

## RESUMEN

A nivel mundial, el cáncer constituye un importante problema de Salud Pública. Un importante grupo de fármacos empleados en la quimioterapia para combatir esta enfermedad son los fotosensibilizadores, sustancias activadas por un determinado tipo de luz y que son empleadas en la terapia fotodinámica (TFD). El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar la participación de las conexinas en la propagación de las señales generadas desde las células sometidas a TFD y dilucidar la naturaleza de dichas señales. Para realizar este trabajo empleamos células derivadas de un carcinoma de colon en ratón a las que se incubó con el fotosensibilizador (AICIPc 10 $\mu$ M) y que posteriormente se aplicó el estímulo luminoso. Empleando técnicas de microscopía confocal, bioquímica y farmacología estudiamos los cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, óxido nítrico (ON) y el papel de las conexinas. La aplicación de la TFD en una sola célula generó cambios significativos en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, y dichos cambios se propagaron en las células vecinas en una radio de varias micras. La onda de Ca<sup>2+</sup> que se generó se vio disminuida de manera significativa cuando el cultivo celular fue tratado previamente con carbenoxolona 100 $\mu$ M, un bloqueador de gap junctions. La célula sometida a TFD mostró cambios compatibles con muerte celular después de 40 minutos sin embargo, dichos cambios también fueron observados en todas las células alcanzadas por la onda de Ca<sup>2+</sup>, situación que disminuyó cuando las células fueron tratadas previamente con carbenoxolona. El estudio reveló la producción de ON en la célula que recibió la TFD y la señal también se propagó a las células vecinas. Nuestros resultados indican que las conexinas juegan un papel fundamental en la propagación de las señales generadas por la TFD y que su regulación podría ayudar a mejorar el tratamiento contra el cáncer

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de tumores malignos es resultado de una pérdida en la regulación de la proliferación o en una incapacidad por parte de las células de sufrir muerte por apoptosis. Uno de los objetivos de la terapia anticáncer es justamente esta, inducir la apoptosis en las células tumorales (Childs et al., 2014).

El tratamiento para el cáncer es muy variado, la elección del tratamiento adecuado viene determinado por varios factores, incluyendo el tipo, las condiciones generales del paciente y por supuesto cuál sea el objetivo buscado: curarlo, evitar que se extienda, o aliviar los síntomas causados por éste. Dependiendo de todos estos factores, el paciente puede recibir uno o varios de los tratamientos que se mencionan a continuación: Cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia o terapia biológica y en casos muy particulares, el trasplante de células hematopoyéticas. Un importante grupo de fármacos empleados en la quimioterapia son los fotosensibilizadores, sustancias activadas por determinado tipo de luz y que son empleadas en la terapia fotodinámica (TFD) contra el cáncer (Smits y Moor, 2009). Se ha podido apreciar que varios fotosensibilizadores (tales como las ftalocianinas) se localizan en organelas intracelulares, incluyendo la mitocondria y el RE, donde promueven la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y con ello generan la muerte celular (Shahzidi et al., 2011). Cuando el fotosensibilizador es activado, se cree que pudiera desencadenar una vía apoptótica a través de la liberación de Ca<sup>2+</sup> del RE y subsecuentemente la liberación al citoplasma del citocromo c desde la mitocondria (Pinton et al., 2008).

