



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**“Estudio biofísico de la dinámica de calcio en células de
cáncer de mama inducida por compuestos bioactivos
procedentes de alimentos”**

TESIS

PRESENTA

L.N. PEDRO LÓPEZ FLORES

DIRIGIDO POR

DR. CARLOS SALDAÑA GUTIÉRREZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO.

Marzo del 2022



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

“Estudio biofísico de la dinámica de calcio en células de cáncer de mama inducida por compuestos bioactivos procedentes de alimentos”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta:

LN Pedro López Flores

Dirigido por:

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

SINODALES

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez
Presidente

Firma

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Secretario

Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Vocal

Firma

Dr. Edmundo Mercado Silva
Suplente

Firma

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Suplente

Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Directora de la Facultad de Química

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y
Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
02/Marzo/2022

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que incluí los detalles metodológicos necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'PLF' with a flourish underneath.

Pedro López Flores

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico principalmente a mis padres, por todo el amor y apoyo así mi en cada momento de mi vida, a mis hermanos y hermanas, por estar conmigo cuando más lo necesite, que mi esfuerzo sea inspiración para mis pequeños sobrinos que tanto amo, gracias por compartirme esa energía y alegría, los amo a todos

AGRADECIMIENTOS

- Primeramente, quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Carlos Saldaña (FCN-UAQ) por su comprensión, paciencia y bastos conocimientos, sin el esto no sería posible.
- A la Dra. Verónica Morales Tlalpan (FCN-UAQ) por trasmitirme parte de sus conocimientos y gran ayuda desinteresada en los experimentos de laboratorio.
- A la Dra. Teresa García (FCN-UAQ) por apoyarme y permitirme hacer este gran proyecto.
- Al Dr. Edmundo Mercado Silva (FQ-UAQ), es un excelente docente, gracias por todo.
- Al Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña (FQ-UAQ), muchas gracias por sus aportaciones a este trabajo.
- Al Dr. Eduardo Castaño Tostado (FQ-UAQ), muchas gracias por sus aportaciones a este trabajo.
- Al Laboratorio de Biología Molecular de la FQ-UAQ.
- A la Unidad de Proteogenómica de la UNAM, M. en C. Adriana González Gallardo.
- Al Laboratorio de Biofísica de membranas de FCN-UAQ
- Al Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada (LAVIS-UAQ y LAVIS -UNAM).
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero en estos dos años de posgrado. No. becario: 741610.
- A SEP-CONACyT Número A1-S-26966 de Ciencia Básica por el financiamiento del proyecto.
- Al FODEC UAQ 2019 por el apoyo en el financiamiento parcial del proyecto.
- A mi compañero de Abel Miranda por todo su apoyo, gracias amigo.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	viii

Contenido	
RESUMEN	ix
SUMMARY	x
I. INTRODUCCIÓN	11
II. ANTECEDENTES	13
2.1. Lectinas	13
2.2. Lectinas y su efecto citotóxico en células cancerígenas.	14
2.3. Lectinas del frijol Tépari.....	14
2.4. Calcio (Ca^{2+}) como segundo mensajero en la activación de procesos celulares.....	16
2.5. Dinámica de calcio celular como activador de diferentes mecanismos celulares.....	17
2.7. Dinámica de calcio en células transformadas y no transformadas.....	19
IV. JUSTIFICACIÓN.....	21
VI. OBJETIVOS.....	22
6.1. Objetivo general	22
6.2. Objetivos específicos.....	22
VII. MATERIALES	23
VIII. MÉTODOS.....	23
8.1. Cultivo celular.....	23
8.2. Determinación de concentraciones calcio.	26
8.3. Diseño experimental y Análisis estadístico	28

IX. RESULTADOS	29
9.1. Determinación de los tiempos medios de activación; τ_{ON} y τ_{OFF} de las respuestas máxima de calcio inducidas por diferentes concentraciones de Lectina recombinante (Lr)	29
X. DISCUSIÓN	39
XI. CONCLUSIONES	43
XII. BIBLIOGRAFÍA	45
ANEXOS	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura macromolecular de las lectinas de leguminosas.....	13
Figura 2. Estructura, N-glicosilación e interacciones de interfaz en el tetrámero de la lectina recombinante.....	16
Figura 3. Dinámica de calcio y homeostasis.	19
Figura 4. Ejemplos de remodelación hipotética de la señalización de Ca^{2+} , de células tumorogénicas y no tumorogénicas. Cada representación estilizada de Ca^{2+} representa modelos de diversos aspectos de las vías de señalización de Ca^{2+} intracelular, incluidos (a) vías de entrada de Ca^{2+} (b) vías de salida de Ca^{2+} y c) frecuencia de oscilación de la $[Ca^{2+}]_i$. Fuente: Stewart et al., (2015).	20
Figura 5. Señal transitoria de calcio donde encontramos la τ_{ON} y τ_{OFF}	30
Figura 6. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL en células MCF-12F a concentraciones de 10 μ g/ml.	30
Figura 7. Determinación de transitorios de calcio inducidos por Lr en células MCF-12F a concentraciones de 10 μ g/ml.	31
Figura 8. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL en células MCF-12F a concentraciones de 1 mg/ml.....	31
Figura 9. Determinación de transitorios de calcio inducidos por Lr en células MCF-12F a concentraciones de 1 mg/ml.	32
Figura 10. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL en células MCF-7 a concentraciones de 10 μ g/ml.....	32
Figura 11. Determinación de transitorios de calcio inducidos por Lr en células MCF-7 a concentraciones de 10 μ g/ml.....	33
Figura 12. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL en células MCF-7 a concentraciones de 100 μ g/ml.....	33
Figura 13. Determinación de transitorios de calcio inducidos por Lr en células MCF-7 a concentraciones de 100 μ g/ml.....	34
Figura 14. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL en células MCF-7 a concentraciones de 1 mg/ml.....	34
Figura 15. Determinación de transitorios de calcio inducidos por Lr en células MCF-7 a concentraciones de 1 mg/ml.....	35
Figura 16. Señales transitorias de calcio inducidos por FCL en células MCF-7 a concentraciones de 1 mg/ml.....	35
Figura 17. Señales transitorias de calcio inducidos por FCL en células MCF-12F y MCF-7 a concentraciones de 1 mg/ml.....	36
Figura 18. Señales transitorias de calcio inducidos por Lr en células MCF-12F y MCF-7 a concentraciones de 1 mg/ml.....	36
Figura 19. Señales transitorias de calcio inducidos por Lr en células MCF-12F y MCF-7 a concentraciones de 1 mg/ml.....	37

Figura 20. Determinación de la respuesta al pico, representación gráfica del Mecanismo τ ON y tiempo de activación de la respuesta. 37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de las células MCF-7 y de células no transformadas MCF-12F. 25

Cuadro 2. Tiempo medio de activación; en segundos, al pico de la respuesta FCL y a Lr en células MCF-12F.. 38

RESUMEN

Diversos estudios han mostrado el efecto apoptótico de la fracción concentrada de lectina (FCL) del frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre diferentes líneas celulares cancerígenas. Actualmente se realizan estudios con una lectina recombinante (Lr), la cual es producida a partir de la levadura transformada *Pichia pastoris*. Se desconocen los mecanismos por los que esta lectina tiene efectos apoptóticos, uno de estos mecanismos tiene que ver con la naturaleza de las señales de calcio, ya que éstas tienen mucha relevancia en la regulación de las funciones celulares. Una forma de identificar y comprender la posible remodelación de la homeostasis del calcio en algunos tipos de cáncer es comparar la naturaleza de las señales de calcio en líneas celulares transformadas y no transformadas. El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar las señales de calcio citoplasmático en dos líneas celulares de mama: MCF-7 (células de cáncer de mama) y MCF-12F (células no transformadas), esto en presencia de la lectina recombinante (Lr). Las dos líneas celulares mantenidas en cultivo celular fueron expuestas a diferentes concentraciones de Lr, se determinaron las concentraciones de calcio por medio del fluoróforo Fluo-4 AM para posteriormente analizar estas concentraciones y determinar mecanismos de movilización de calcio ON y OFF. Las concentraciones de calcio citoplasmático tras la aplicación de Lr (1 mg/ml), fueron distintas en ambas líneas, lo que sugiere que la remodelación del calcio tras la exposición a Lr es distinta en las líneas celulares transformadas (MCF-7) en comparación con las no transformadas (MCF-12F). Los resultados obtenidos sugieren que la Lr puede ser capaz de movilizar calcio en ambas líneas celulares de manera diferencial.

