a través de reacciones de tipo I y II generan ERO ( $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH\cdot$ ). Produce daño celular, que puede ser reparado o puede matar células tumorales principalmente por necrosis o apoptosis (34).

En el grupo de FS se tienen a los de primera generación que son derivados de hematoporfirina como Photofrin que presentan una buena eficacia para atacar los tumores. Los de segunda generación especialmente diseñados para tener mínimos efectos secundarios que sus predecesores, se tiene a 5-aminolevulinico (ALA) y ftalocianinas. Estas últimas han sido empleadas recientemente en el tratamiento para cáncer de mama en líneas celulares que son expuestas a la TFD y han mostrado un buen potencial cuando se suministró a través de nanoesferas de albumina en un modelo murino, además también han sido utilizados otros FSs (Tabla 2) (20).

### Línea celular MCF-7

Una de las líneas celulares más utilizada para la investigación de cáncer de mama es la MCF-7, cuya historia se remonta a la vida de Helen Marion (Hermana Catherine Frances) quien nació en 1901 y años más tarde asistiría al convento del Corazón Inmaculado de María en Monroe, Michigan. En 1963 fue sometida a una mastectomía en su seno derecho por un tumor benigno y cuatro años después se vería obligada a una mastectomía radical por un adenocarcinoma en su seno izquierdo. Sin embargo, el hecho de que desarrollara cáncer de mama no era sorprendente debido a los informes de Bernardino Ramazzini quien decía que “los tumores de mama se encuentran más a menudo en monjas que en cualquier otra mujer”. Posteriormente esto fue reforzado en la literatura epidemiológica indicando que las mujeres nulíparas están en mayor riesgo de padecer cáncer de mama (21).

En 1970 el investigador Herbert D. Soule de la Fundación de Cáncer en Michigan, trató de desarrollar una línea celular a partir de una escisión de un nódulo de la pared torácica y de un derrame pleural, debido a la enfermedad metastásica en la pleura y en la pared torácica que desarrolló Helen Marion. En esa fecha muchos laboratorios habían documentado las dificultades técnicas para generar cultivos estables de líneas celulares de cáncer, tales como el crecimiento excesivo de fibroblastos además de intentos inútiles utilizando diferentes nutrientes y sustratos. Para Soule el desarrollo de la línea celular fue relativamente estándar y los cultivos celulares derivados de los nódulos de la pared torácica pronto fueron cubiertos por fibroblastos y descartados. Sin embargo, las células del derrame pleural crecieron inicialmente en suspensión y finalmente formaron una monocapa sobre plástico que creció como un cultivo continuo. Así, finalmente la línea celular resultante se llamó MCF-7, debido a la Fundación de Cáncer de Michigan y al séptimo intento de Soule en la generación de una línea celular de cáncer (21).

La importancia de la línea celular MCF-7 para la investigación del cáncer de mama es por la fidelidad a muchos aspectos con la enfermedad en el contexto clínico,

principalmente en el manejo de mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama con receptores hormonales positivos.

FS	Tratamiento (longitud de onda nm)	Tiempo para TFD después de la administración de la dosis	Estudio	Propiedades/ usos
Ftalocianina de zinc	675	12 h	Estudio in vitro sobre líneas celulares de cáncer de mama murino	2ª generación de FS Administración intravenosa Insoluble en agua
SnEt2 purlytin	660	24 h	Uso clínico para el tratamiento de metástasis de la piel incluyendo cáncer de mama	2ª generación de FS Administración intravenosa Usado en fase II de tratamientos clínicos
Motexafin lutetium	720	3-24h	Uso clínico para el tratamiento de metástasis cutáneas, incluyendo cáncer de mama	2ª generación de FS Agente soluble en agua Administración intravenosa Baja incidencia de fotosensibilidad
Photofrin	630	48 h	Ensayo clínico para el tratamiento de las metástasis cutáneas del cáncer de mama	1ª generación de FS Administración intravenosa
Mono-L-aspartil chlorin	664-667	4 h	Ensayo clínico para el tratamiento de las metástasis cutáneas del cáncer de mama	2ª generación de FS Administración vía intravenosa
Meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin (m-THPC)	652	48-96h	Tratamiento en serie de pacientes de metástasis de cáncer de mama	2ª generación de FS Administración intravenosa
Verteporfin	690	1 h	Ensayo clínico para el tratamiento en cáncer de mama primario usado en modelos murinos de cáncer de mama	2ª generación de FS Administración intravenosa Baja incidencia de fotosensibilidad

**Tabla 2. Fotosensibilizadores.** FSs utilizados en el tratamiento de cáncer de mama (35).

Por ello una de las variables más importantes que ha aportado la línea celular MCF-7 a la investigación del cáncer de mama ha sido su utilidad para el estudio

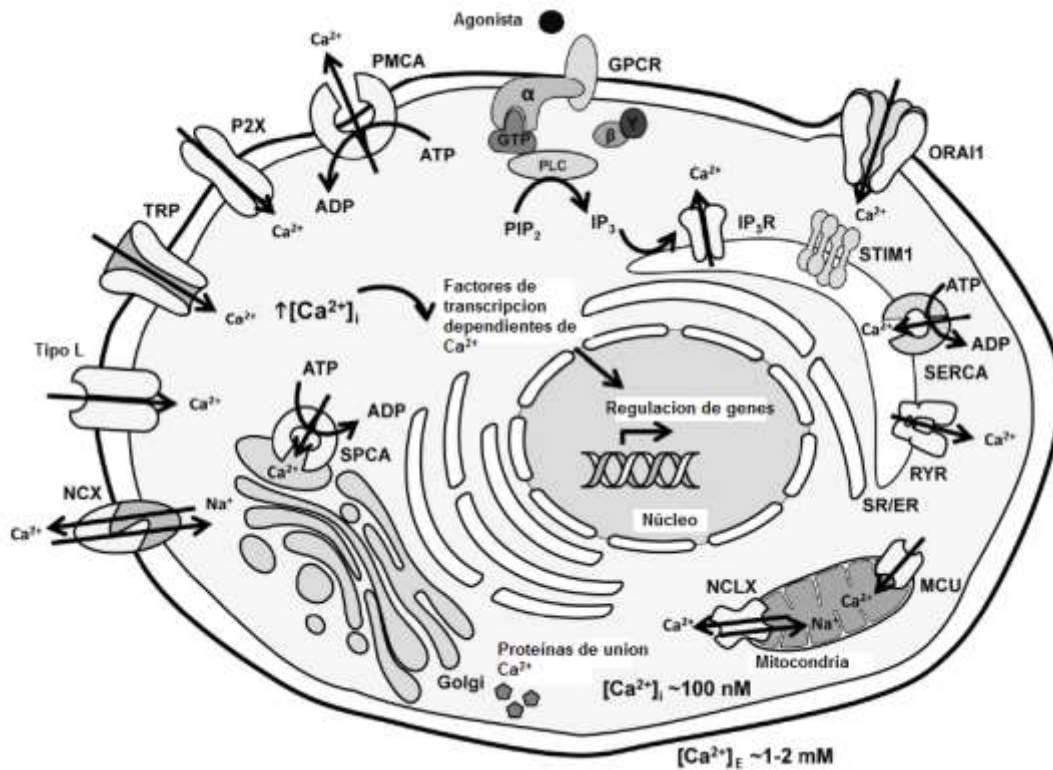
del receptor de estrógeno alfa (ER) imitando la mayoría de los cánceres de mama humanos invasivos que expresen ER. Cabe mencionar que la expresión del ER en las líneas celulares es especialmente difícil, por lo que ha dado lugar a la generación de más líneas celulares con ER-negativas que ER-positivas (21).

### Homeostasis de calcio y cáncer

Uno de los factores más importantes en la fisiología celular es debido a la participación del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que es el mineral más abundante en el cuerpo humano en una cantidad aproximadamente de 1 kilogramo y con más del 99% depositado en huesos en forma de fosfato de calcio. Está involucrado en un gran número de procesos para mantener la homeostasis celular (Figura 2) (22). El ion  $\text{Ca}^{2+}$  es un segundo mensajero en varias vías de señalización como la de muerte y proliferación celular (23). La regulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  es esencial para el funcionamiento adecuado, como lo demuestra el papel de los cambios de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico libre en procesos tales como la proliferación celular, transcripción de genes y la muerte celular. Normalmente las células en reposo tienen una concentración de calcio intracelular  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de aproximadamente 100 nM, mientras que las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular son más altas, entre 1 y 2 mM. Las bombas, los canales y las proteínas de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  son utilizados por las células para mantener la homeostasis celular y han sido denominadas herramientas moleculares para la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  (24).

Los cambios de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico libre implican aumentos globales que pueden ser transitorios o sostenidos, y también altamente localizados o bien provocar ondas u oscilaciones (24); con respecto a las ondas intercelulares de calcio (OIC) se sabe que consisten en incrementos de la concentración citoplasmática de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que se comunican entre las células y aparecen como ondas que se extienden radialmente desde una célula iniciadora o activadora. Se ha sugerido que, en las OIC, es la membrana celular la que limita tanto la difusión de  $\text{IP}_3$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . En consecuencia, la transmisión de una onda de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula vecina debe producirse por un mecanismo modificado o alternativo, se proponen dos escenarios para este proceso: 1) el mecanismo caracterizado originalmente para la comunicación

célula-célula se produce a través de las gap junctions y 2) es el mecanismo en el que se produce una señalización parácrina con un mensajero extracelular (25).



**Figura 2. Representación de las principales vías de influjo/liberación y recaptura de  $Ca^{2+}$  implicadas en la regulación de la homeostasis de  $[Ca^{2+}]_i$  y sus proteínas en células de mamíferos.** Las principales vías de afluencia de  $Ca^{2+}$  están mediadas por la familia de receptores TRP, canales permeables a  $Ca^{2+}$ , canales de  $Ca^{2+}$  controlados por voltaje (Tipo L), receptores purinérgicos (P2X) y los componentes Orai1 y STIM1. La activación de receptores acoplados a proteínas G localizadas en la membrana plasmática conducen a la generación de inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y posterior estimulación de los receptores  $IP_3$  ( $IP_3R$ ) localizados en el retículo endoplásmico (RE), resultando en la liberación de  $Ca^{2+}$ . Los receptores de rianodina en el RE y el intercambiador de  $Na^+/Ca^{2+}$  mitocondrial (NCLX) también regulan el  $Ca^{2+}$  en organelos. La señalización de  $Ca^{2+}$  también regula diversos factores de transcripción dependientes de  $Ca^{2+}$  y proteínas de unión a  $Ca^{2+}$  (37).

Como se sabe, las gap junctions proporcionan una vía de difusión directa entre las células (conectan el citoplasma de dos células adyacentes), se cree que estas uniones son fácilmente permeables a  $Ca^{2+}$  e  $IP_3$ , sin embargo, la permeabilidad de las gap junctions para  $IP_3$  difiere con el tipo de conexina. La idea de que las ondas de  $Ca^{2+}$  pueden utilizar gap junctions fue sugerido inicialmente por la cinética de la propagación de las mismas OIC en los límites celulares de células epiteliales de vías respiratorias, donde se observaba que al llegar a los límites

celulares, estas ondas se retrasaban por periodos de hasta 1 segundo y que aquellas ondas que iniciaron posteriormente en células adyacentes se extendieron desde sitios de la membrana localizados en contacto con la célula iniciadora, para comprobar esto se examinó la propagación de ondas cerca de discontinuidades en el epitelio, pero en estas células las ondas mecánicamente estimuladas no se comunicaban a través de estos espacios (25).