## OBJETIVO GENERAL

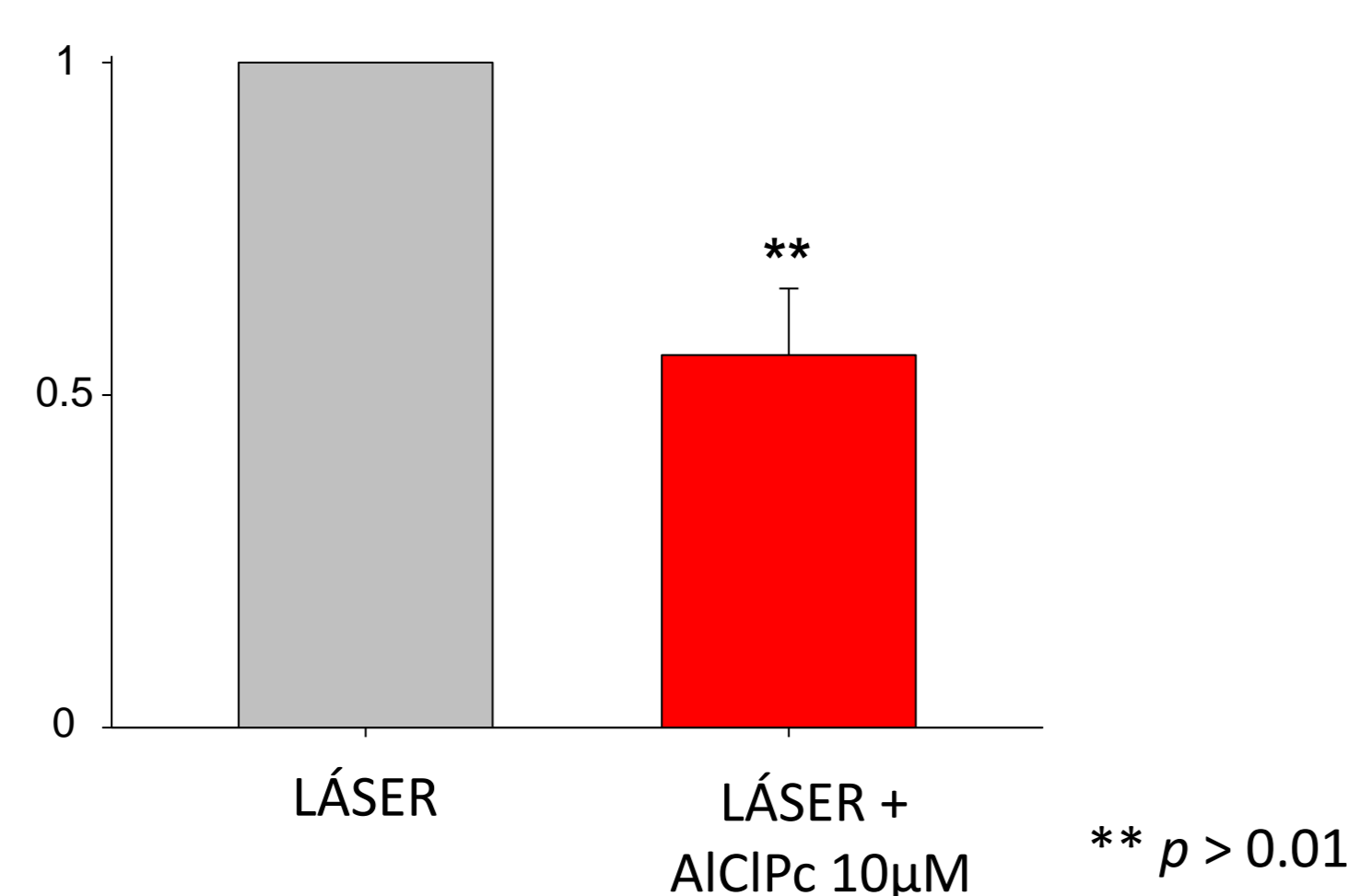
Estudiar la participación de las conexinas en la propagación de las señales de Ca<sup>2+</sup> y óxido nítrico (ON) generadas por la terapia fotodinámica.