Palabras Clave: calcio, lectinas, lectina recombinante, apoptosis, líneas celulares, frijol Tépari.

SUMMARY

Several studies have shown the apoptotic effect of the concentrated fraction of lectin (FCL) from the Tepari bean *Phaseolus acutifolius* on different cancer cell lines. Various studies are currently being carried out with a recombinant lectin (Lr), which is produced from the transformed yeast *Pichia pastoris*. Many of the mechanisms by which this lectin has managed to have apoptotic effects are unknown, one of these mechanisms has to do with the nature of calcium signals since they are highly relevant in the regulation of cellular functions. One way to identify and understand the possible remodeling of calcium homeostasis in some cancers is to compare the nature of calcium signals in transformed and non-transformed cell lines. The present work aimed to characterize cytoplasmic calcium signals in two breast cell lines: MCF-7 (breast cancer cells) and MCF-12F (non-transformed cells), this in the presence of recombinant lectin (Lr). The two cell lines maintained in cell culture were exposed to different concentrations of Lr, calcium concentrations were determined using the fluorophore Fluo-4 AM to later analyze these concentrations and determine mechanisms of calcium mobilization ON and OFF. The cytoplasmic calcium concentrations after the application of Lr (1mg/ml), were different in both lines, which suggests that the remodeling of calcium after exposure to Lr is different in the transformed cell lines (MCF-7) compared to the untransformed (MCF-12F). The results obtained suggest that the Lr may be able to mobilize calcium in both cell lines in a different way.

Key words: calcium, lectins, recombinant lectin, apoptosis, cell lines, Tepary bean.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el tipo de neoplasia más común y la causa más frecuente de muerte entre las mujeres de todo el mundo (Nagini, 2017), por esta razón es necesario desarrollar alternativas terapéuticas para la prevención y/o tratamiento del cáncer de mama. Una alternativa a los quimioterapéuticos convencionales actuales son los compuestos bioactivos de productos naturales, como los obtenidos a partir de alimentos convencionales, ya que tienen propiedades curativas que están siendo ampliamente investigadas para la creación de fármacos y alimentos nutraceuticos (Ji et al., 2009).

En este sentido, las lectinas han sido objeto de estudio desde hace cuatro décadas por sus actividades biológicas, son proteínas que pueden reconocer y unir hidratos de carbono simples o complejos, de manera reversible, específica y conservando su estructura (Lagarda-Diaz et al., 2017; Moreira et al., 1991).

El frijol Tépari *Phaseolus acutifolius* es una leguminosa anual adaptada a las regiones áridas y semiáridas (Jiménez Galindo et al., 2012). García-Gasca y colaboradores (2012) han obtenido una fracción concentrada de lectinas (FCL) a partir de técnicas cromatográficas del frijol Tépari. La FCL contiene múltiples proteínas, sin embargo se identificó que la actividad citotóxica se debe a dos fracciones de proteínas denominadas LN1 y LN2 (Torres-Arteaga et al., 2016). Los estudios realizados por el mismo equipo de trabajo sugieren que la fracción concentrada en lectinas (FCL) presenta un efecto citotóxico mayor sobre células de cáncer, en comparación con células no transformadas, al mismo tiempo presentan baja toxicidad y un buen nivel de tolerabilidad en ratas (Ferriz-Martínez et al., 2015; García-Gasca et al., 2012).

Sin embargo, la purificación de FCL tiene algunos inconvenientes asociados a los sistemas de purificación tradicionales. Por lo anterior, actualmente se utiliza un sistema heterólogo con *Pichia pastoris*, para la producción continua de lectina recombinante (Lr), que ofrece mayores rendimientos y con la misma actividad biológica que LN2, conservando su efecto citotóxico sobre células de cáncer (Martínez-Alarcón, 2019).

Se han descrito distintos mecanismos de acción por los cuales las lectinas ejercen su efecto. En particular, nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en estudiar las respuestas

inducidas a corto plazo, es por ello que nos hemos fijado en la activación de respuestas inducida en los primeros minutos, asociado al papel que tienen los segundos mensajeros.

El calcio es un segundo mensajero que detona y controla varios procesos celulares, entre los que se encuentra la muerte celular programada. Las células cancerígenas realizan modificaciones a la dinámica de calcio y a las proteínas que regulan su concentración en el citosol, de esta forma favorecen su proliferación e inhiben señales que derivan en apoptosis (Dubois et al., 2013; Stewart et al., 2015). Diversos compuestos bioactivos movilizan calcio produciendo cambios en el potencial mitocondrial provocando una disfunción en la mitocondria de células de diferentes tipos de cáncer (Giampazolias y Tait, 2016; Zorov et al., 2014).

Díaz-Betancourt (2018) realizó estudios sobre la dinámica de calcio en líneas celulares MCF-7 y MCF-12F encontrando que la fracción concentrada de lectina induce alteraciones en la homeostasis de calcio (datos no publicados). Estas son las primeras evidencias en que se demuestra que la FCL, es capaz de inducir cambios en la concentración de calcio citoplasmático de manera diferencial en células de cáncer de mama MCF-7 con respecto a células no transformadas MCF-12F. Además, mostraron que existe alteración en la viabilidad celular al ser expuestas a FCL. Es importante señalar que se necesitan estudios para determinar si Lr moviliza calcio como lo hace la FCL, así como caracterizar la activación a corto plazo de las vías de señalización y la expresión de marcadores apoptóticos que llevan a la célula cancerígena a la muerte celular.

Por lo anterior, en el presente trabajo de tesis se investigaron los efectos de la aplicación de diferentes concentraciones de Lr en la movilización de calcio a corto tiempo en las líneas celulares MCF-7 y MCF-12F.

II. ANTECEDENTES

2.1. Lectinas.

Las lectinas se definen como proteínas o glicoproteínas que pueden reconocer y unir hidratos de carbono libres o conjugados (glicoproteínas, glucolípidos o polisacáridos), de una manera reversible, altamente específica y sin modificar su estructura (Figura 1) (Lagarda-Díaz et al., 2017; Moreira et al., 1991). Están distribuidas en una amplia variedad de organismos vivos y son particularmente abundantes en plantas. Durante mucho tiempo, estas proteínas se denominaron hemaglutininas debido a su capacidad para aglutinar glóbulos rojos (Cummins et al., 1982). Han sido clasificadas con base en diferentes criterios, como el origen taxonómico, localización celular, la especificidad del reconocimiento de hidratos de carbono, funciones y estructura. Entre las lectinas estudiadas hasta ahora, las de leguminosas son la familia más grande, están presentes en cantidades altas dependiendo de la genética particular de la especie de leguminosa y de factores ambientales durante su cultivo y se acumulan principalmente en las semillas (Nasi et al., 2009).