Las OIC median la transmisión de información de un sitio local a un área global, estas señales de  $\text{Ca}^{2+}$  a múltiples células circundantes proporciona el potencial para coordinar y sincronizar la función de un gran grupo de células (25). Los cambios provocados pueden ser “descodificados” por la célula lo cual permite que la señal omnipresente de  $\text{Ca}^{2+}$  regule de forma específica los procesos celulares. Sin embargo, la complejidad en la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  significa que la desregulación de la misma puede ser una característica de ciertos estados patológicos, incluyendo el cáncer. Por ello gran parte de la investigación sobre la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  en el cáncer se centra en determinar los cambios en los niveles de expresión de las proteínas responsables de la regulación citoplasmática de la concentración libre de  $\text{Ca}^{2+}$ . Es importante mencionar que en el contexto del cáncer comparado con otras enfermedades hay una escasez de información respecto a los cambios de la señalización emitida por el  $\text{Ca}^{2+}$  que se produce en células cancerosas en comparación con las células no cancerosas y elucidar esa información ayudaría a la comprensión de los mecanismos subyacentes a su progresión. Además, algunos estudios han identificado canales y bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  específicos como dianas de fármacos para diversos tipos de cáncer incluyendo el de ovario, cerebro, próstata, mama y esófago. La señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  podría ser alterada en la progresión del cáncer a través de otros cambios tales como la alteración del canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , la localización de la bomba o bien por la actividad a través de la modificación post-transduccionales. Una forma de identificar y comprender la posible modificación o remodelación de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en algunos cánceres es comparar la naturaleza de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en células o líneas celulares derivadas de cánceres con las derivadas de tejidos no cancerígenos (24).

A nivel citoplasmático, un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre es capaz de activar una serie de proteasas llamadas calpainas. Estas enzimas son capaces de inducir la activación de la caspasa 12 que, a su vez induce la activación de la cascada de la caspasa 9 y la 3, teniendo como resultado la generación de apoptosis.

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso evolutivamente conservado que desempeña un papel esencial en el desarrollo del organismo y la homeostasis tisular. Sin embargo, en condiciones patológicas, particularmente el cáncer, las células pierden su capacidad de sufrir muerte inducida por apoptosis lo que conduce a una proliferación incontrolada. Con frecuencia, se encuentra que las células cancerosas expresan en exceso muchas de las proteínas que desempeñan un papel importante en la resistencia a la activación de la cascada apoptótica. Varios mecanismos permiten a las células escapar de la muerte celular programada y entre ellas está la sobreexpresión de las moléculas anti-apoptóticas (38).

La evasión de la apoptosis puede contribuir al desarrollo tumoral, a la progresión y también a la resistencia al tratamiento, ya que la mayoría de las terapias contra el cáncer que actualmente están disponibles incluyen quimioterapia y radioinmunoterapia (que actúan principalmente activando vías de muerte celular, es decir, apoptosis en células cancerosas). Por lo tanto, se espera que una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a la resistencia del tumor a la muerte celular apoptótica proporcione la base para un enfoque racional para el desarrollo de terapias dirigidas moleculares (38).

### Conexinas y gap junctions

Un punto importante que conviene señalar sobre la comunicación celular que se da de manera directa e indirecta. La directa es la comunicación célula-célula que puede ser intracrina, autocrina y juxtacrina que a su vez están reguladas por distintas vías (26). La comunicación indirecta ocurre a distancias cortas (señalización paracrina y sináptica) o a distancias largas por hormonas (endocrina). Los componentes esenciales para la comunicación célula-célula



involucran a las gap junctions (uniones comunicantes) que están conformadas por dos grupos de proteínas: las conexinas en vertebrados y las inexinas en invertebrados (27), sin embargo, también se involucran canales iónicos, sinapsis química, uniones estrechas (tight junctions) y otros (26).

En relación al cáncer que es una enfermedad compleja y heterogénea, la comunicación célula-célula no ha sido comprendida bien, sin embargo, numerosos estudios en cáncer humano han demostrado que las gap junctions son deficientes ya sea como un resultado en la desregulación de las conexinas que alteran el tráfico de la membrana celular o inhabilitan la forma funcional de las uniones. Esto ha resultado interesante debido a que ocurre en etapas tempranas durante la carcinogénesis (28). Debido a un estímulo patogénico (agudo o crónico) la primera interacción con la capa de células de mamífero ocurre en la superficie con la capa de proteoglicano (glucocálix). Este glucocálix abarca cinco moléculas de adhesión diferentes (inmunoglobulinas, integrinas, cadherinas, selectinas y moléculas de adhesión) que conectan directamente con la matriz extracelular (MEC), por otra parte el glucocálix de la membrana plasmática influye directamente en la capacidad de las células para formar gap junctions y así determinar la información que es filtrada y reenviada.

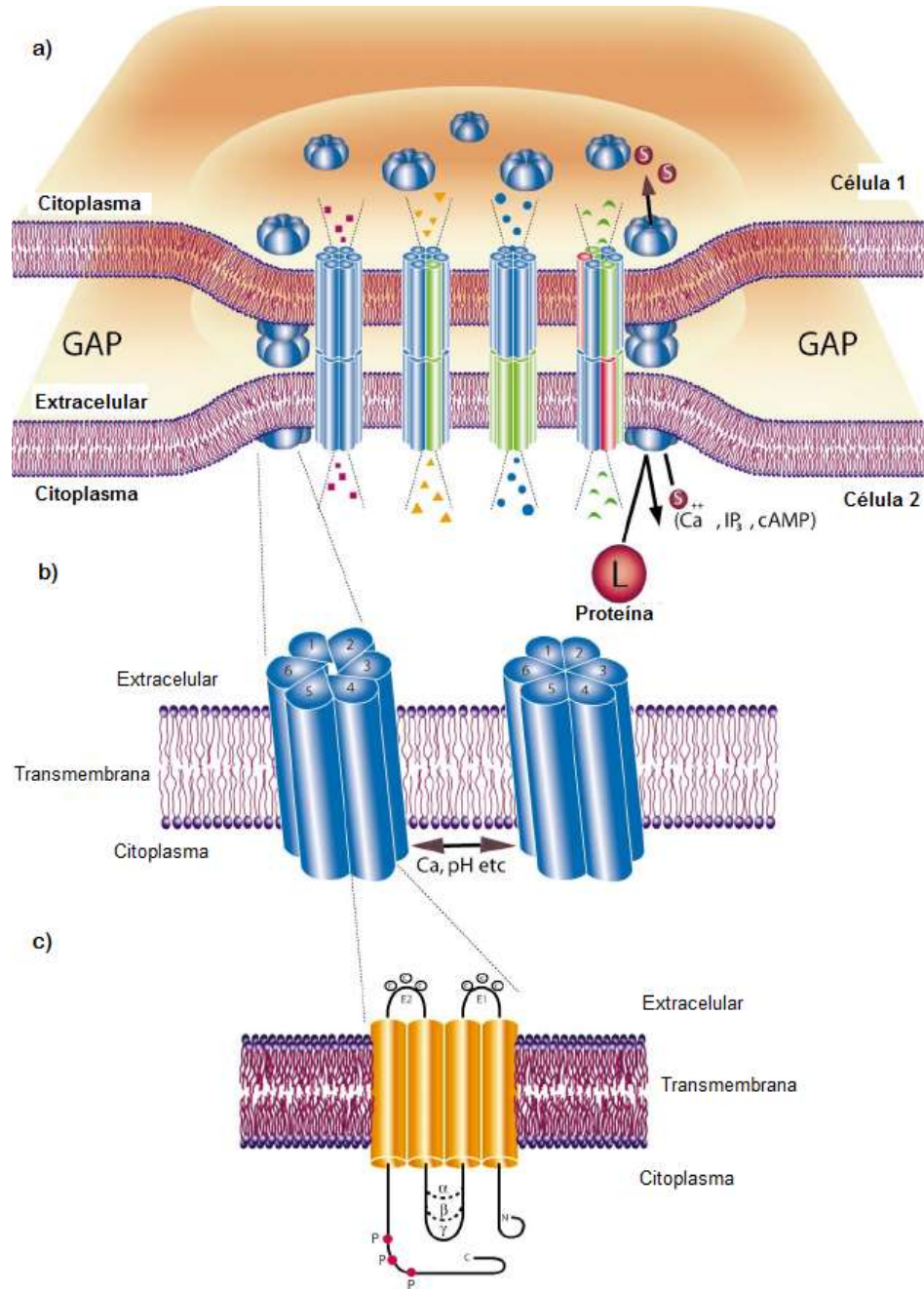
La importante participación de las conexinas se debe a que están involucradas en el crecimiento y muerte celular que involucra tres niveles de comunicación. El primero es a nivel intercelular, prevé el intercambio directo de determinantes de la homeostasis tisular entre células vecinas, el segundo es a nivel extracelular donde los hemicanales permiten la liberación parácrina de sustancias que participan en la regulación de la homeostasis tisular y el tercer nivel es el intracelular, en este las conexinas pueden afectar directa o indirectamente al crecimiento celular, ser reguladoras de la muerte celular o bien, actuar como un reservorio de señalización celular mediante interacciones reversibles (30).

La comunicación intercelular directa es mediada principalmente por las gap junctions (Figura 3), que son originadas por dos conexones unidos en células adyacentes, esta unión denota el flujo pasivo de sustancias pequeñas (1-1.5 kDa) entre las células por ello son consideradas claves en el mecanismo de la

regulación de la homeostasis del tejido (30). Las gap junctions median la transferencia de metabolitos e iones de una célula a otra, tales como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{IP}_3$ , glutamato, glutatión, ADP y ATP (29).

Los conexones están formados por seis conexinas, estas a la vez poseen cuatro dominios transmembrana (M1-M4), un amino y carboxilo terminal intracelular, dos asas extracelulares (E1-E2) y un asa intracelular (Figura 3).

En la familia de las conexinas se han encontrado 20 tipos en ratones y 21 tipos en humanos, sin embargo, las hCx25 y hCx59 son las únicas que se encuentran en humanos. Su nombre se debe a su masa molecular en kDa y la “h” se refiere al tipo humano mientras que “m” al tipo murino. El tamaño de su poro es de 100-150 ångströms y con una longitud de 12.5 ångströms. Es necesario mencionar que las conexinas se encuentran en una gran variedad de tejidos teniendo como excepción al musculo esquelético en etapa adulta, eritrocitos y espermatozoides (29). Mientras que cada conexina se puede encontrar de manera específica en un tejido o célula, también puede haber diversidad en la expresión de estas (31). El hecho de que un tejido exprese diferentes tipos de conexinas permite que se formen gap junctions homotípicas (dos conexones idénticos), heterotípicas (conexones diferentes) y heteroméricas (más de un tipo de conexina). Las vesículas que contienen conexones son transportados por los microtúbulos y filamentos de actina a la membrana celular y reclutados al exterior. Por otra parte la degradación de las gap junctions ocurre por las vías lisosomales y proteosomales; estas uniones tienen un tiempo de vida media de pocas horas, por lo que la síntesis y degradación de conexinas podría proveer una rápida adaptación de los tejidos al cambio de condiciones.



**Figura 3. Gap junctions, conexones y conexas.** a) Placa de Gap junctions: unión de dos citoplasmas de células adyacentes; b) conexones: unidades formadas por seis conexas; c) conexas: constituidas por cuatro dominios transmembranales, un amino y carboxilo terminal intracelular, dos asas extracelulares y un asa intracelular (36).