## METODOLOGÍA

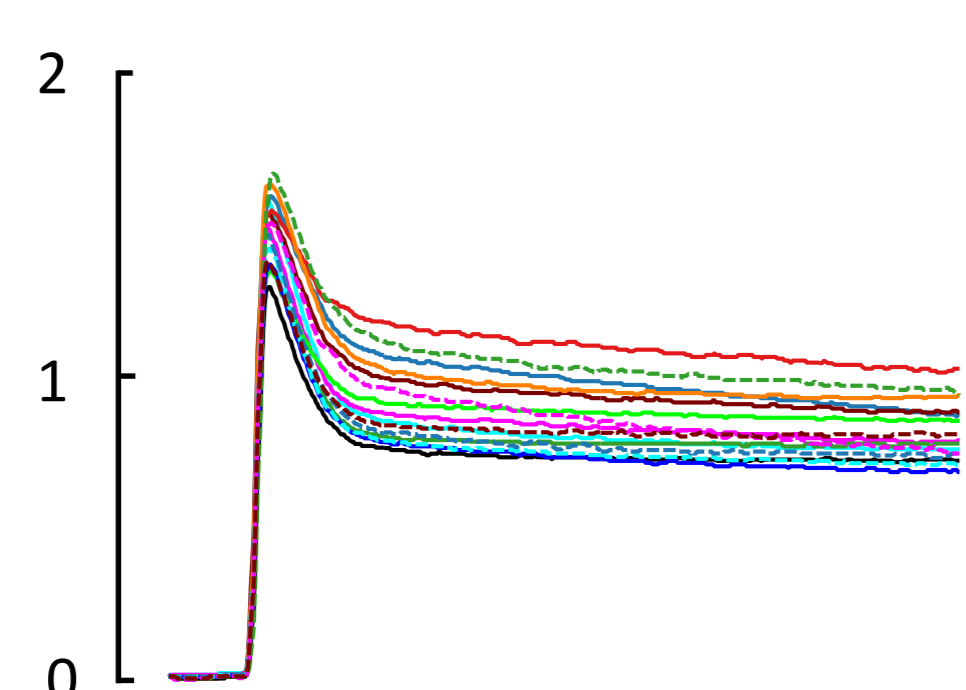
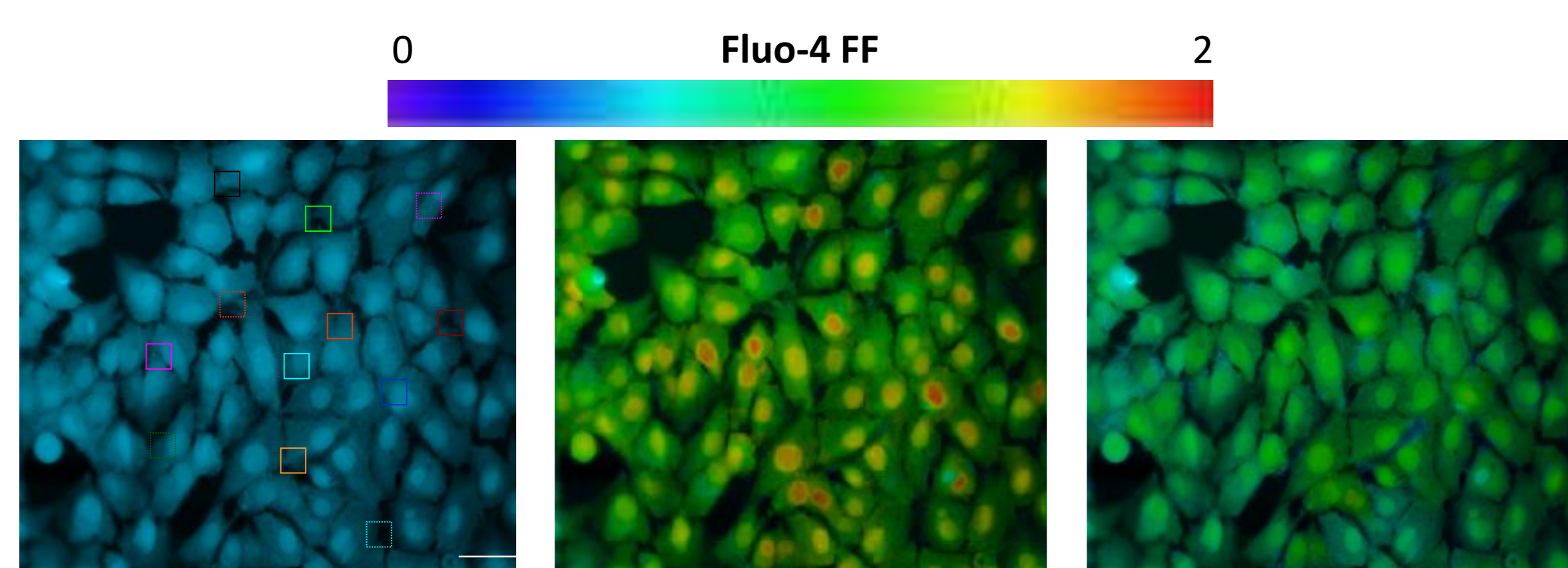
Para realizar este proyecto empleamos la línea celular C26GM (ATCC), que es una línea tumoral que deriva de carcinoma de colon. Empleamos un fotosensibilizador del grupo de las ftalocianinas, Aluminio-Cloro-ftalocianina (AICIPc) y para su activación empleamos un láser o LED que emiten una luz con una longitud de onda de 632 nm por un periodo de 30 segundos. Empleamos el protocolo de citotoxicidad de MTT para valorar el daño celular generado por la fotoestimulación y técnicas de fluorimetría y microscopía confocal que nos permitieron visualizar los cambios generados en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, y en la producción de ON.