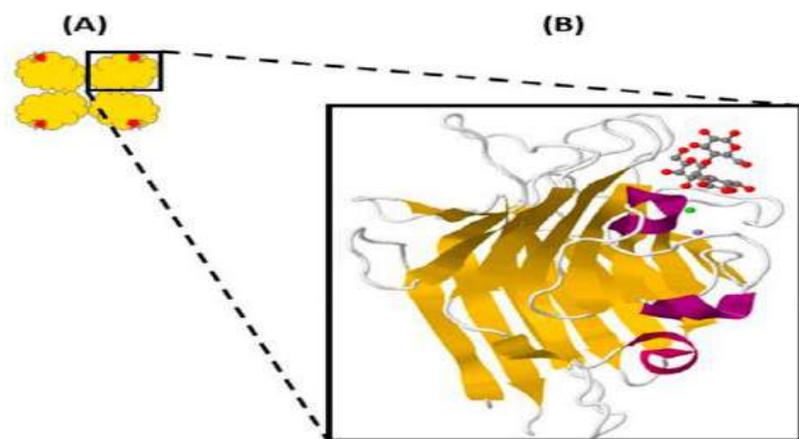


Figura 1. Estructura macromolecular de las lectinas de leguminosas.

(A) tetrámero con dominios de reconocimiento de carbohidratos (rojo); (B) imagen ampliada de monómero con hojas β (amarillo), giros α (púrpura), sitios de unión a metales y dominio de reconocimiento de carbohidratos (Imagen modificada de Protein Data Bank (código de acceso 1GZ9). Fuente: Lagarda-Díaz et al., (2017).

2.2. Lectinas y su efecto citotóxico en células cancerígenas.

El potencial terapéutico de las lectinas se basa en su actividad antitumoral y efectos citotóxicos a través de la inducción a la muerte celular programada como la apoptosis y la autofagia (Fu et al., 2011). De igual forma las lectinas tienen la capacidad adicional de distinguir entre células normales y transformadas que son frecuentemente más sensibles a sus efectos citotóxicos (Schwarz et al., 1999).

2.3. Lectinas del frijol Tépari.

García-Gasca y colaboradores (2012) obtuvieron una fracción de proteína semipura del frijol Tépari, con la que se hicieron diferentes pruebas encontrando un efecto citotóxico diferencial en diferentes líneas celulares, así como como un aumento en la unión celular a las placas de cultivo. A partir de esta fracción semipura se obtuvieron dos fracciones de proteína: una fracción concentrada en lectinas (FCL) y una fracción semipura rica en inhibidores de proteasas, la cuales tenían efectos distintos sobre células cancerígenas (García-Gasta et al., 2012).

Para el 2016 Torres-Arteaga y colaboradores, purificaron y caracterizaron dos fracciones de lectinas LN1 Y LN2 analizando las dos fracciones de proteínas observando que, a pesar de la alta homología en su secuencia, punto isoeléctrico y masa molecular, las fracciones de lectinas mostraban diferencias en su comportamiento biológico, haciendo referencia a su actividad aglutinante, así como, en su efecto citotóxico en células de cáncer de colon. En el 2017 Moreno-Celis y colaboradores realizaron un estudio donde vieron un mayor efecto de la FCL sobre tumores tempranos de cáncer de colon en un estudio *in vivo*, donde se les indujo el cáncer con dos compuestos por separado: 1,2-dimetilhidrazina (DMH) o azoximetano/dextrano sódico sulfato (AOM/DSS). Los resultados mostraron que la FCL presenta efectos antiproliferativos y proapoptóticos relacionados con la vía de transducción

de señales de Akt en su forma activada y un aumento de la actividad de la caspasa 3, pero no a la activación de p53 (Moreno-Celis et al., 2017).

Posteriormente, Moreno-Celis y colaboradores (2020), realizaron un estudio *in vitro* con la fracción de lectina, en este estudio se buscó obtener evidencia que mostrará el efecto que tenía la FCL al activar mecanismos específicos de muerte celular programada. En el estudio se obtuvieron varios resultados entre los que destaca la determinación de concentraciones letales de lectina en diferentes líneas celulares de cáncer de colon en donde se evaluó apoptosis relacionada con caspasas y se descartó la inducción de necrosis. Además, se evaluó la expresión de los genes p53 y proteínas relacionadas con la apoptosis Bcl-2, mostrando mayor nivel de expresión en las primeras 8 horas seguidas de una importante disminución a las 24 h.

Finalmente, se inició con la producción de una lectina recombinante (Lr), ya que el principal inconveniente del uso de la FCL era que su purificación a partir de semillas de frijol es lenta, costosa y proporciona bajos rendimientos. Por ello para obtener una cantidad mayor de lectina de frijol Tépari, se desarrollaron diferentes sistemas para producir la lectina (Martínez-Alarcón et al., 2018; Martínez-Alarcón et al., 2019).

Es importante señalar que las lectinas de frijol Tépari son glicoproteínas complejas y que las modificaciones postraduccionales pueden influir en el plegamiento de las proteínas y en consecuencia se altera la función biológica de la glucoproteína, por lo que se necesitó buscar nuevas alternativas de producción. Como las bacterias carecen de orgánulos para el procesamiento postraducciona, las levaduras son el sistema más común para la expresión de glicoproteínas, como las lectinas de leguminosas (Martínez-Alarcón et al., 2019).

Martínez-Alarcón y colaboradores (2020) encontraron un sistema eficiente a partir de la levadura *Pichia pastoris* para la producción de una lectina recombinante con potencial anticancerígeno con un rendimiento adecuado para proceder con ensayos de citotoxicidad *in vitro* en células cancerígenas y realizar pruebas *in vivo* (Martínez-Alarcón et al., 2020). En la Figura 2 se muestra la estructura de la lectina recombinante de frijol Tépari.

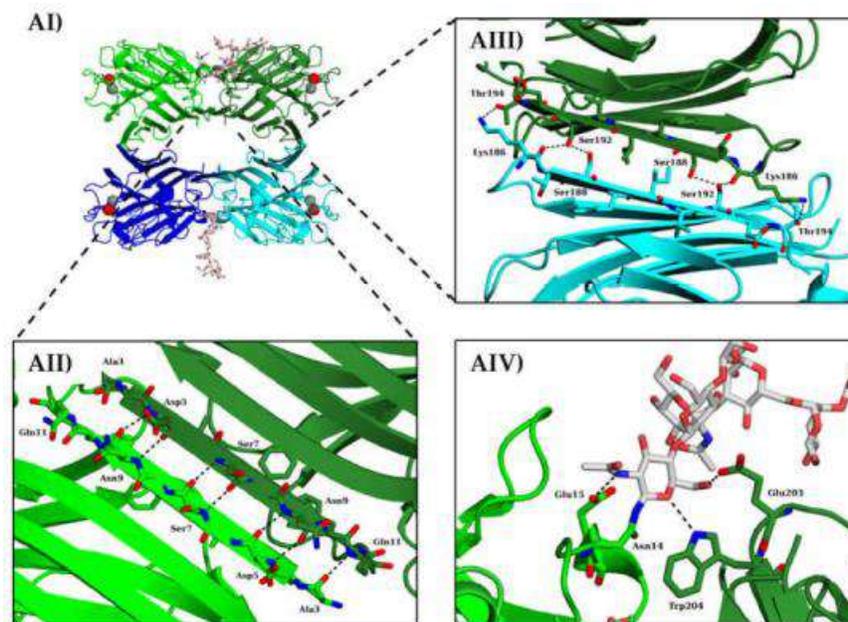


Figura 2. Estructura, N-glicosilación e interacciones de interfaz en el tetrámero de la lectina recombinante. (AI) tetrámero rTBL-1 coloreado por cadenas con cadenas A, B, C y D en verde claro, verde oscuro, azul oscuro y azul claro, respectivamente, con Ca^{2+} representado en esferas rojas y Mn^{2+} representado en esferas grises. (AII) Estabilización interacciones de la interfaz entre las cadenas A y B. (AIII) Interacciones estabilizadoras de la interfaz entre B y cadenas. (AIV) Interacciones GlcNAc en la interfaz de dos cadenas adyacentes. (B) Estructura de los N-glicanos identificados en cada monómero de rTBL-1 (Martínez-Alarcón et al., 2020).