En el contexto del “bystander effect” que ocurren en la radioterapia y que se refiere a la capacidad de las células mutadas o transfectadas para modular el

comportamiento de las células circundantes, se divide en dos categorías: 1) en cultivos celulares confluentes en los que las células irradiadas y no irradiadas hacen contacto físico, y se ha sugerido que las gap junctions podrían mediar el bystander effect y 2) en cultivos celulares escasamente poblados en los que el contacto físico entre las células es escasa, y las moléculas señal de las células irradiadas pueden ser liberadas en el medio de cultivo para producir el bystander effect sobre las células no irradiadas (26), este efecto también se ha podido apreciar en la TFD. Así mismo este fenómeno está directamente correlacionado con el grado/extensión de las gap junctions entre células tumorales transfectadas y células no transfectadas circundantes. Con estos experimentos se demostró que una restauración de las gap junctions reduce el potencial neoplásico de las células lo que sugiere que las conexinas podrían funcionar como supresores tumorales (28).

Esto lleva a la hipótesis de que las conexinas se correlacionan negativamente con el grado tumoral, y que probablemente juegan un papel supresor en la carcinogénesis, que deriva de observaciones de un nivel reducido de la expresión de conexinas en células cancerosas y el grado de acoplamiento celular entre ellas (20). Esta regulación negativa de la expresión de conexinas se cree que contribuye a la pérdida del control de proliferación (32).

Por lo que el mecanismo mediante el cual las conexinas modifican el comportamiento de las células se entiende de manera incompleta y puede conducir a la identificación de nuevas vías y nuevos objetivos para la prevención y la terapia (26), por lo que resulta ser importante su estudio.

### Conexina 43

La migración celular juega un papel importante en los procesos patológicos tales como el crecimiento de tumores y metástasis. Un número de proteínas han sido relacionadas en el control de la migración celular o modulación, como se ha venido mencionando, estas proteínas son las llamadas conexinas. De los 21 tipos de conexinas que son expresadas en humanos la Cx43 y Cx32 son las más abundantes (39). La Cx43 es expresada en varios tipos de células, tales como los fibroblastos, células epiteliales, células hematopoyéticas, neuronas y otras (40). Se encuentra presente en al menos 34 tejidos y 46 tipos celulares (41).

Se sabe que la Cx43 juega un papel importante en la regulación de procesos de reparación. Tiene una vida media de entre 1-3 horas. Hay estímulos que activan varias cascadas de cinasas que dan como resultado la fosforilación de la Cx43 lo que conlleva a un desensamble de las uniones gap junctions, dichos estímulos pueden ser heridas, isquemia y activación de oncogenes. Aún no está claro cómo estos sitios promueven el desmontaje, pero es un área activa de investigación. Además de proporcionar un conducto intercelular, la cola citoplásmica de 130 aminoácidos de la Cx43 interactúa con una variedad de moléculas estructurales y de señalización que conducen al concepto de unión gap como un nexo de señalización. La dinámica de la unión gap y la capacidad de Cx43 para interactuar con diferentes proteínas parecen estar coordinadas a través de alteraciones en la fosforilación de Cx43. Y se han identificado al menos 19 sitios de fosforilación en Cx43 presentes en células o tejidos, y el campo ha logrado un progreso significativo en la caracterización de la red de quinasas que fosforilan Cx43 (42).

## **JUSTIFICACIÓN**

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

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

## **HIPÓTESIS**

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

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

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

### OBJETIVOS PARTICULARES

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

## METODOLOGIA

### Cultivo celular

Para realizar este proyecto se empleará la línea celular MCF-7 (ATCC), que es una línea tumoral que deriva de cáncer de mama. Las células serán mantenidas en un medio MEM en frascos T25 suplementado con 10% de suero bovino fetal, 2 mM de glutamina, antibióticos e insulina. Las células se mantendrán en una incubadora a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$ .

### Detección del tipo de muerte celular por anexina V y Yoduro de Propídio

Para determinar si la fotoactivación era capaz de generar muerte celular y cuantas células podían verse afectadas por este procedimiento, empleamos un kit de detección que utiliza Anexina V acoplada a FITC y adicionalmente se puede agregar yoduro de propídio a las células que están siendo estudiadas. Cuando las células están sufriendo un proceso apoptótico, la anexina V-FITC se une a la fosfatidilserina que ha sido transportada a la monocapa extracelular, sin embargo,

si la integridad de la membrana celular ha sido comprometida, el yoduro de propídio penetrará y se unirá al ADN.

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

Para realizar estos experimentos empleamos el siguiente protocolo:

Se realizó el procedimiento habitual de incubación con el fotosensibilizador, posteriormente en el microscopio confocal, la célula seleccionada fue fotoestimulada y 10 minutos después de haber terminado la fotoestimulación tanto en condiciones control, como en presencia del bloqueador de gap junctions y hemicanales, ácido flufenámico a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , procedimos a administrar la solución de Anexina V-FITC y Yoduro de Propídio que fue preparada siguiendo las indicaciones del fabricante, 10 minutos después, las células fueron lavadas y se procedió a la captura de imágenes.

#### Determinación de la propagación de la onda de $\text{Ca}^{2+}$ generada por la terapia fotodinámica.

Se realizó el análisis fluorométrico en células tumorales a las cuales después de la administración de la AICIPc, se les aplicó una sonda para  $\text{Ca}^{2+}$ , el Fluo-4FF AM (Invitrogen). La incubación con la sonda se realizó a 37°C durante 45 minutos y se midió empleando el microscopio invertido Nikon C2 (Nikon, Japón). La excitación del fluoróforo se realizó con un haz de luz de 488 nm.

La solución extracelular empleada tuvo la siguiente composición (en mM): 147 NaCl, 2 KCl, 2  $\text{CaCl}_2$ , 10 D-glucosa y 10 HEPES con pH ajustado a 7.4 empleando NaOH.

El análisis de estos experimentos se realizó con el programa Image J FIJI, que permite analizar las regiones de interés (ROI) y mide la intensidad de



fluorescencia. Los valores se muestran como  $dF/F_0$ , donde  $F_0$  representa la fluorescencia basal durante los primeros 10 segundos de registro. Se midió el área bajo la curva de respuesta como medida indirecta del cambio en la  $[Ca^{2+}]_i$  después de la fotoestimulación.

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

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

Para realizar esta parte del proyecto, se cuantificó la propagación de la señal de  $Ca^{2+}$  en condiciones control y en presencia de un bloqueador de *gap junctions*, el Ácido Flufenámico (AFF, 100  $\mu$ M). Para estos experimentos se colocó un cubreobjetos de 12mm de diámetro con células a una confluencia entre el 80 y 90%. Previamente se incubaron con el AICIPc (20  $\mu$ M) y con Fluo-4FF (10  $\mu$ M). Pasado el tiempo de incubación, se colocaron en la cámara de registro donde se aplicó el fotoestímulo y se observaron los cambios generados para posteriormente ser analizados off-line.

#### Determinación de la presencia de la conexina 43 mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta.

Para la detección de la conexina 43 por medio de inmunofluorescencia indirecta se aplicó el siguiente protocolo:

1. Se les realizó a las células 3 lavados con PBS.
2. Se permeabilizaron y saturaron los sitios inespecíficos con Tritón al 0.1% disuelto en solución de BSA al 2% a temperatura ambiente por 30 minutos.
3. Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
4. Posteriormente se incubaron por 12 horas a 4°C con el anticuerpo primario para la Cx43 (Abcam, USA) en solución BSA al 1%. La dilución empleada fue de 1:200.

5. Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
6. A continuación, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo (Abcam, USA.) a temperatura ambiente durante dos horas. Este anticuerpo se empleó a una dilución 1:200.
7. Se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
8. Hecho esto, se realizó la tinción de núcleos con DAPI (Abcam, USA) y de F-actina con faloidina conjugada con un fluoróforo (Abcam, USA).
9. Se selló la preparación y se observó en el microscopio invertido Nikon C2 acoplado a un sistema de confocalidad (Nikon, Japón).

Se realizaron 4 ensayos por duplicado para la conexina y se emplearon 2 controles negativos y 2 positivos. Para los controles positivos empleamos cortes de corazón.

### Análisis estadístico

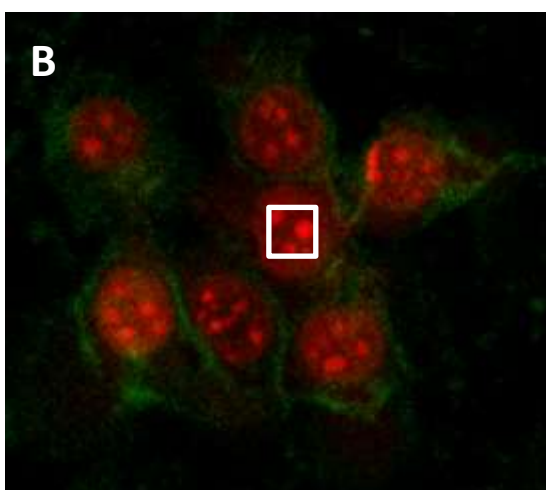
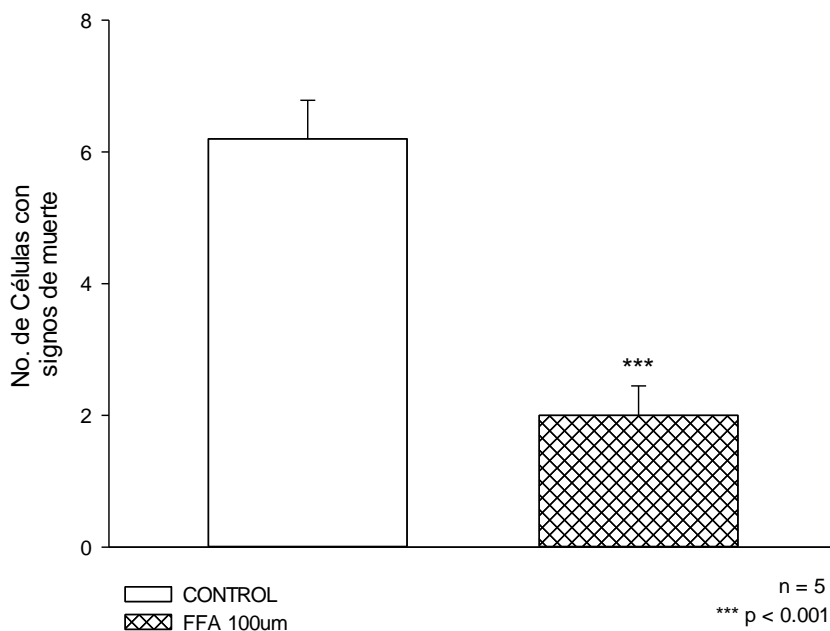
Se empleó la prueba ANOVA de una vía, considerando significativo un valor igual o menor a 0.05 ( $p \leq 0.05$ ) entre los grupos tratados con respecto al control. Las gráficas presentadas muestran el valor  $\pm$  error estándar de la media.