## RESULTADOS

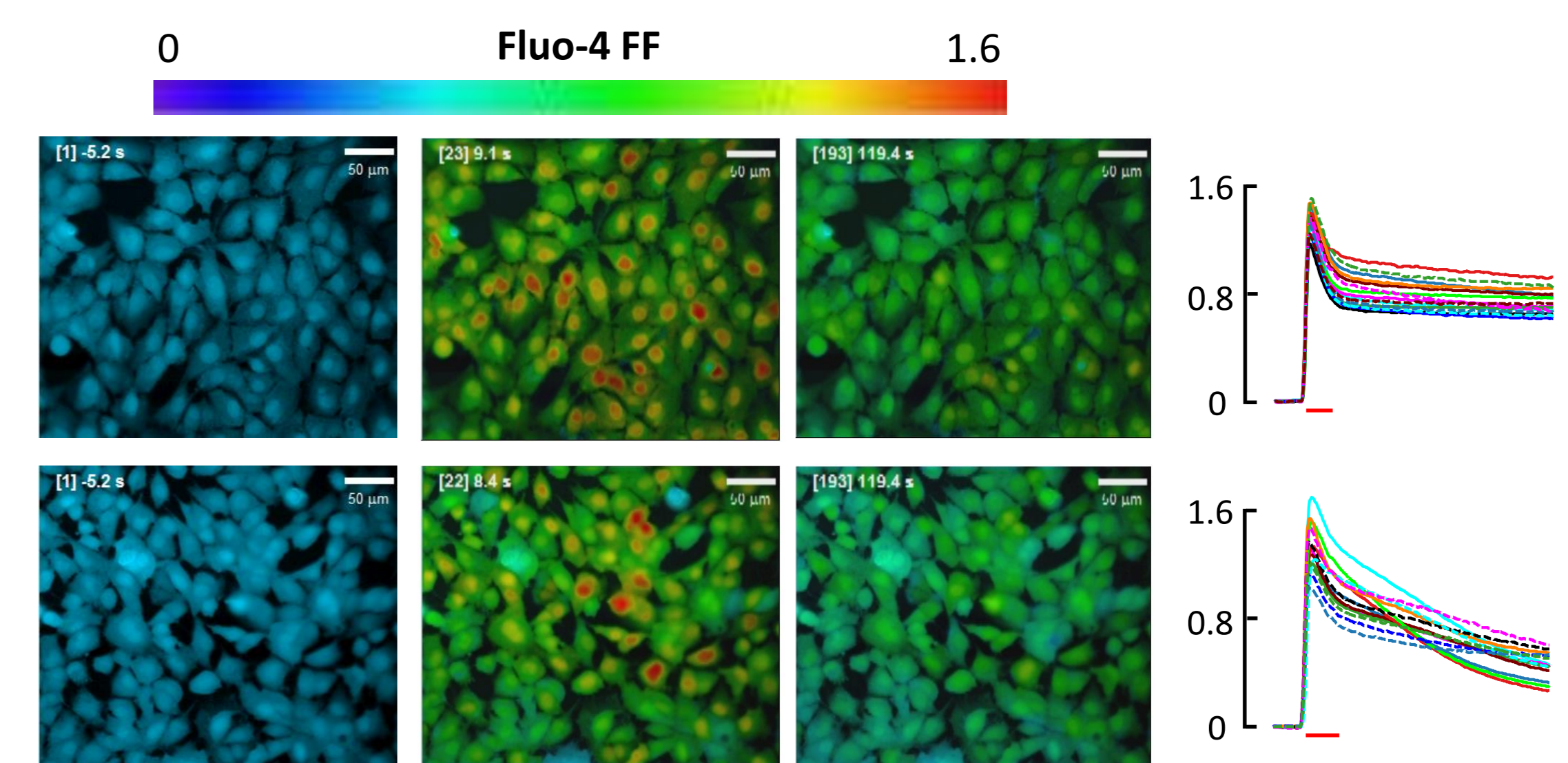
### 1. Ensayo de Citotoxicidad.