2.4. Calcio (Ca^{2+}) como segundo mensajero en la activación de procesos celulares.

Históricamente, el papel del ion Calcio (Ca^{2+}) como un marcador de la muerte celular se remonta a la observación de Fleckenstein de que la entrada de Ca^{2+} en exceso a los cardiomiocitos conlleva a la patología cardíaca después de la isquemia (Fleckenstein et al., 1977). Subsecuentes estudios enfatizaron la importancia general de este hallazgo, ya que tanto la sobre estimulación de receptores como muchos agentes citotóxicos fueron encontrados como causantes de la entrada letal de Ca^{2+} dentro de la célula. (Orrenius et al., 2003).

Un gran número de estímulos influyen en el incremento de la concentración del Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y la liberación de Ca^{2+} del Retículo Endoplásmico (RE); por lo tanto, las células están constantemente trabajando para mantener el correcto gradiente de concentración. En condiciones fisiológicas, los estímulos generalmente promueven el incremento en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de forma lenta y transitoria, bajo condiciones patológicas, variaciones

en el $[Ca^{2+}]_i$ inducido por estos estímulos son más pronunciados y sostenidos. En particular, durante la muerte celular programada, especialmente la apoptosis, el $[Ca^{2+}]_i$ es incrementado de forma dramática. Como consecuencia de ello, la mitocondria introduce grandes cantidades de Ca^{2+} , dando pie a la inducción de la apoptosis (Harr et al., 2010).

En el metabolismo del Ca^{2+} están implicadas múltiples moléculas reguladoras y desreguladoras que van a actuar dependiendo de señales y funcionamiento celular. La mitocondria es un organelo celular clave, ya que el Ca^{2+} mitocondrial juega un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis y participa en el metabolismo celular, control electroquímico del Ca^{2+} citosólico, funciones secretoras, supervivencia celular, proliferación, migración y muerte celular (Marchi y Pinton, 2016).

Recientemente se descubrió que existe un complejo macromolecular que forma poros en la membrana mitocondrial y reguladora de subunidades que sirven para la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, y no una proteína individual como antes se creía (Marchi y Pinton, 2014). Por lo tanto, podemos decir que la naturaleza dual del Ca^{2+} , un elemento con carga y un efector bioquímico, lo hacen uno de los factores más versátiles para lograr una gran variedad de diferentes eventos celulares, desde la regulación metabólica hasta el control del ciclo celular y diferenciación (Berridge et al., 2003).

2.5. Dinámica de calcio celular como activador de diferentes mecanismos celulares.

El calcio es un segundo mensajero que regula muchas funciones celulares, entre ellas, la exocitosis, proliferación y la autodestrucción ordenada de la célula. La dinámica de calcio en las células, tiene un efecto transitorio en función del tiempo (Figura 3). Todos aquellos mecanismos que están asociados al incremento de calcio en el citoplasma se conocen como mecanismos ON; en ellos se incluyen aquellos que permiten la entrada de calcio a partir de la membrana plasmática (entrada capacitiva), así como aquellos que inducen la salida de calcio de reservorios intracelulares (denominada como liberación de calcio). Por otra parte, todos aquellos que implican que la concentración de calcio disminuya en el citoplasma, se conocen como mecanismos OFF (que incluyen la extracción de calcio a

través de la membrana plasmática, así como la reincorporación del catión divalente a reservorios intracelulares).

Los mecanismos ON se activan al recibir un estímulo que inicia la entrada de calcio capacitiva y la liberación de éste a partir de reservorios intracelulares. La activación de diversos procesos celulares en espacios temporales que van de microsegundos hasta horas. Los mecanismos OFF permiten la salida de calcio hacia el espacio extracelular, así como la recaptura hacia espacios intracelulares llevando la concentración de calcio citoplasmático a niveles basales (Berridge et al., 2003). En células normales, la concentración citoplasmática de Ca^{2+} está en el rango de los nM, sin embargo, su distribución no es homogénea, ya que se ejerce un estricto control sobre este segundo mensajero para mantener la homeostasis. El Ca^{2+} está presente en altas concentraciones en los llamados reservorios intracelulares, principalmente en el retículo endo/sarcoplásmico (ER/SR) y el aparato de Golgi donde las concentraciones oscilan entre 300 y 1000 μM (Bonora et al., 2013; Brini et al., 1998). En el citoplasma, matriz mitocondrial y luz peroxisomal se mantienen concentraciones de Ca^{2+} muy bajas de 100 a 500 nM, ya que en estos sitios es donde se ejerce la señalización (Rizzuto et al., 1992).

En mecanismos específicos como la apoptosis celular se producen variaciones sostenidas y pronunciadas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (calcio intracelular citoplasmático) (Berridge et al., 2003; Danese et al., 2017). En las células cancerígenas la dinámica de calcio y la expresión de las proteínas implicadas en su regulación se ven alteradas, de tal manera que los estímulos pueden producir una elevación sostenida de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, como consecuencia un incremento de calcio más prologado, que puede favorecer la proliferación celular. La célula también puede responder acortando el tiempo de aumento de calcio citoplasmático para evadir señales de activación de muerte celular haciendo más eficaz la salida y la recaptura por parte de los reservorios intracelulares (Dubois et al., 2013; Stewart et al., 2015).