## RESULTADOS

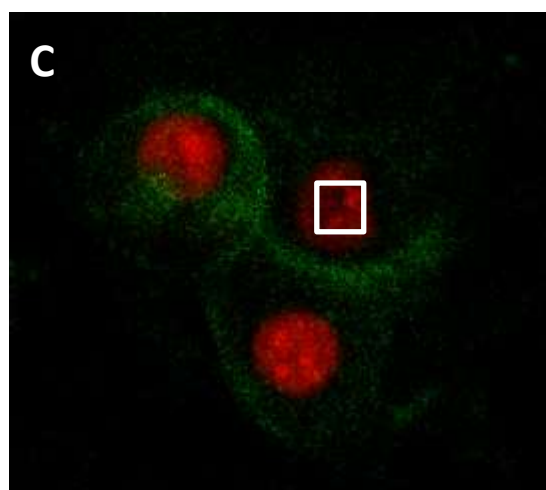
### **Efectos de la fotoestimulación sobre la viabilidad de las células MCF-7**

Inicialmente estos experimentos realizaron empleando azul de tripano, los cuales indicaban que en efecto, el grupo de células que había sido irradiado, mostraba la tinción, sin embargo, para poder realizar un estudio más detallado del proceso de muerte que estaban presentando las células MCF-7 incubadas con el fotosensibilizador y sometidas a estimulación lumínica, se empleó una solución con Anexina V-FITC y Yoduro de propídio. Como se aprecia en la gráfica que aparece en la figura 4, el número de células que presentaron signos de muerte celular en condiciones control, fue significativamente mayor al observado en los experimentos en donde la estimulación se hizo en presencia del bloqueador de gap junctions y hemicanales, el ácido flufenámico, a una concentración de 100 $\mu$ M ( $6.2\pm 0.58$  y  $2.0\pm 0.44$  células, respectivamente,  $n = 5$ ,  $p < 0.001$ ). Las características que muestran las células que se encuentran en un proceso de muerte se pueden apreciar en la figura 4, las células presentan el núcleo rojo, teñido por el yoduro de propídio y la membrana celular en color verde lo que corresponde a la unión de la anexina. En A, se observa el efecto de la fotoestimulación en condiciones control, mientras que en B, lo que se observó en presencia del bloqueador de gap junctions y hemicanales mencionado anteriormente.

## MUERTE CELULAR



Control

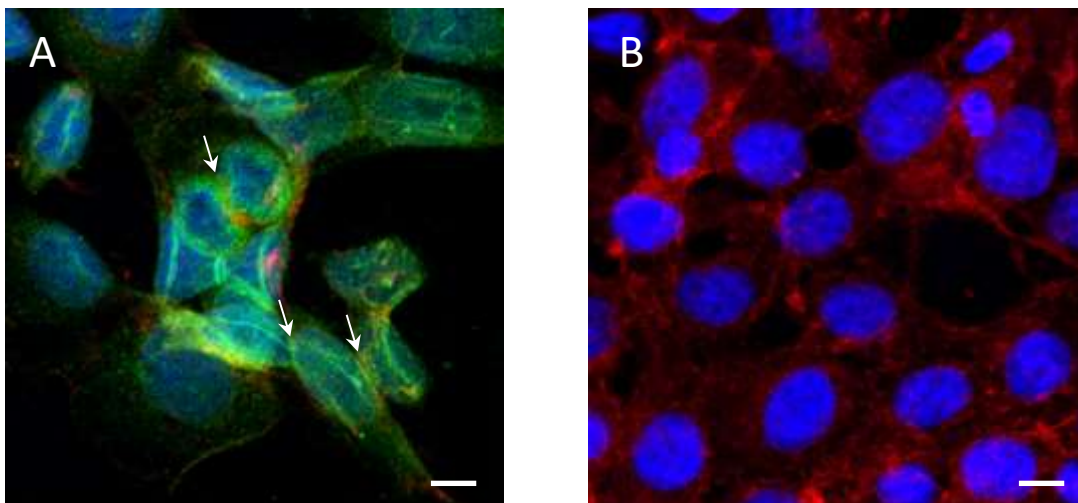


FFA 100µM

**Figura 4. Muerte celular ocasionada por la fotoestimulación.** En esta figura se aprecian los efectos de la fotoestimulación sobre la célula irradiada y las que la rodean. En A, se observa una gráfica de barras que muestra la diferencia en el número de células con signos de muerte en condiciones control y cuando el bloqueador de *GJ* y hemicanales se encontraban presentes (AFF 100µM). En B, se observa una imagen tomada con el microscopio confocal y muestra la condición control, en donde prácticamente todas las células que rodean a la irradiada (cuadro blanco) presentan datos de muerte celular. Cuando la fotoestimulación se realizó en presencia del bloqueador *de gap junctions* y hemicanales (AFF 100µM), el número de células con datos de muerte fue significativamente menor (C). Los núcleos están marcados con yoduro de propídido (rojo) y la membrana celular con anexina V (verde). Barra de escala = 10µm.

### Presencia de la Conexina 43 en las células MCF-7.

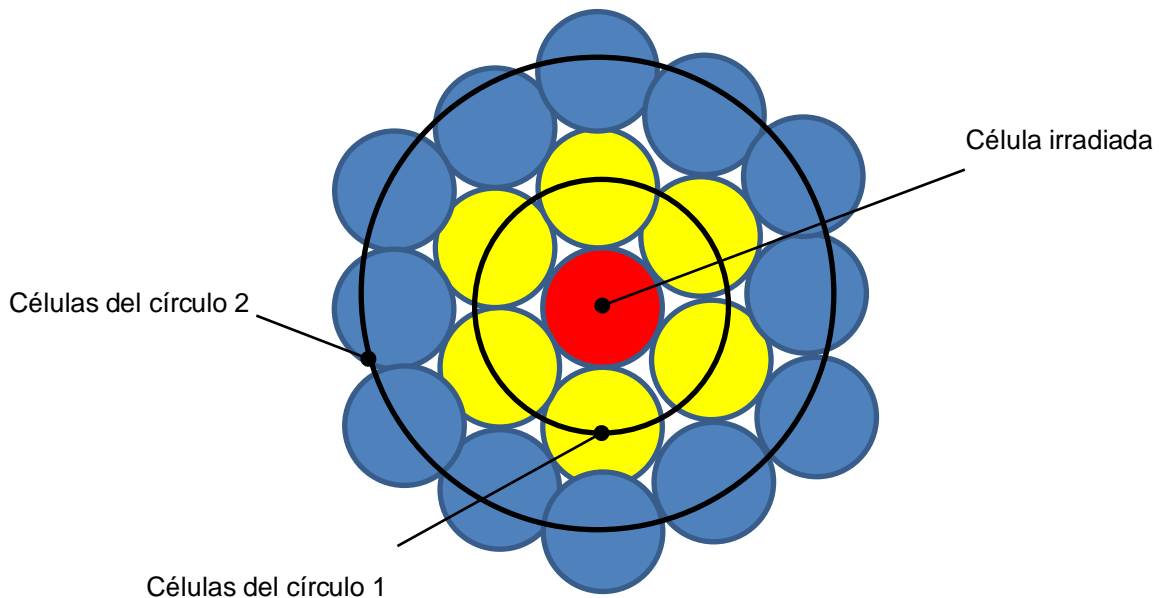
Empleando la técnica de inmunofluorescencia indirecta, se investigó la presencia de la conexina 43 en las células MCF-7 en cultivo. Como se puede apreciar en la figura 5 (A), la cual fue obtenida empleando un microscopio confocal, en color verde podemos apreciar el puntilleo tanto a nivel membranal como citoplasmático que indica los sitios en donde está localizada la conexina. En la figura 5 (B), observamos el control negativo, en donde solo se observan los núcleos en color azul y los filamentos de actina en color rojo, sin que exista marca en color verde.



**Figura 5. Presencia de la Cx 43 en las células MCF-7.** Empleando un anticuerpo específico para la conexina 43, se observa la presencia de dicha conexina (color verde) en las células MCF-7 (A), el marcaje puede observarse como un puntilleo y sugiere una localización membranal, citoplasmática y perinuclear. Ocasionalmente se observó un patrón en forma de placas, sin embargo no fue el predominante. En B, observamos el control negativo. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y los filamentos de actina con faloidina (rojo). Las flechas indican algunos sitios en donde se localizan las conexinas. Barra de escala = 10  $\mu$ m.

### Cambios en el nivel intracelular de $\text{Ca}^{2+}$ secundarios a la fotoestimulación

Se observó que la fotoestimulación generaba cambios en el nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , siempre que el fotosensibilizador estuviera presente en las células, de otra forma, la luz por sí sola no fue capaz de generar ningún cambio en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . El incremento intracelular de dicho ion, ocasionado por la fotoestimulación alcanzó niveles significativos que oscilaban entre 8 - 10 veces el valor basal de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula irradiada, por otro lado, también se observó que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las células que se encontraban cercanas a las estimuladas. Debido a las características de la respuesta observada en las células cercanas a la estimulada, se separaron en dos grupos, el primero engloba a todas las células que estaban en contacto directo con la estimulada y se nombró círculo uno, el segundo grupo de células que se analizó fue el que estaba en contacto con el círculo uno y lo nombramos como círculo dos, lo anterior se esquematiza en la figura 6.

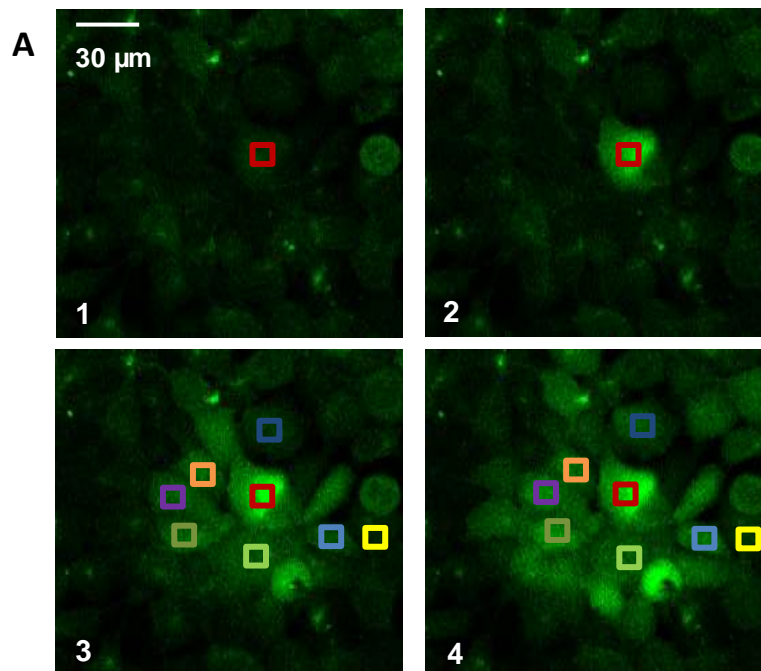


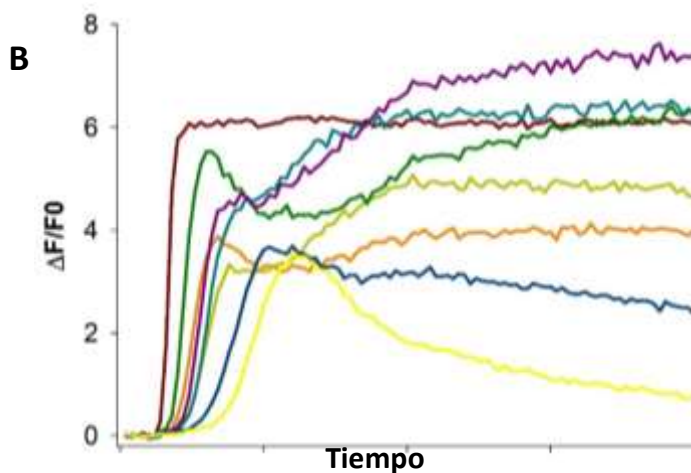
**Figura 6. Esquema de la distribución que presentaban las células a analizar.** Con este dibujo se esquematiza la manera en cómo se encontraban distribuidas las células cercanas a aquella irradiada (rojo). Esto nos permitió hacer dos grupos, nombrados círculo 1 (amarillo) y círculo 2 (azul).

Con este análisis se pudo apreciar que las células del círculo 1 incrementaron el nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  hasta 10 veces y en menor magnitud las células del círculo 2.