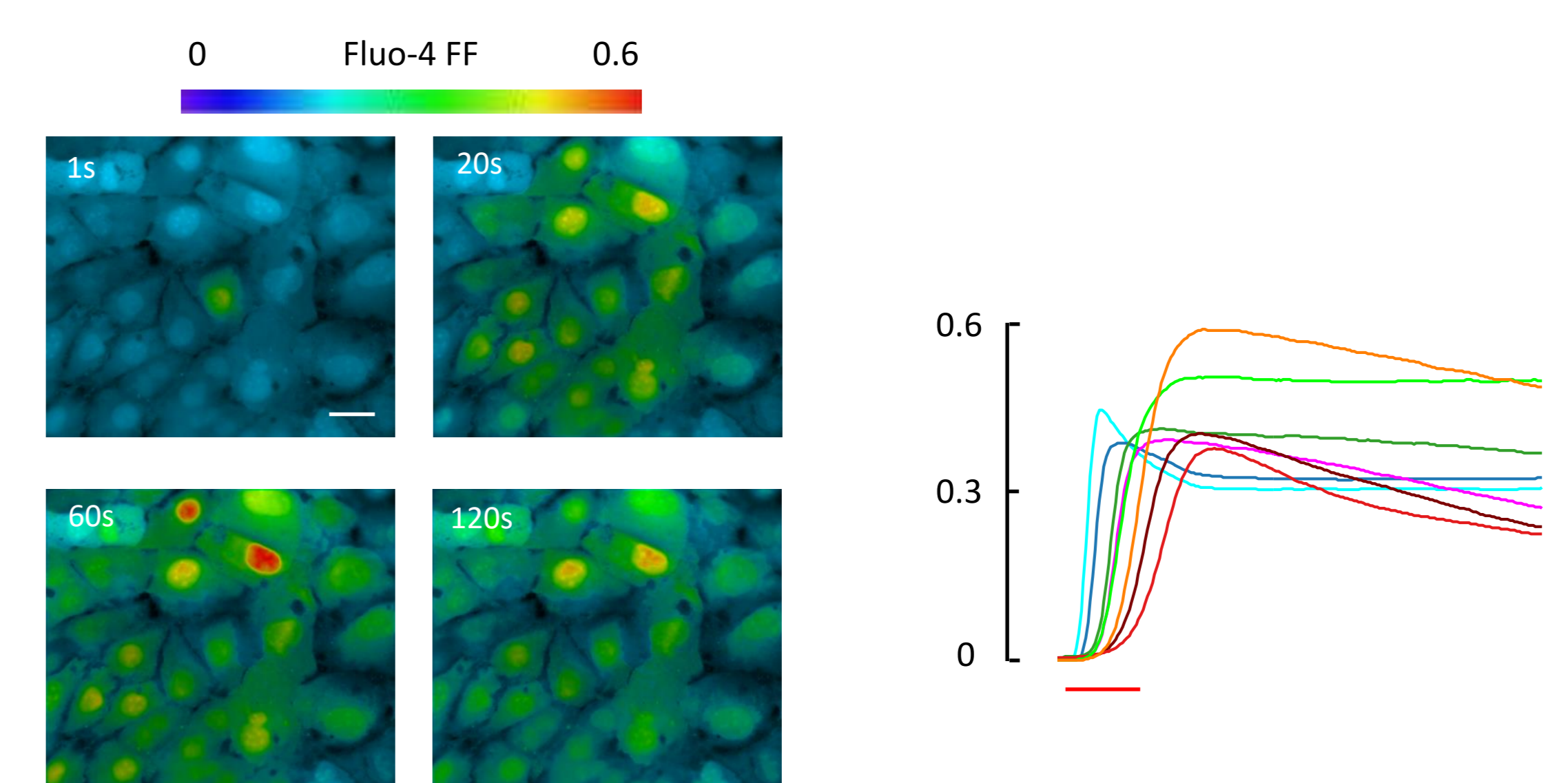
### 2. Incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> secundario a la fotoactivación.