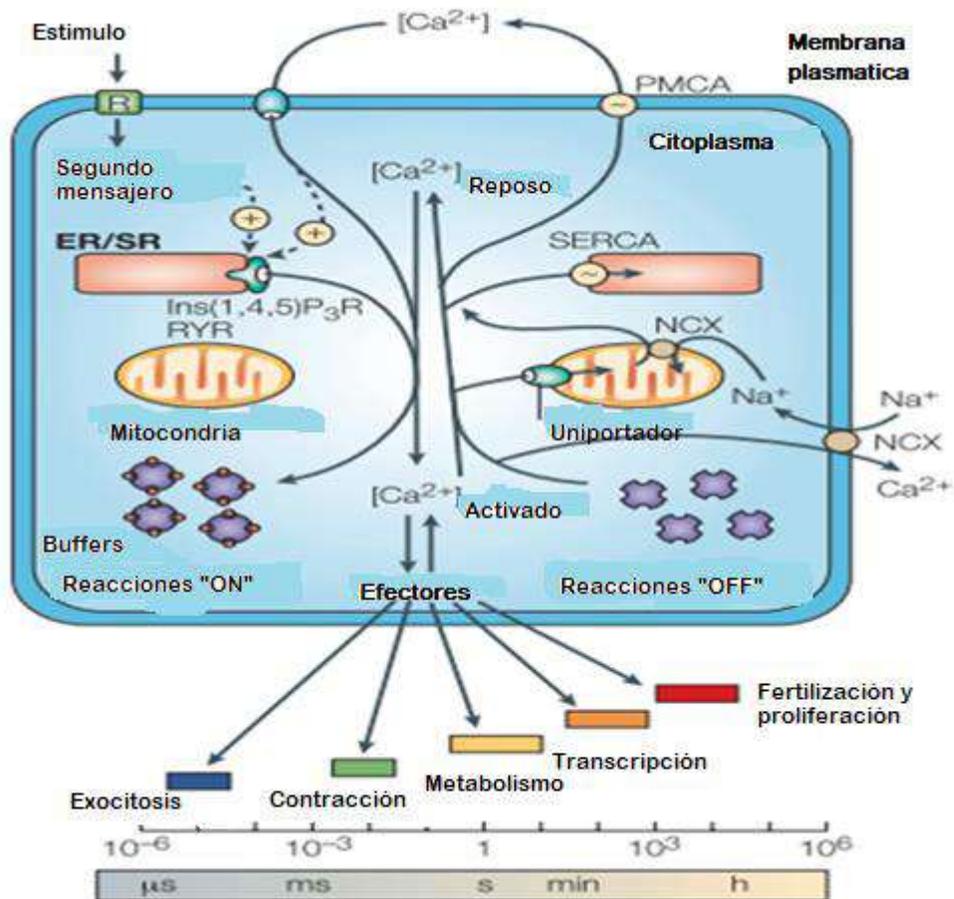


Figura 3. Dinámica de calcio y homeostasis. Los mecanismos ON se activan al recibir un estímulo que inicia la entrada capacitiva de calcio y la liberación de éste a partir de reservorios intracelulares, activando diversos procesos celulares, en un periodo de tiempo de microsegundos hasta horas. Los mecanismos OFF permiten la salida de calcio intracelular hacia el espacio extracelular y la recaptura hacia espacios intracelulares llevando la concentración de calcio citoplasmático a niveles basales. Fuente: Tomado y modificado de Berridge, et al. (2003).

2.7. Dinámica de calcio en células transformadas y no transformadas.

Los estudios sobre disrupción de la homeóstasis de calcio en donde se analiza las señales de calcio tanto en células transformadas como en no transformadas Figura 4 y la relación que guarda con la muerte celular programada en diferentes líneas celulares al someter a estas a diferentes estímulos como lo son compuestos bioactivos (principalmente fenoles) han sido reportadas ampliamente. Estos estudios permiten dilucidar si la muerte de la célula activada por los compuestos fenólicos está relacionada con la disrupción de la homeostasis de calcio, así como determinar la vía de apoptosis (mitocondrial o citoplasmática) y la

caracterización de vías de señalización, mediante pruebas moleculares y celulares. De esta forma, se puede conocer más sobre los mecanismos sobre los cuales los compuestos ejercen su acción lo que permitiría el diseño de fármacos, suplementos y productos nutraceúticos con mayor eficacia para el tratamiento y prevención del cáncer (Lim et al., 2019; Lim et al., 2017; Yeh et al., 2017).

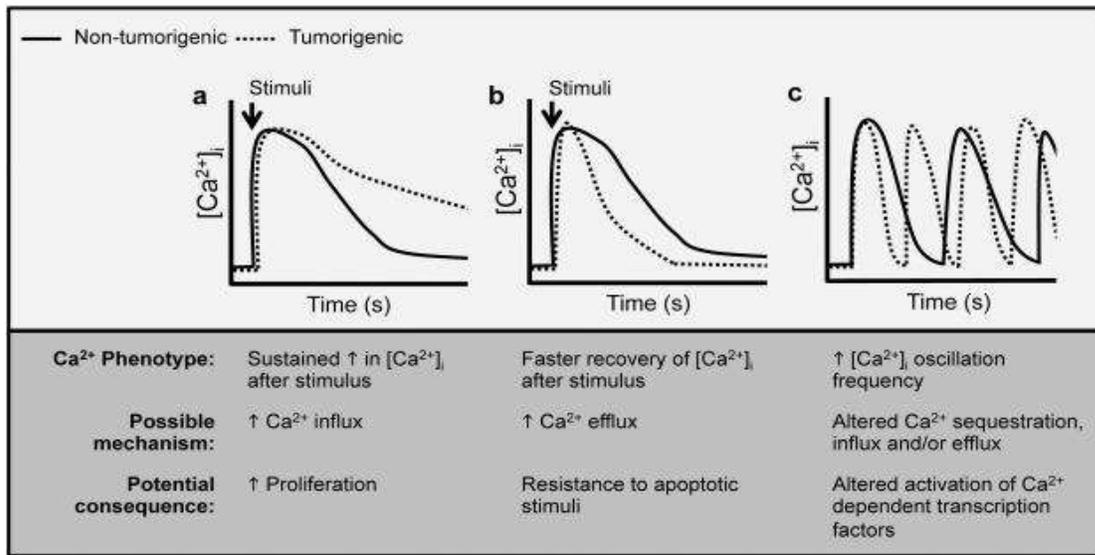


Figura 4. Ejemplos de remodelación hipotética de la señalización de Ca²⁺, de células tumorigénicas y no tumorigénicas. Cada representación estilizada de Ca²⁺ representa modelos de diversos aspectos de las vías de señalización de Ca²⁺ intracelular, incluidos (a) vías de entrada de Ca²⁺ (b) vías de salida de Ca²⁺ y c) frecuencia de oscilación de la [Ca²⁺]_i. Fuente: Stewart et al., (2015).

IV. JUSTIFICACIÓN

Los mecanismos de acción de los efectos Citotóxicos de la FCL de frijol Tépari han sido estudiados a partir de las 8 a 72 h, así como para la Lr pero existen pocos estudios que muestren el efecto en los primeros segundos. Se han propuesto varios mecanismos que pueden llevar a la activación de la muerte celular programada, dependiendo de las propiedades químicas de las lectinas, las vías celulares para producir la muerte celular pueden ser diferentes. La movilización de calcio intracelular está relacionada con la activación de procesos de muerte celular.

Se ha sugerido que la fracción concentrada de lectina (FCL) moviliza calcio citoplasmático en las líneas celulares MCF-7 Y MCF-12F. Estos estudios han mostrado que la interacción con membranas celulares y la determinación de concentraciones de calcio citoplasmático permiten desarrollar un modelo hipotético para explicar los mecanismos activados en los primeros minutos previos a la aparición de señales apoptóticas de la FCL (Galicia-Castillo, 2021).

Concretamente, aún se desconoce si la Lr, es capaz de movilizar calcio en líneas celulares transformadas y no transformadas. Este estudio permitirá determinar las concentraciones a las que la lectina recombinante, modifica los niveles de calcio citosólico, en ambas líneas celulares (MCF-7 y MCF-12F), además de que se podrá ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de acción de Lr para producir la muerte selectiva de células cancerígenas. Una vez obtenido nuestros resultados esperamos que nuestros experimentos pueden llevarse a otras líneas celulares, ampliarse y combinarse con otros experimentos a nivel molecular hasta el desarrollo de fármacos con efectos anticancerígenos.

V. HIPÓTESIS

La Lr (lectina recombinante) de frijol Tépari inducirá la movilización de calcio citoplasmático; dosis dependiente, en las líneas celulares MCF-7 y MCF-12F.