### **Cambio en el nivel intracelular de $\text{Ca}^{2+}$ secundario a la fotoestimulación.**

Se pudo apreciar que la fotoactivación de una célula MCF-7 generaba cambios en su nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y dicho cambio también se generaba en las células vecinas, lo que se consideró como una propagación de la onda de  $\text{Ca}^{2+}$  provocado por la fotoactivación. Como se puede apreciar en la figura 7, el primer fotograma muestra un grupo de células en condiciones basales y un cuadro en color rojo que indica la célula que será fotoactivada, posteriormente, en la foto 2 se aprecia que durante la fotoestimulación la célula enmarcada en el cuadro rojo incrementa la intensidad de fluorescencia, lo que sugiere un aumento en el nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y posteriormente, en las fotos 3 y 4 observamos que este cambio de intensidad se propaga a las células vecinas.





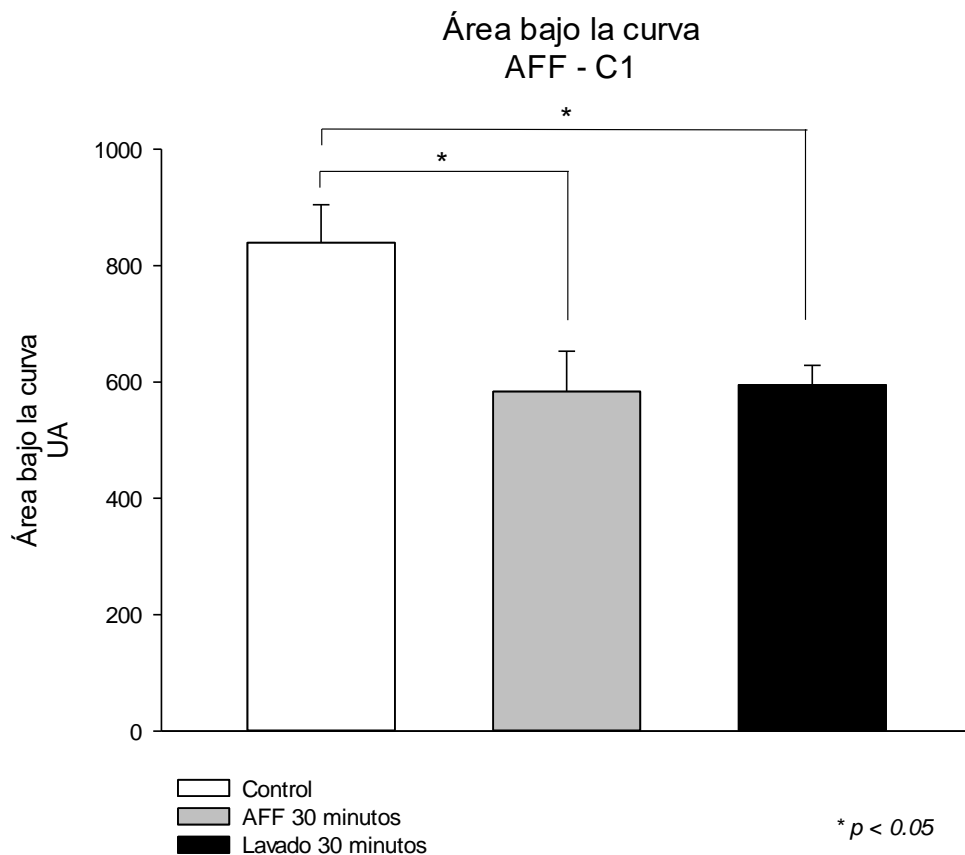
**Figura 7. Incremento en el nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y su propagación en células MCF-7.** En A, se observan 4 fotogramas numerados del 1 al 4 en donde podemos ver un grupo de células MCF-7 y que de manera secuencial nos muestran los cambios que se generan por la fotoestimulación. El fotograma 1 se observa un grupo de células antes de la fotoestimulación. El cuadro en color rojo marca la célula que será estimulada. La foto 2 muestra el cambio de intensidad generado por la fotoactivación y que nos indica un incremento en el nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los fotogramas 3 y 4 permiten apreciar la propagación de dicha señal. En B observamos una gráfica de intensidad contra tiempo en donde cada trazo corresponde a la célula marcada que un cuadro del mismo color en la figura A3 y A4.

### **Participación de las conexinas en la propagación de la onda de $\text{Ca}^{2+}$ .**

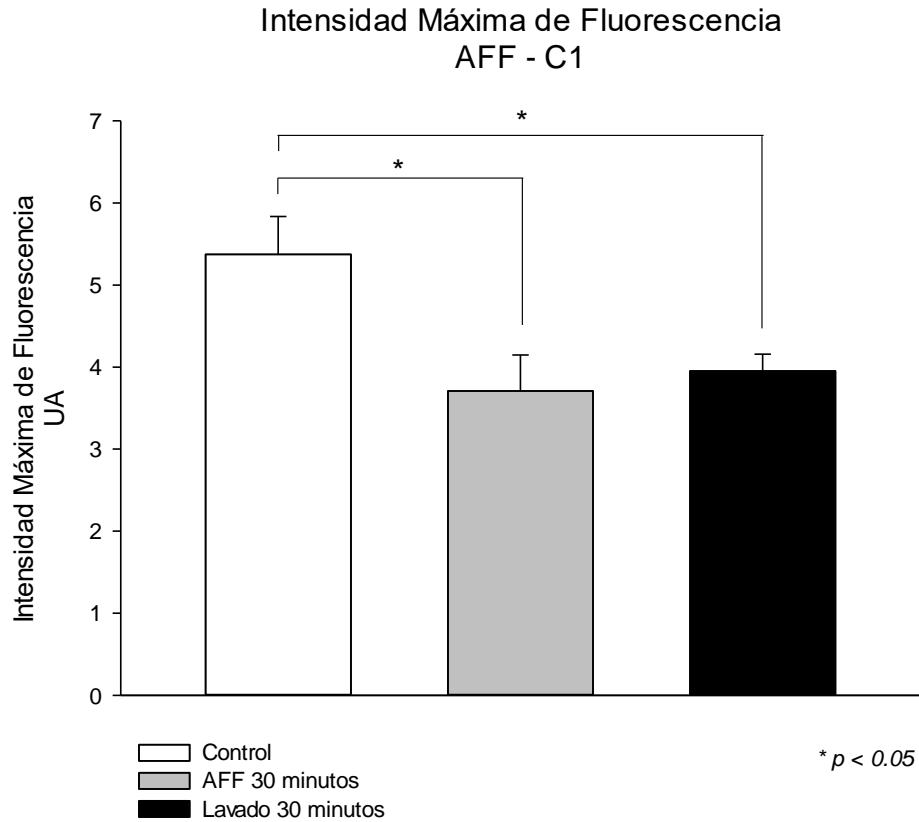
Para corroborar que las conexinas estuvieran participando en dicha propagación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , se perfundió las células durante un tiempo de 30 minutos con una solución que contenía ácido flufenámico (AFF) que funciona como bloqueador de gap junctions y hemicanales, a una concentración de  $100 \mu\text{M}$ . Como se puede apreciar en la figura 8, se muestra una gráfica de barras en donde se compara la condición control (barra blanca), después de 30 minutos de perfundir AFF (barra gris) y después de 30 minutos de lavado (barra negra) solo de las células del correspondientes al círculo 1. El análisis que se realizó permitió conocer tanto la magnitud del cambio de fluorescencia y el área bajo la curva, lo que indirectamente indicó el cambio en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y su comportamiento a lo largo del tiempo. Cuando el AFF se encontraba presente, hubo una disminución en el valor de cambio de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y en el número de células que lo presentaban, así como en el área bajo la curva, siendo esta diferencia significativa. El cambio en la intensidad del fluorescencia fue 31.49% menor cuando estaba presente el AFF al compararlo con el control, mientras que la disminución en el área bajo la curva fue



de 27.32% en presencia del mismo bloqueador. El efecto del AFF no fue reversible después de 30 minutos de lavado (figura 9).



**Figura 8. Medición del área bajo la curva de la fluorescencia en presencia de AFF de las células localizadas en el círculo 1.** Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar obtenido de experimentos independientes (n=4). El gráfico permite apreciar que hubo una disminución en el área cuando el AFF estuvo presente y que dicho efecto se mantuvo incluso después de 30 minutos de lavado.  $p < 0.05$  (\*).

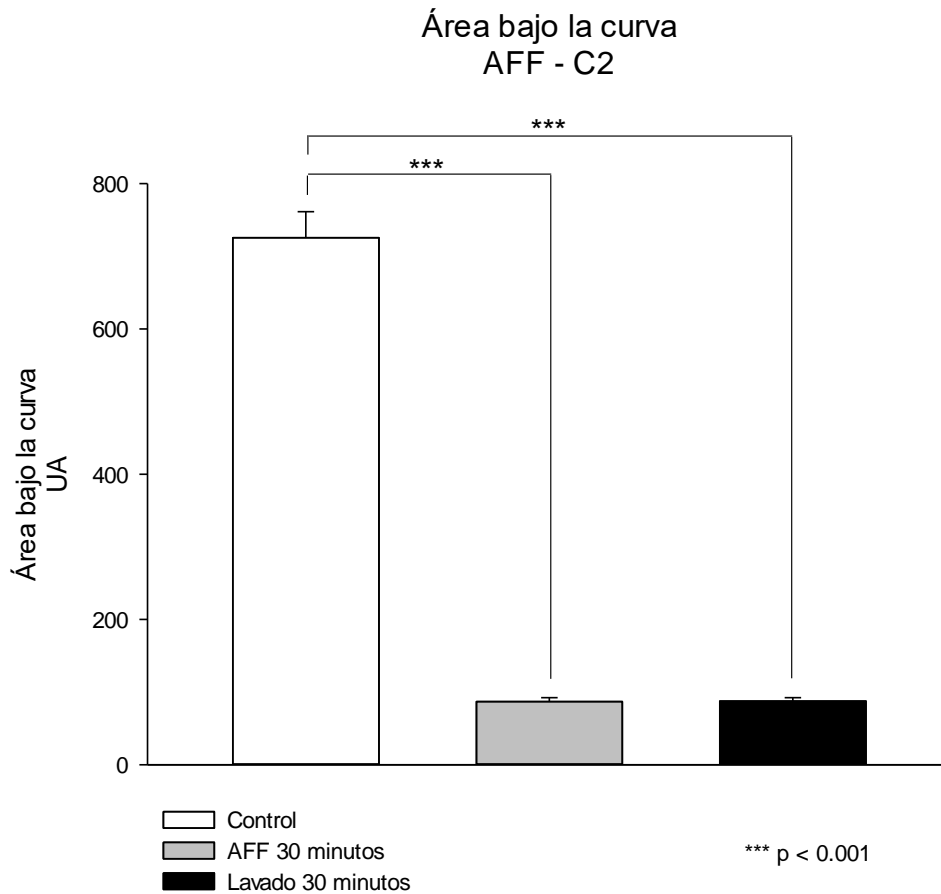


**Figura 9. Medición de la intensidad máxima de fluorescencia en presencia de AFF de las células localizadas en el círculo 1.** Los valores representan la media  $\pm$  el error estandar obtenido de experimentos independientes ( $n=4$ ). Los datos del grupo tratado con el bloqueador fueron comparados con el control.  $p < 0.05$  (\*).