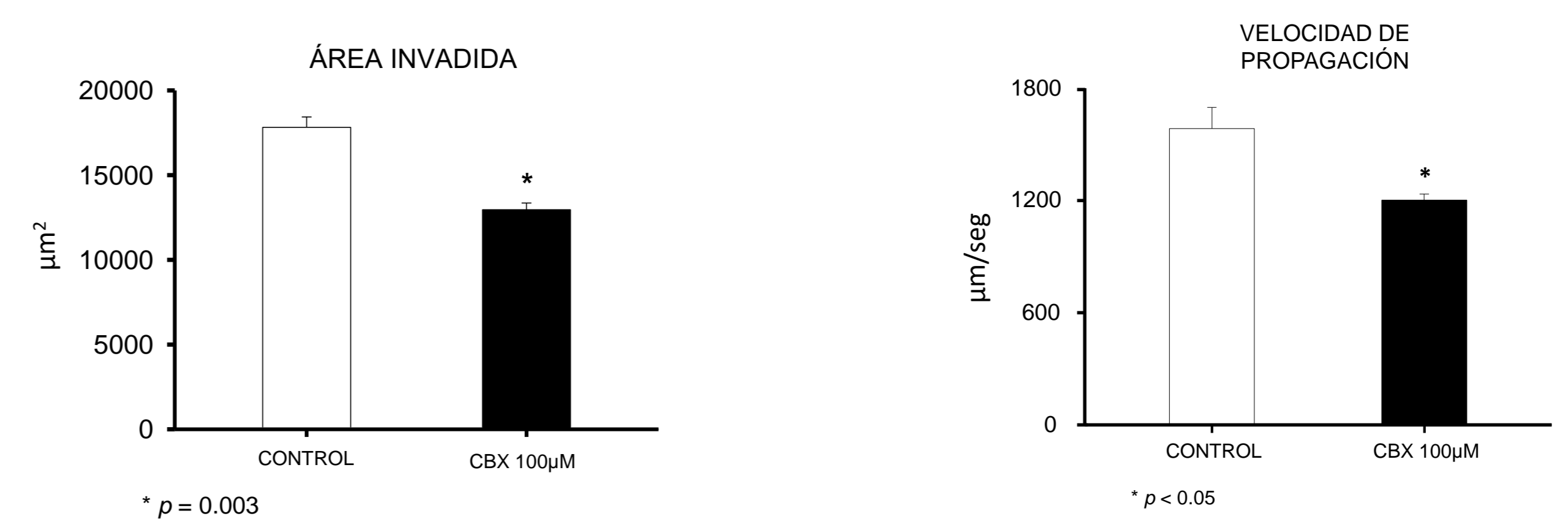
### 3. El efecto no depende del Ca<sup>2+</sup> extracelular.