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Caracterizar las señales de calcio citoplasmático en dos líneas celulares de mama MCF-7 (células de cáncer de mama) y MCF-12F (células no transformadas) en presencia de diferentes concentraciones de lectina recombinante (Lr).

6.2. Objetivos específicos

1. Determinar si la Lr es capaz de movilizar calcio de manera dosis dependiente, en las líneas celulares MCF-7 y MCF-12F tras un tratamiento con Lr por medio de sondas intensiométricas como el indicador Fluo-4 AM.
2. Realizar el análisis biofísico de los tiempos de la activación de la respuesta a Lr capaces de inducir cambios en las concentraciones.

VII. MATERIALES

Los reactivos utilizados en el diseño experimental de este estudio fueron obtenidos de las siguientes empresas: Histopaque-1119 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.). Suero Fetal Bovino (FBS), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) de Gibco® (Gaithersburg, USA), estreptomycin, penicilina, Fluo-4AM™ de Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), solución Krebs y ácido plurónico.

VIII. MÉTODOS

8.1. Cultivo celular.

Para el cultivo de las líneas de células de mama se utilizó la técnica reportada por Saldaña y colaboradores (2009) y Díaz- Betancourt (2019). La línea celular de cáncer de mama MCF-7 (ATTC® HTB-22™) y la línea no transformada a cáncer MCF-12F (ATTC® CRL-10783™) fueron proporcionadas por la unidad de proteogenómica del INB, UNAM campus Juriquilla (Cuadro 1). Las células fueron sembradas en cajas Petri en medio DMEM (suplementado con 5% de FBS y 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml estreptomycin), se mantuvieron a una temperatura de 37°C, con una atmosfera de 5%CO₂ y 95%O₂ (Saldaña et al., 2009).

El subcultivo se realizó cada dos días para mantenerlas en confluencia las células de acuerdo a la siguiente metodología(ver Figura 5):

1. Se puso a baño María a una temperatura de 37°C, el medio DMEM, la tripsina y el verseno.
2. Posteriormente se observaron las células al microscopio para revisar la confluencia de cánceras células.
3. Una vez revisada la confluencia de mamalas células, se procede a aspirar el medio de las células.
4. Posteriormente agregamos 1ml de PBS y 1ml de verseno.
5. Después se pasa al proceso de tripzinización para despegar las células de la caja Petri, una vez hecho esto se inactiva la tripsina con el medio DMEM.
6. El paso final es sembrar las células en los vidrios.

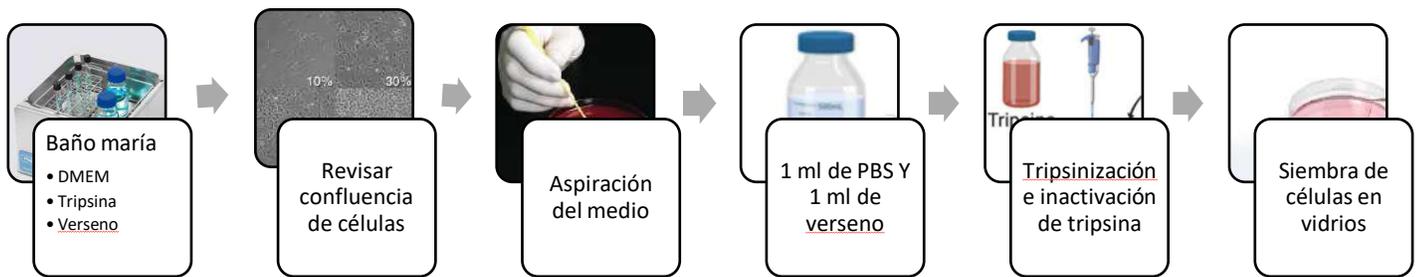


Figura 5. Descripción de procesos de subcultivo de células MCF-7 Y MCF12F.

En la Tabla 1 se describen algunas de las características principales de las líneas celulares utilizadas.

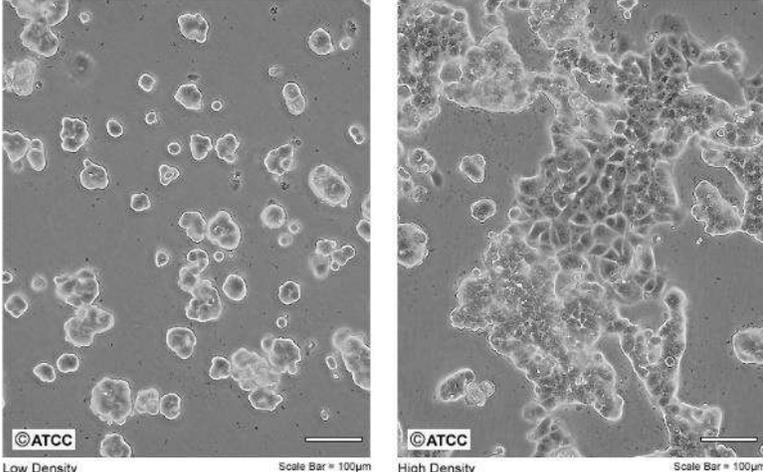
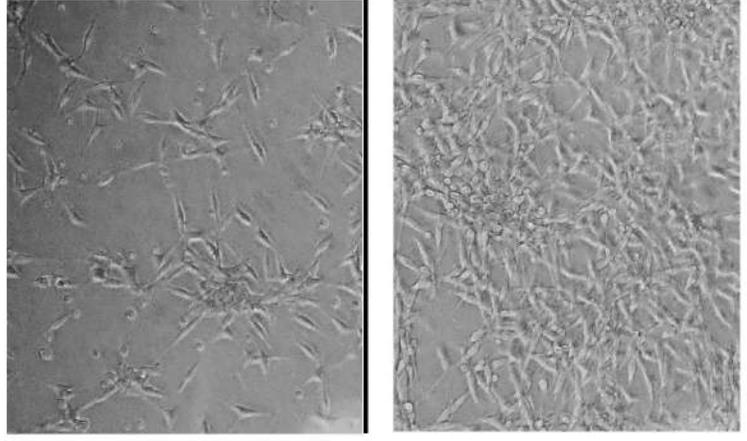
Línea celular MCF-7	Características
<p>ATCC Number: HTB-22 Designation: MCF-7</p>  <p>Low Density Scale Bar = 100µm High Density Scale Bar = 100µm</p>	<p>Humano, <i>Homo sapiens</i> Tejido mamario; derivado de sitio metastásico: efusión pleural. Adenocarcinoma Epitelial</p>
Línea celular MCF-12F	Características
	<p>Humano, <i>Homo sapiens</i> Tejido mamario, pecho. Epitelial</p>

Tabla 1. Descripción de las células MCF-7 y de células no transformadas MCF-12F.

El cultivo de células se hizo de acuerdo al manual de la ATCC. El medio base fue DMEM formulado por ATCC, número de catálogo 30-2007. Se sembraron 3×10^4 células y se preparó el medio de crecimiento completo agregado suero fetal bovino (SFB) hasta una concentración final del 10%.