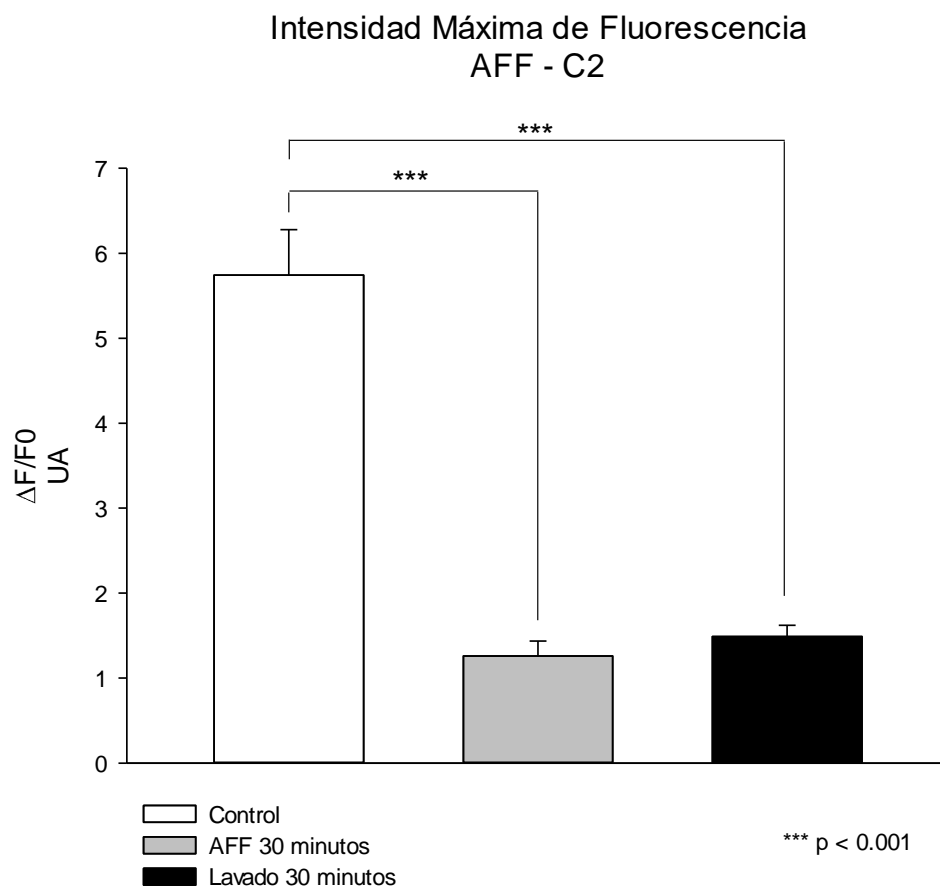
El análisis de las células del círculo 2 en esta misma serie de experimentos, mostró cambios más drásticos que los observados en las células del círculo 1 (figura 8,9).

Cuando se fotoestimuló y el AFF se encontraba presente, el valor de la intensidad de fluorescencia disminuyó de manera significativa con respecto al control siendo un 78.07 % menor (figura 11). Por su parte, el área bajo la curva también tuvo una

disminución significativa del 88.04% con respecto al control (figura x). Al igual que las células del círculo 1, no hubo recuperación de los valores analizados después de 30 minutos de lavado.



**Figura 10. Medición del área bajo la curva de la fluorescencia en presencia de AFF de las células localizadas en el círculo 2.** Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar obtenido de experimentos independientes (n=4). El gráfico permite apreciar que hubo una disminución en el área cuando el AFF estuvo presente y que dicho efecto se mantuvo incluso después de 30 minutos de lavado.  $p < 0.001$  (\*\*\*)



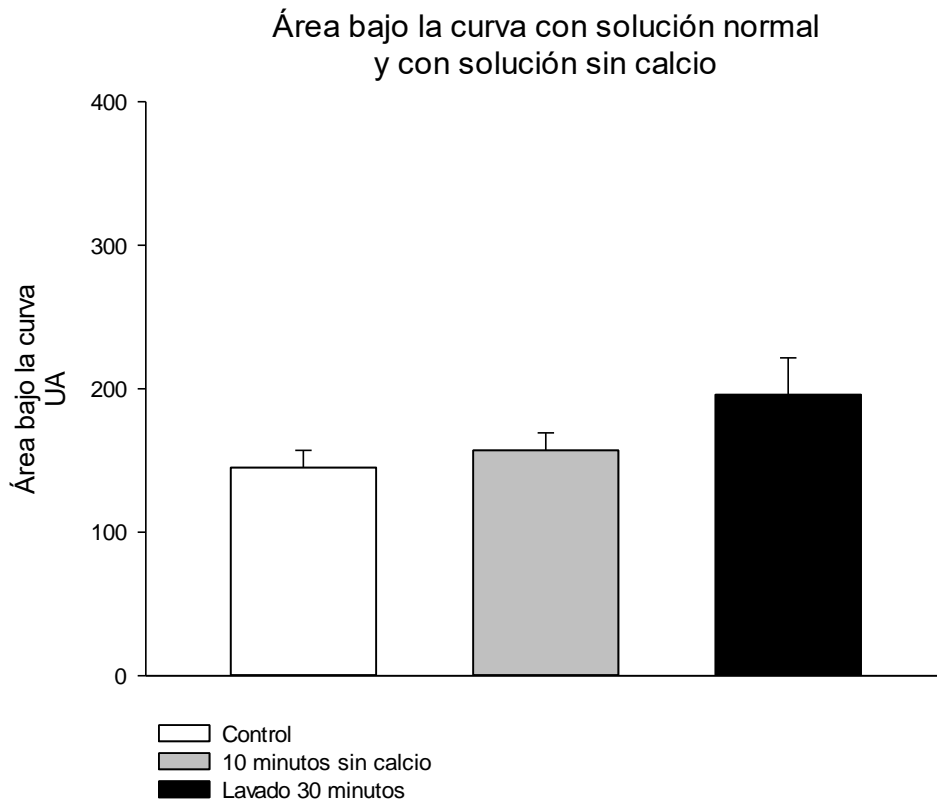
**Figura 11. Medición de la intensidad máxima de fluorescencia en presencia de AFF de las células localizadas en el círculo 2.** Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar obtenido de experimentos independientes (n=4). Los datos del grupo tratado con el bloqueador fueron comparados con el control. p < 0.001 (\*\*\*)

### **Dependencia del Ca<sup>2+</sup> extracelular.**

Con la finalidad de determinar si el incremento en el nivel intracelular de Ca<sup>2+</sup> era dependiente de la entrada de este ion a la célula, se realizó una serie de experimentos en donde perfundimos a las células con una solución libre de Ca<sup>2+</sup> suplementada con EGTA (0.5mM).

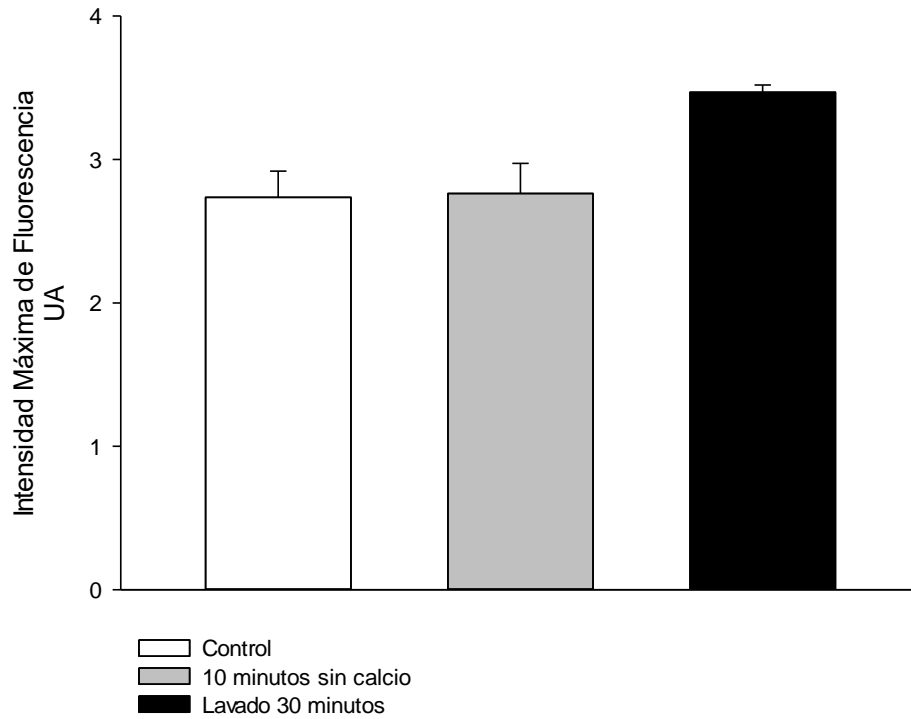
Estos experimentos permitieron observar que los cambios no dependen del Ca<sup>2+</sup> extracelular, ya que los valores obtenidos cuando dicho ion se encontraba ausente en la solución extracelular no fueron significativos con respecto al control. En esta

serie experimental los datos analizados fueron aquellos provenientes de las células del círculo 1 (figura 12, 13).



**Figura 12. Medición del área bajo la curva de la fluorescencia en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular de las células del círculo 1.** Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar obtenido de experimentos independientes ( $n=4$ ). El gráfico permite apreciar que no hubo una disminución en el área cuando las células se perfundieron con solución sin  $\text{Ca}^{2+}$  y adicionada con EGTA 0.5 mM.

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



**Figura 13. Medición de la intensidad máxima de fluorescencia en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular de las células del círculo 1.** Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar obtenido de experimentos independientes ( $n=4$ ). El gráfico permite apreciar que no hubo una disminución en la intensidad máxima de fluorescencia cuando las células se perfundieron con solución sin  $\text{Ca}^{2+}$  y adicionada con EGTA 0.5 mM.

## DISCUSION

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo (1). De todos los tipos de cáncer presentados en la población femenina, el cáncer de mama se ha convertido en la principal causa de muerte (4,5). Los tratamientos que se incluyen en este tipo de cáncer van desde cirugía local, radioterapia, o ambos, hasta tratamientos sistémicos como quimioterapia, terapia endocrina o alguna combinación de ellos (43). Como se mencionó al inicio de esta tesis, la terapia fotodinámica (TFD) es una modalidad emergente que ha sido utilizada para tratar varios tumores sólidos, en etapas tempranas y en neoplasias avanzadas pero únicamente como método paliativo (15). En el estudio del cáncer se emplean diferentes líneas celulares, sin embargo, para el cáncer de mama la línea celular MCF-7 muestra ciertas ventajas como la fidelidad a los aspectos clínicos y ser positiva a receptores hormonales como por ejemplo el receptor de estrógeno alfa (ER) que es difícil de expresar en otras líneas celulares, mientras que en la línea MCF-7 se encuentra presente (21). Sin embargo, también es importante señalar el papel que juega el  $\text{Ca}^{2+}$  en este proceso puesto que a nivel citoplasmático un incremento en la concentración de este, es capaz de activar una serie de proteasas, teniendo como resultado, la generación de muerte (24). Finalmente, otro de los factores relevantes en la comunicación celular del cáncer está relacionado a las gap junctions que juegan un rol sumamente importante en esta enfermedad y otras más (27).

Por todo ello, en la presente tesis se estudió si la fotoactivación, que es uno de los principios de la terapia fotodinámica, generaba incremento en el nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula irradiada y si dicho cambio se propagaba a las células vecinas, siendo esta propagación favorecida por la presencia de conexinas que pueden formar gap junctions o hemicanales, condiciones no estudiadas hasta el momento en la línea celular MCF-7. Además, valorar si la fotoactivación generaba la muerte de la célula irradiada y de aquellas que la rodean, generando un fenómeno conocido como bystander effect o efecto espectador.