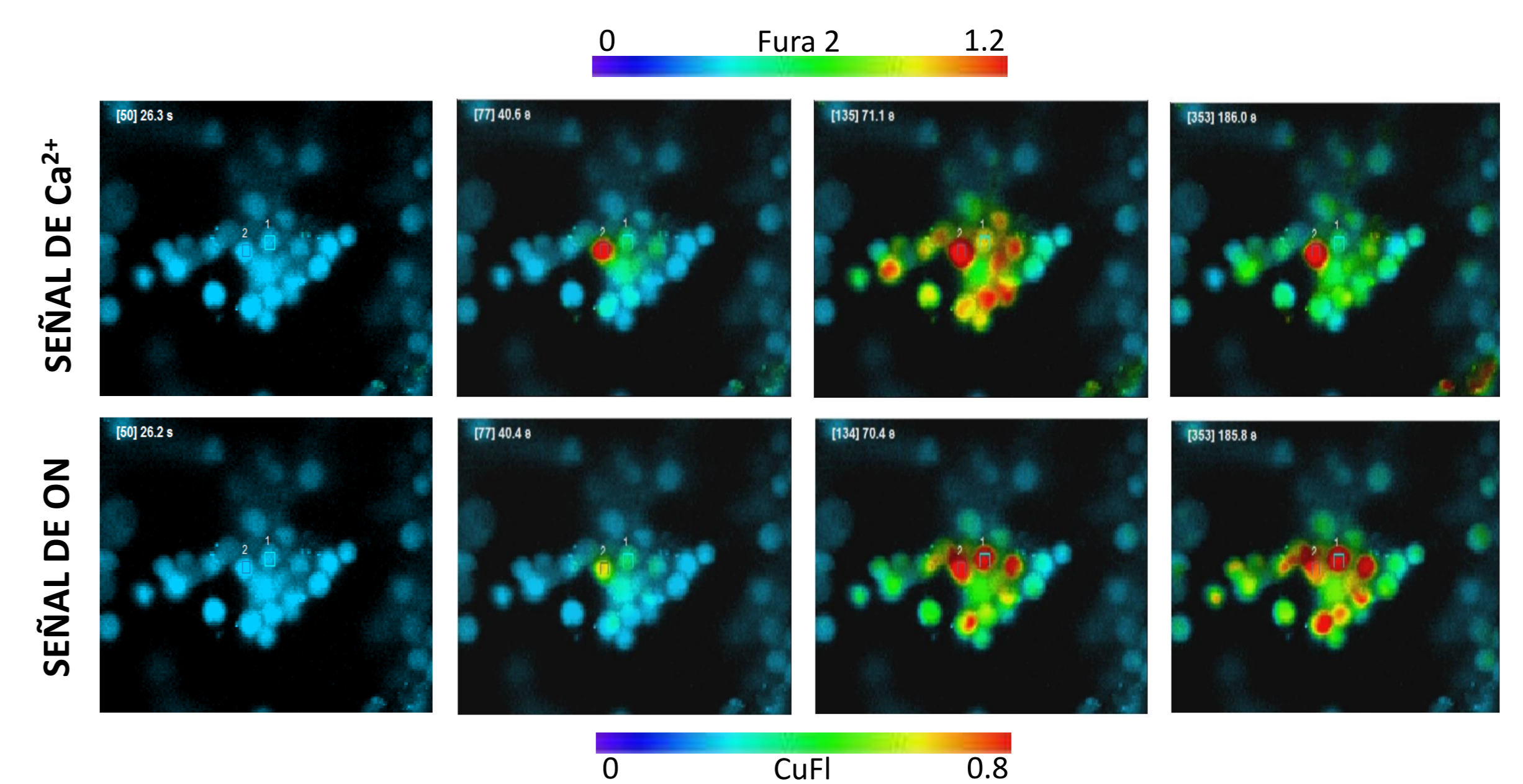
### 4. Propagación de la onda de Ca<sup>2+</sup>, Bystander effect.



### 5. Conexinas y el Bystander effect.



### 6. Óxido Nítrico y el Bystander effect.



## CONCLUSIONES.

La terapia fotodinámica genera incrementos en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y producción de óxido nítrico en las células irradiadas.

La fotoactivación de la AICIPc altera la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> en la célula irradiada e inicia una onda de Ca<sup>2+</sup> que se irradia a las células vecinas.

Las células C26GM se encuentran acopladas por gap junctions y el bloqueo farmacológico de dichas uniones reduce de manera significativa la velocidad con la cuál se irradia la onda de Ca<sup>2+</sup> y la distancia que alcanza dicha señal.

Nuestros resultados sugieren que la manipulación de las conexinas podría potenciar el efecto terapéutico de la terapia fotodinámica si incrementamos su expresión. Al mismo tiempo, también sugieren que una disminución transitoria en la comunicación mediada por gap junctions podría reducir los efectos indeseables producidos por esta terapia cuando se aplica en otras circunstancias, tales como los desordenes vasculares de la retina.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, Capipi J, Van Deursen JM. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? EMBO Rep. 2014 Oct 13. pii: e201439245.
- Shahzidi S, Cunderlikova B, Wiedlocha A, Zhen Y, Vasovic V, Nesland J.M, Peng Q. Simultaneously targeting mitochondria and endoplasmic reticulum by photodynamic therapy induces apoptosis in human lymphoma cells. Photoch Photobiol Sci. 2011; 10: 1773-82.
- Smits T, Moor AC. New aspects in photodynamic therapy of actinic keratoses. J. Photochem Photobiol B. 2009; 96(3): 159-69.
- Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, and Rizzuto R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca<sup>2+</sup> transfer in the control of apoptosis. Oncogene 2008; 27: 6407-18.