Las células fueron donadas por la Dra. Carmen Aceves y la Dra. Evangelina Delgado del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

8.2. Determinación de concentraciones calcio.

Los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) fueron registrados después de que las células fueron sembradas sobre portaobjetos de vidrio con una confluencia 80-100% por 24 h (ver Figura 6). Se incubaron las células MCF-12F y MCF-7 por 15 minutos a temperatura ambiente con 5 μM de Fluo4-AM (Thermo Fisher, No. F14201) en solución de Krebs (KS): NaCl 150 mM, KCL 1 mM, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 2 mM, Glucosa 4 mM, y HEPES 10 mM, pH 7.4, suplementado con 0.5% de BSA y 0.01% de ácido plurónico. Las células se lavaron dos veces con KS para eliminar el Fluo4-AM extracelular. Las células cargadas en los vidrios se observaron y colocaron en un microscopio MVX 10 Olympus con una amplificación de 630 aumentos, y una cámara XM10 Olympus, con una velocidad de captura de una imagen por segundo. Se realizaron mediciones fluorescentes utilizando un cubo de fluorescencia de GFP.

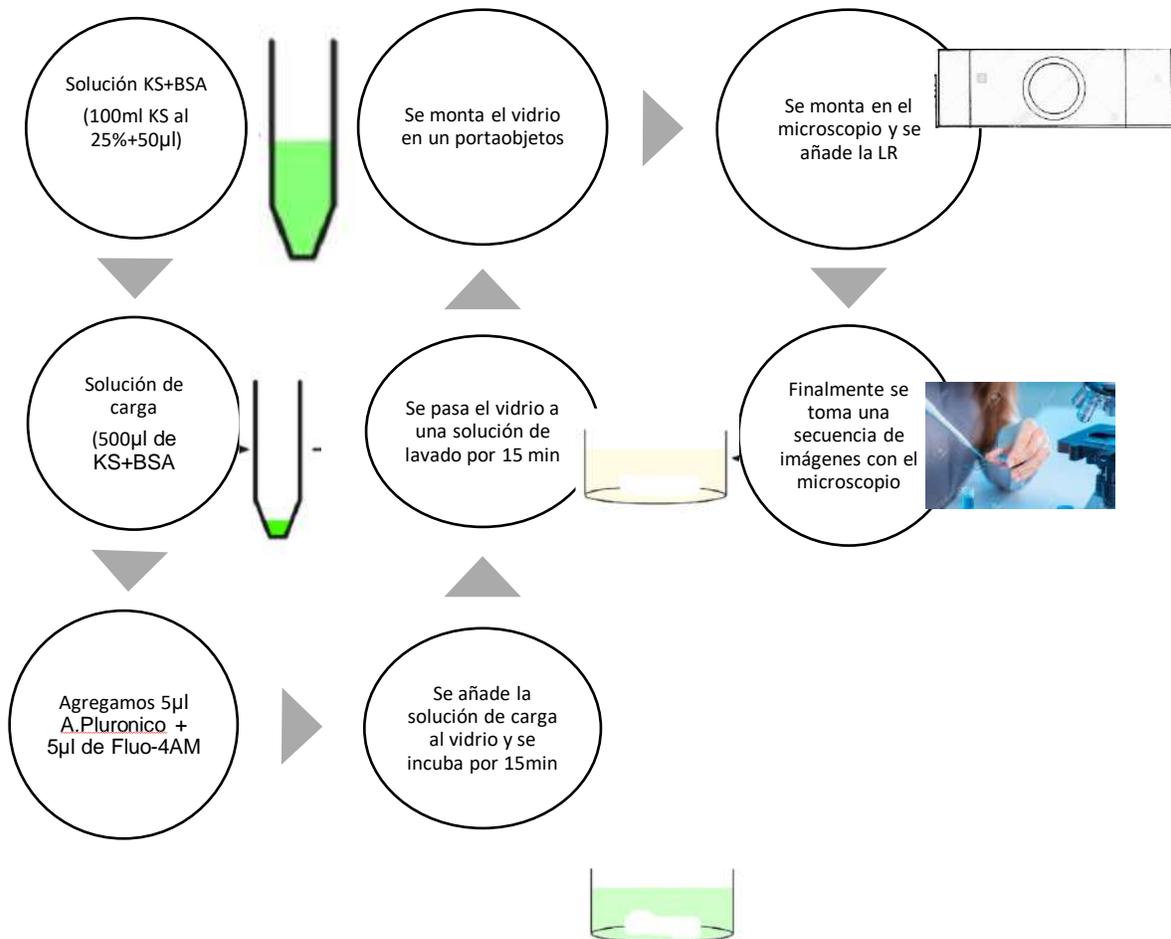


Figura 6. Procedimiento de carga de células al microscopio.

La captura de imágenes (*frames*) en tiempo real de las células tratadas con la FCL, se obtuvieron con el programa Olympus Cell P. Las capturas de imágenes se salvaron en formato avi, y luego fueron transformados a formato de secuencia (seq) con el programa Image ProPlus versión 6.0. En el programa Image J se realizó el análisis de las regiones de interés (ROIs) del campo visual de las células para obtener los datos cuantitativos de los cambios de la intensidad de la fluorescencia reportadas como Unidades de Fluorescencia Arbitraria (UFAs), para posteriormente analizar y graficar estos transitorios en el programa OriginPro 2017, en donde se reporta la media de las UFAs de los ROIs

seleccionados a través del tiempo de las diferentes concentraciones de FCL utilizadas (Saldaña et al., 2009).

8.3. Diseño experimental y Análisis estadístico .

Se llevó a cabo un diseño experimental con dos factores.

Factores:

1. La línea celular

Factor: línea celular: con dos niveles: la línea celular MCF-7 Y MCF-12F.

2. Lectina recombinante

Factor: lectinas: con 3 niveles: Concentraciones 10 µg/ml, 100 µg/ml, 1 mg/ml.

Variable dependiente:

A. Nivel de calcio en el citosol, medido en unidades arbitrarias de fluorescencia.

Unidad experimental: Nuestra unidad experimental fue una caja Petri de 6cm, con 3.2×10^6 células.

Unidad de medición: La unidad de medición fue nuestro campo de observación, donde se determinaron la fluctuación de calcio a 50 por campo de observación.

Para el análisis de los datos se realizaron pruebas de ANOVA de una vía, y comparaciones *Post hoc* con un intervalo de confianza del 99% ($p < 0.001$) utilizando el paquete estadístico OrigenLab 2021. El análisis de imágenes se realizó con el paquete Image J del NIH, donde se realizaron los análisis gráficos.

IX. RESULTADOS

9.1. Determinación de los tiempos medios de activación; τ_{ON} y τ_{OFF} de las respuestas máxima de calcio inducidas por diferentes concentraciones de Lectina recombinante (Lr).

Es importante conocer o definir τ_{ON} y τ_{OFF} ya que de esta manera se tendrá una mejor comprensión de los resultados que a continuación se presentan.

1. τ_{ON} se define como el tiempo medio de activación a la respuesta máxima del mecanismo de aumento de calcio en el citosol de las células. La entrada de calcio puede ser a través de la membrana plasmática (conocido también como entrada capacitativa de calcio) o bien por la liberación de calcio a partir de reservorios intracelulares como el retículo endoplásmico o mitocondria. Estos experimentos han sido corroborados farmacológicamente por nuestro grupo de investigación. Los fármacos impiden la entrada de calcio a través de la membrana plasmática o bien por la liberación de calcio del retículo endoplásmico (Saldaña et al., 2009)
2. τ_{OFF} se define como el tiempo medio de activación a la respuesta máxima del mecanismo de disminución de la concentración de calcio en el citoplasma. Este descenso se debe principalmente por la salida de calcio del citoplasma hacia el espacio extracelular por medio de ATPasas de calcio de membrana plasmática, o bien por el regreso de calcio al retículo endoplásmico por medio de la ATPasa de retículo sarcoplásmico (SERCA ó $SERCa^{2+}$) (Saldaña et al., 2009).