Con la finalidad de determinar si la fotoactivación era capaz de generar la muerte de la célula o grupo de células irradiadas, empleamos dos protocolos. El primero consistió en determinar la muerte celular empleando una solución de azul de tripano (datos no mostrados) y el segundo protocolo lo realizamos empleando una solución que contenía Anexina V y yoduro de propídio. El primer protocolo dio la posibilidad de ver de manera general que en efecto, las células irradiadas sufrían un proceso de muerte, sin embargo no nos permitía distinguir si dicha muerte se estaba generando por una vía apoptótica o necrótica, razón por la cual decidimos continuar nuestros experimentos empleando el segundo protocolo. Cuando se aplicó la solución de Anexina V y yoduro de propídio se pudo apreciar claramente que tanto la célula irradiada como aquellas que formaban parte del círculo 1 sufrían un proceso de muerte y particularmente por la vía necrótica. Se ha demostrado que la anexina es una proteína que se une específicamente a residuos de fosfatidilserina, los cuales se encuentran expuestos en la cara externa de la membrana plasmática y funciona como un biomarcador en células apoptóticas, además, la anexina puede ser combinada con un marcador de ADN que no sea permeable a la membrana a menos que esta se vea comprometida, con el fin de distinguir células apoptóticas de necróticas (44). De acuerdo a M. Martinez 2009, se ha evidenciado que la combinación de anexina V-FITC con yoduro de propídio puede garantizar la diferenciación de muerte celular, registrando células no apoptóticas (anexina V-FICT negativo/ IP negativo), células en apoptosis temprana (anexina V-FICT positivo/ IP negativo), y células necróticas (anexina V-FICT positivo/ IP positivo). Es por ello que de acuerdo a los resultados obtenidos donde dadas las características celulares que se presentaron, podemos decir que las células están en un proceso de muerte particularmente de tipo necrótico.

Luksiene (2003) menciona dos diferentes mecanismos por los cuales las células pueden morir después de un proceso de fotoactivación y son, apoptosis y necrosis. Mismos que pueden ser reconocidos por las diferencias morfológicas, bioquímicas y cambios moleculares que desencadenan en células a punto de morir. Las células inician una cascada de eventos que inducen la desintegración y



la formación de cuerpos apoptóticos que posteriormente son fagocitados por células vecinas o del sistema inmune. La necrosis es una vía alternativa al mecanismo de muerte celular. Muchas veces suele ser inducida por sobredosis de agentes citotóxicos (45). Como se aprecia en la figura 4, el número de células del círculo 1 que murieron fue menor cuando se encontraba presente el AFF, lo anterior sugiere que las conexinas a través de la formación de gap junctions o hemicanales, podrían estar favoreciendo la propagación de sustancias que generan alteraciones en las células cercanas a aquella irradiada y desencadenaría también en ellas un proceso de muerte, como se puede observar en los experimentos.

Existen reportes que demuestran que el tratamiento empleando la fotoactivación ha sido eficaz, y hay un incremento en el interés por elucidar los mecanismos por los cuales causa muerte celular, lo que permitiría optimizar las estrategias terapéuticas en una gran variedad de enfermedades, incluyendo el cáncer (45).

Es bien conocido que una pérdida en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es capaz de generar la muerte de la célula que la presenta, es por ello que se decidió investigar si la fotoactivación generaba incremento en el nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  para lo cual se emplearon sondas fluorescentes sensibles a este ion y que de manera indirecta indican cambios en su concentración, además, se propuso estudiar si dicha señal propagaba a las células vecinas y si las conexinas participaban en ella mediante la formación de gap junctions y hemicanales.

Hay pocos estudios comparando cómo la naturaleza de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  es alterada en el cáncer y los cambios que podría presentar con la progresión del tumor, es decir, las variaciones en los diferentes estadios de la enfermedad. Diversos experimentos han permitido identificar canales y transportadores específicos para el  $\text{Ca}^{2+}$  en diferentes tipos de cáncer, dentro de los que destacan el de ovario, cerebro, próstata, mama y esófago. En todos ellos se ha sugerido que las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  podrían estar alteradas, principalmente por un cambio en la expresión de las proteínas relacionadas con su regulación (24).

Un ejemplo de cómo el  $\text{Ca}^{2+}$  se involucra en la comunicación celular es el que propone Stewart et al. (2015) donde muestra que muchos de los cambios entre células tumorales y no tumorales se reflejan de forma específica en la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ ; como la naturaleza de su influjo o la tasa de recuperación después de una estimulación.

Los resultados obtenidos muestran claramente que la fotoestimulación genera un incremento significativo en el nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo anterior puede ser explicado debido a que se ha sugerido que los fotosensibilizadores del grupo de las ftalocianinas tienden a dirigirse hacia el retículo endoplásmico y mitocondria (49). Lo anterior ocasiona que cuando estos órganos se lesionan puedan liberar  $\text{Ca}^{2+}$  al medio intracelular y de esta forma incrementar su concentración a niveles que se vuelven citotóxicos desencadenando vías de muerte celular (50). Lo anterior podría estar pasando en las células empleadas y explicar, al menos en parte, la muerte celular que se observa. Por otra lado, es importante recordar que tanto la onda de  $\text{Ca}^{2+}$  como la muerte celular también se presentaron en las células que se encontraban cercanas a la célula irradiada, principalmente en aquellas que estaban en contacto directo, lo cual nos permite suponer que podría existir un mecanismo de comunicación intercelular que permitiera el paso de este ion o de alguna otra sustancia que ocasione un incremento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en estas células e incluso, la señal generada podría ser de tal magnitud que también provocara la muerte de las mismas (51), justo como se observa en los experimentos realizados.

Otra manera de corroborar que el  $\text{Ca}^{2+}$  responsable de generar los fenómenos que se observaron es principalmente derivado de los almacenes intracelulares fue con los experimentos en donde se retiró este ion de la solución extracelular y además se añadió un quelante del mismo, con lo que se limitó su ausencia en el espacio extracelular, en estas condiciones, la fotoestimulación continuó generando incrementos en el nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y propagándose a las células vecinas.

Un mecanismo de comunicación intercelular ampliamente distribuido es el que se encuentra mediado por conexinas, ya sea mediante la formación de gap junctions

o hemicanales. Se sabe que a través de estas pequeñas estructuras se da el paso de iones como el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{K}^+$ , segundos mensajeros dentro de los que destaca el  $\text{IP}_3$  y algunos otros pequeños metabolitos (47). Al administrar un bloqueador como el ácido flufenámico, la comunicación se ve disminuida y como consecuencia, la generación de las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  y el daño celular también se ven disminuidos como lo demuestran los resultados obtenidos.

Se ha demostrado que el ácido flufenámico es capaz de bloquear la comunicación mediada por conexinas a concentraciones de  $30 \mu\text{m}$ , sin embargo esta concentración puede variar dependiendo del tipo de conexina (25). En los experimentos se empleó AFF a una concentración de  $100 \mu\text{m}$ , con lo que es altamente probable que las gap junctions y hemicanales presentes en las células estuvieran bloqueados y esto generara los efectos observados en los experimentos, es decir, una disminución en la propagación de la onda de  $\text{Ca}^{2+}$  y limitación en el daño a las células vecinas.

Para corroborar que las conexinas estuvieran presentes, se decidió hacer una inmunofluorescencia indirecta y observar la localización y distribución en particular de la conexina 43. Se puede apreciar que la conexina 43 se encuentra presente con una distribución tanto membranal como citoplasmática, sin que se presentara un abundante patrón en placas característico de la formación de gap junctions, sin embargo, esto no descarta la posibilidad de que dichas placas estén presentes y que también estén formando hemicanales.

Estudios *in vitro* han demostrado las diferentes funciones en las cuales pueden participar las conexinas, además de la clásica comunicación intercelular. Su papel en la migración celular ha sido demostrado en células derivadas de cerebro, fibroblastos, células endoteliales, células cardíacas y células progenitoras endoteliales, sugiriendo que las conexinas tienen un rol importante en dicho fenómeno (48). La presencia de diferentes conexinas también ha sido demostrada en células de mama, tanto en tejido sano como neoplásico, siendo la Cx43 la predominante (40).

King y Bertram (2005) demuestran que existe una pérdida funcional de las gap junctions en células tumorales ocasionada por una expresión anormal o un procesamiento aberrante pero cuando se logra restaurar la funcionalidad, las células disminuyen su potencial metastásico, tanto en células derivadas de neoplasias humanas como animales (28).

Existen varios estudios en donde la presencia de la Cx43 afecta de manera significativa la migración celular, sin embargo, todo parece indicar que dichos efectos pueden variar dependiendo del tipo celular, por ejemplo, en tejido neuronal se han reportado alteraciones en la comunicación celular cuando la Cx43 se ve afectada tanto en su expresión como en su función pero por otro lado, existen estudios que indican que no existen cambios en el proceso de laminación cortical cuando la Cx43 ha sido afectada. Lo anterior sugiere de manera importante que los efectos aparentemente contradictorios de las conexinas y en especial de la 43, podrían depender de las diferencias entre tipos celulares o también de los efectos compensatorios de otras conexinas, así como de las modificaciones en las diferentes vías que participan en el proceso de migración (48).

El aumento en la expresión de la Cx43 genera cambios en los niveles de Bax y Bcl-2, incrementa el primero o disminuye el segundo, lo cual se correlaciona a su vez con la promoción o inhibición respectivamente de la apoptosis (52). El incremento en los niveles de Bax también se ha relacionado con una mejor respuesta a la quimioterapia en pacientes con cáncer gástrico o de mama, incluso en estadios avanzados de la enfermedad (52). Se ha reportado que la Cx43 coimmunoprecipita con Bax pero no con Bcl-2 en ciertas células tumorales (53) con lo que se podría pensar que modulando la expresión de Cx43 se podría afectar el funcionamiento de Bax, lo cual también podría ayudar a superar el obstáculo de la quimioresistencia que se presenta con frecuencia. En cáncer de mama, se ha observado una disminución en la Cx43, sin embargo, los niveles se pueden restaurar, al menos *in vitro* (40) lo que podría acarrear beneficios terapéuticos.

Decrock et al. (2009) trabajando con células C6 de glioma, proponen que la Cx43 podría estar ayudando a extender el daño a células vecinas, contribuyendo a la aparición del efecto bystander y mejorando el resultado del tratamiento. Efectos benéficos también se observaron en otra línea tumoral de mama, la Hs578T, donde la expresión de la Cx43 reduce su crecimiento y migración, impactando incluso en la transición epitelio-mesenquimal (46).

Claramente se puede apreciar que las conexinas tienen un rol importante en el desarrollo del cáncer y por esta misma razón podrían funcionar como un blanco terapéutico. En este trabajo se pudo destacar la participación de las conexinas en la propagación de señales tales como el  $\text{Ca}^{2+}$ , que puede generar un daño irreversible en las células que lo presentan. Es muy probable que haya otras conexinas participando en esta función y sin duda, otras sustancias que puedan estar dañando a las células, sin embargo, esta es la primera vez que se demuestra en células de cáncer de mama como lo son las MCF-7, que la comunicación mediada por conexinas puede estar participando en la propagación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  y que su bloqueo, además de disminuir la propagación del ion, también limita el daño a las células vecinas.

## CONCLUSIONES

- La fotoactivación ocasiona la muerte de la célula que es irradiada y de aquellas que se encuentran en contacto directo con ella.
- El fotoestímulo ocasiona incremento en el nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula directamente activada y dicho incremento se propaga en aquellas que se encuentran cercanas a ella.
- El incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular observado no depende del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.
- La conexina 43 se encuentra presente en las células MCF-7.
- El ácido flufenámico, bloqueador inespecífico de gap junctions y hemicanales, disminuye la propagación de la onda de  $\text{Ca}^{2+}$  así como el número de células que presentan signos de muerte.

## REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2015a). Cáncer. Nota descriptiva N° 297. Recuperado el 28 de enero de 2017, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
2. Ferlay J., Hery C., Autier P. y Sankaranarayanan R. (2010). Global Burden Of Breast Cancer. Christopher I. Li. En Breast Cancer Epidemiology (pp.13-19). New York: Springer.
3. Online Archive of Internacional Agency for Research on Cancer. Population Fact Sheets. [Consultado en 2017, febrero 27]. Disponible en: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)
4. International Agency for Research on Cancer [GLOBOCAN]. (2012). Cancer fact sheets: breast cancer. Recuperado el 1 de febrero de 2017, de: <http://gco.iarc.fr/doday>
5. International Agency for Research on Cancer [GLOBOCAN]. (2012). Population fact sheets: world. Recuperado el 1 de febrero de 2017, de: <http://gco.iarc.fr/doday>
6. Organización Panamericana de la salud [PAHO]. (2012). Breast Cancer in the Americas. Recuperado el 5 de Febrero de 2017, de: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5041&Itemid=3639&lang=es&Itemid=3639](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5041&Itemid=3639&lang=es&Itemid=3639)
7. GLOBOCAN [IARC]. (2012). Cáncer de mama en las américas. Recuperado de <http://globocan.iarc.fr/>
8. Secretaria de salud. Boletín epidemiológico: México numeralia de cáncer de mama 2013. [Consultado en 2017, febrero 16]. Disponible en <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx>
9. Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2012). México. Recuperado el 26 de enero de 2017, de: [http://www.who.int/cancer/country-profiles/mex\\_es.pdf?ua=1](http://www.who.int/cancer/country-profiles/mex_es.pdf?ua=1)
10. International Agency for Research on Cancer [GLOBOCAN]. (2012). Estimated number of incident cases, females, Mexico (top 10 cancers sites) in 2012. Recuperado el 1 de febrero de 2017, de: <http://gco.iarc.fr/doday>

11. Amanda I. Phipps y Christopher I. Li. (2010). Breast Cancer Biology and Clinical. Christopher I. Li. En Breast Cancer Epidemiology (pp.20-46). New York: Springer.
12. National Cancer Institute (2017). Estadificación. Recuperado Febrero 28 2017, de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/diagnostico-estadificacion/estadificacion>
13. American Cancer Society. (2017). Tratamiento del cáncer de seno. Recuperado el 27 de febrero de 2017, de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/tratamiento/>
14. Organización Panamericana de la Salud. Diagnóstico y tratamiento, control del cáncer: aplicación de los conocimientos. [Consultado en 2017, febrero 28]. Disponible en [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=rdmore&cid=3681&Itemid=40735&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=3681&Itemid=40735&lang=es)
15. L.C. Silva, J. Ferreira-Strixino, L.C. Fontana, A. Rocha Gonsalves, A. Serra, R. Canevari. Molecular analysis of apoptosis pathway after photodynamic therapy in breast cancer: Animal model study 2016 (14); 152-158
16. A. C. KÜhler. Photodynamic therapy. Medical Laser Application 2005 Enero 1; 20: 37-45.
17. C.H Sibata, V.C. Colussi, N.I. Oleinick, T.J Kinsella. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2000; 33: 869-880.
18. A.P. Castano, P. Mroz, M.R. Hamblin. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. Nature reviews cancer 2006 July; 6: 535-543.
19. L.M. Sanabria, M.E. Rodriguez, I.S. Cogno, N.B.R. Vittar, M.F. Pansa, M.J. Lamberti, V.A. Rivarola. Direct and indirect photodynamic therapy effects on the celular and molecular components of the tumor microenvironment. Biochimica et Biophysica Acta 2013 Oct 7; 1835: 36-45.
20. S.M Banerjee, A.J. MacRobert, C.A. Mosse, B. Periera, S.G. Bown, M.R.S. Keshtgar. Photodynamic therapy: inception to application in breast cancer. The breast 2017; 31: 105-113.



21. A.V. Lee, S. Oesterreich, N.E. Davidson. MCF-7 Cells-Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *JNCI Natl Cancer Inst* 2015; 107:7.
22. F. Pu, N. Chen, S. Xue. Calcium intake, calcium homeostasis and health. *Food Science and Human Wellness* 2016; 5: 8-16.
23. V.P. Kale, S.G. Amin, M.K. Pandey. Targeting ion channels for cancer therapy by repurposing the approved drugs. *Biochimica et Biophysica Acta* 2015; 1848: 2747-2755.
24. T.A. Stewart, K. Yapa, G.R. Monteith. Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 2015; 1848: 2502-2511.
25. L. Leybaert, M.J. Sanderson. Intercellular Ca<sup>2+</sup> waves: mechanisms and function. *Physiology* 2012; 92: 1359-1392.
26. B. Brücher, I.S. Jamall. Cell-cell communication in the tumor microenvironment, carcinogenesis, and anticancer treatment. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2014 Jun 25; 34:213-243.
27. L. Matsuuchi, C.C. Naus. Gap junction proteins on the move: connexins, the cytoskeleton and migration. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013 May 18; 1828: 94-108.
28. T.J King, J.S Bertram. Connexins as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005: 1719:146-160.
29. M. Rackauskas, V. Neverauskas, V.A. Skeberdis. Diversity and properties of connexin gap junction channels. *Medicine (Kaunas)* 2010; 46 (1).
30. M. Vinken, E. Decrock, L. Leybaert G. Bultynck, B. Himpens, T. Vanhaecke, V. Rogiers. Non-channel functions of connexins in cell growth and cell death. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1818:2002-2008.
31. E.C. Beyer, G.M. Lipkind, J.W. Kyle, V.M. Berthoud. Structural organization of intercellular channels II. Amino terminal domain of the connexins: sequence, functional roles, and structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1818: 1823-1830.

32. M. Oyamada, K. Takebe, Y. Oyamada. Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013; 1828: 118-133.
33. American Joint Committee on Cancer. (2009). Breast Cancer Staging. Recuperado de <https://cancerstaging.org/references-tools/quickreferences/Documents/BreastSmall.pdf>
34. A. Juarranz, P. Jaen, F. Sanz-Rodriguez, J. Cuevas, S. González. Principios basicos de la terapia fotodinamica. *Clinical and translational oncology* 2008.
35. S.M Banerjee, A.J. MacRobert, C.A. Mosse, B. Periera, S.G. Bown, M.R.S. Keshtgar. Fotosensibilizadores. *The breast* 2017.
36. El-Sabban, Abi-Mosleh and Talhouk,. (2003). A schematic diagram of a gap junction plaque joining the cytoplasm of two adjacent cells (Cell 1 and Cell 2; top panel). Retrieved from [https://www.researchgate.net/figure/7277900\\_fig1\\_Fig-1-A-schematic-diagram-of-a-gap-junction-plaque-joining-the-cytoplasm-of-two](https://www.researchgate.net/figure/7277900_fig1_Fig-1-A-schematic-diagram-of-a-gap-junction-plaque-joining-the-cytoplasm-of-two)
37. T.A. Stewart, K. Yapa, G.R. Monteith. Diagrammatic representation of major  $Ca^{2+}$  influx/efflux/release and resequestration pathways involved in the regulation of  $[Ca^{2+}]_i$  homeostasis in mammalian cells and their associated proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 2015.
38. R. M. Mohammad, I. Muqbil, L. Lowe, C. Yedjou, H. Hsu, L. Lin, M. D. Siegelin, C. Fimognari, N. B. Kumar, Q. P. Dou, H. Yang, A. K. Samadi, G. L. Russo, C. Spagnuolo , S. K. Ray, M.Chakrabarti, J. D. Morre, H. M. Coley, K. Honoki, H. Fujii, A. G. Georgakilas, A. Amedei, E. Niccolai, A. Amin, S.S. Ashraf, W. G. Helferich, X. Yang, C. S. Boosani, G. Guha, D. Bhakta, M. R. Ciriolo, K. Aquilano, S. Chen, S. I. Mohammed, W. N. Keith, A. Bilsland, D. Halicka, S. Nowsheen, A. S. Azmi. Broad targeting of resistance to apoptosis in cáncer. *Seminars in Cancer Biology* 2015; 35: S78-S103.
39. M. Uzu, H. Sato, A. Shimizu, Y. Shibata, K. Ueno, A. Hisaka. Connexin 43 enhances Bax activation via JNK activation in sunitinib-induced apoptosis in

- mesotelioma cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2017; 134: 101-107.
40. D. W. Laird, P. Fistouris, G. Batist, L. Alpert, H. T. Huynh, G.D. Carystinos, M. A. Alaoui-Jamali. Deficiency of Connexin43 Gap Junctions Is an Independent Market for Breast Tumors 1999; 59: 4104 – 4110.
41. J. L. Solan, P.D. Lampe. Connexin 43 phosphorylation – structural changes and biological effects. *Biochemical Journal*, 2009; 419: 261-272.
42. J. L. Solan, P.D. Lampe. Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo. *FEBS Letters*, 2014; 588: 1423-1429.
43. W.J.Gradishar, B. O. Anderson, R. Balassanian, S. L. Blair, H. J. Burstein, A. Cyr, A. D. Elias, W. B. Farrar, A. Forero, S. H. Giordano, M. Goetz, L. J. Goldstein, C. A. Hudis, S. J. Isakoff, P. K. Marcom, I. A. Mayer, B. McCormick, M. Moran, S. A. Patel, L. J. Pierce. Breast Cancer Version 2.2015. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 2015; 13: 448-473.
44. M. Martinez. Techniques for detecting in vitro apoptosis and cell senescence and their importance in health biotechnology. *Revista colombiana de biotecnología* 2009; 2: 152-166.
45. Z. Luksiene. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *MEDICINA*, 2003; 39: 1137-1150.
46. E. Decrock, E. De Vuyst, M. Vinken, M. Van Moorhem, K. Vranckx, L. Van Laeken, M. De Bock, K. D'Herde, CP. Lai, V. Rogiers, WH. Evans, CC. Naus, L. Leybaert. Connexin 43 hemichannels contribute to the propagation of apoptotic cell death in a rat C6 glioma cell model. *Cell Death and Differentiation*, 2009; 16: 151-163.
47. G. Mese, G. Richard, T. W. While. Gap Junctions: Basic Structure and Function. *Journal of Investugative Dermatology*, 2007; 127: 2516-2524.
48. P. Kameritsch, K. Pogoda, U. Pohl. Channel-independent influence of connexin 43 on cell migration. *Biochimica et Biophysica*, 2012; 1818: 1993-2001.

49. I. Mfouo-Tynga, H. Abrahamse. Cell Death Pathways and Phthalocyanine as an Efficient Agent for Photodynamic Cancer Therapy. *Int J. Mol. Sci*, 2015; 16: 10228 – 10241.
50. G. Morciano, S. Marchi, C. Morganti, L. Sbrana, M. Bittremieux, M. Kerckhofs, M. Corricelli, A. Danese, A. Karkucinska-Wieckowska, M. Wieckowski, G. Giorgi, P. Pinton. Role of Mitochondria-Associated ER Membranes in Calcium Regulation in Cancer-Specific Settings. *Neoplasia* (New York, N, Y), 2018; 20(5): 510 – 523.
51. C. Giorgi, M. Bonora, G. Sorrentino, S. Missiroli, F. Polletti, J. M. Suski, F. Galindo Ramirez, R. Rizzuto, F. Di Virgilio, Z. Ester, P. Pandolfi, M. Wieckowski, F. Mammano, G. Del Sal, P. Pinton. P53 at the endoplasmic reticulum regulates apoptosis in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015; 112(6): 1779-1784.
52. F. Pietrantonio, P. Biondani, F. de Braud, et al. Bax expression is predictive of favorable clinical outcome in chemonaive advanced gastric cancer patients treated with capecitabine, oxaliplatin, and irinotecan regimen. *Transl Oncol*, 2012; 5: 155-159.
53. Y. Sun, X. Zhao, Y. Yao, X. Qi, Y. Yuan, Y. Hu. Connexin 43 interacts with Bax to regulate apoptosis of pancreatic cancer through a gap junction-independent pathway. *Int J. Oncol*, 2012; 41: 941-948.