En la Figura 7 se ilustra como podemos ver τ_{ON} y τ_{OFF} , en una señal transitoria de calcio. Esto se realiza analizando el valor basal y el tiempo en alcanzar el pico de la respuesta en incremento de calcio inducido por Lr (τ_{ON}). Mientras que la

determinación del decremento de calcio se considera del pico de la respuesta al regreso a la línea basal (τ_{OFF})

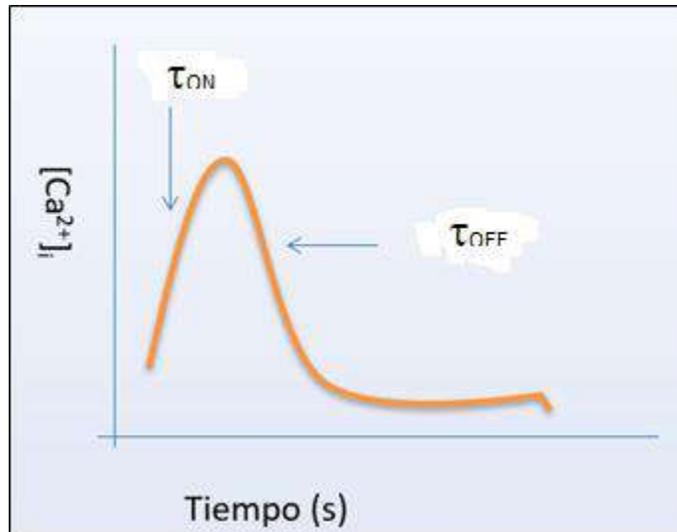


Figura 7. Señal transitoria de calcio donde determinamos la τ_{ON} y τ_{OFF}

A continuación, se muestran los resultados y análisis de transitorios de calcio inducidos por FCL y Lr en células transformadas MCF-7 y MCF-12F a concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ y 1mg/ml (Figuras 6 a 19).

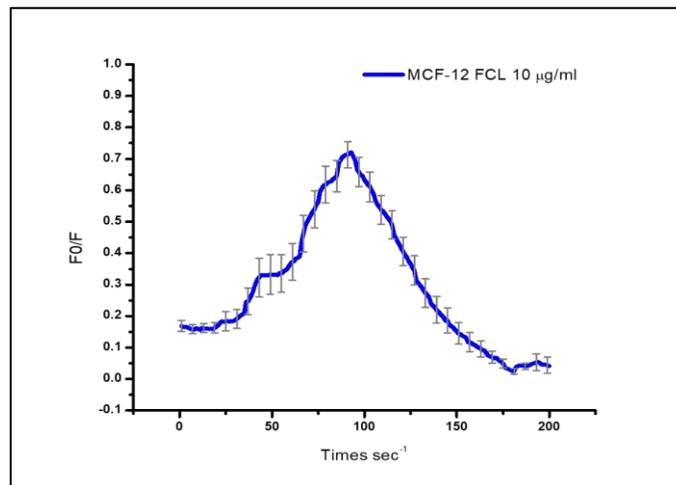


Figura 8. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL a concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$. en células MCF-12F.

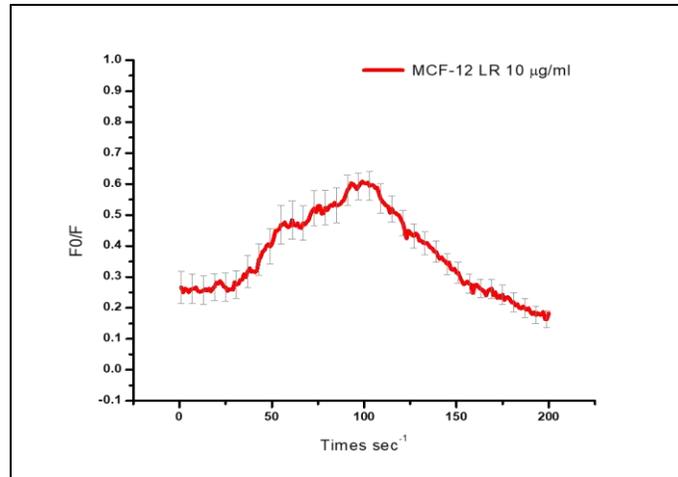


Figura 9. Determinación de transitorios de calcio inducidos por Lr a concentraciones de 10 µg/ml. en células no transformadas MCF-12F

Como se puede observar en las gráficas de la Figura 8 y Figura 9 tanto las FCL y Lr en mismas concentraciones, pueden aumentar los niveles de calcio, observándose una mayor respuesta con FCL en las células no transformadas MCF-12F.

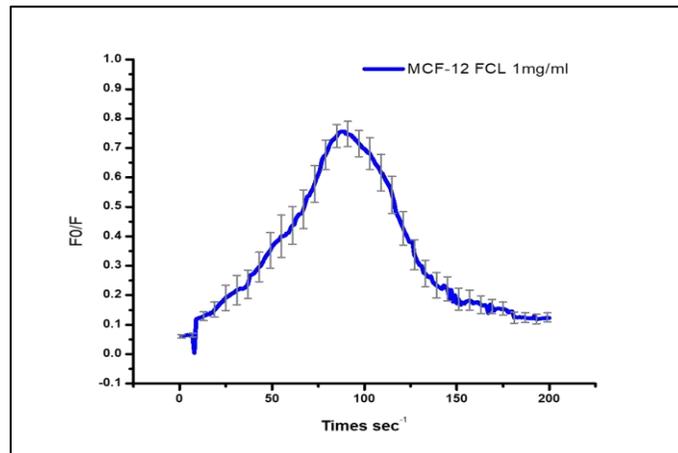


Figura 10. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL a concentraciones de 1 mg/ml. en células MCF-12F

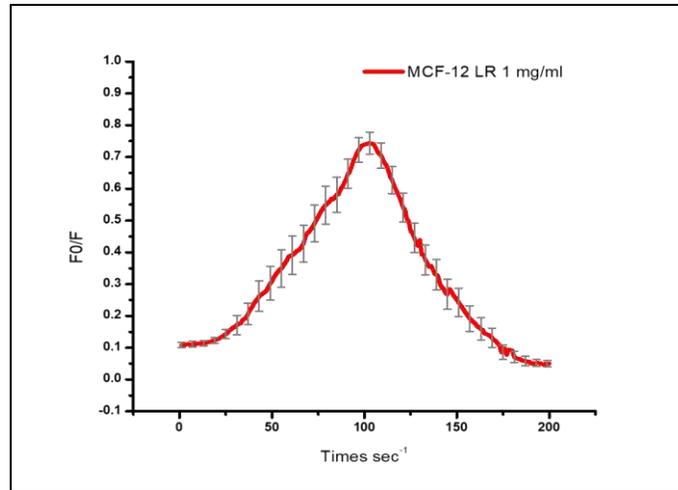


Figura 11. Determinación de transitorios de calcio inducidos por Lr a concentraciones de 1 mg/ml en células MCF-12F

Como se observa en las gráficas la Figura 10 y Figura 11, tras el aumento de las concentraciones tanto de FCL Y Lr, se produce un mayor aumento de calcio citosólico en las células MCF-12F indicando que esta dosis pudiera ser más efectiva a la hora de producir un efecto transitorio en los niveles de calcio citosólico, en las células MCF-12F. Si bien estos resultados parten de la comparación de datos normalizados, la reproducción de la condición experimental (n=3) indica que la distribución de los datos sigue el curso de la dosis respuesta.

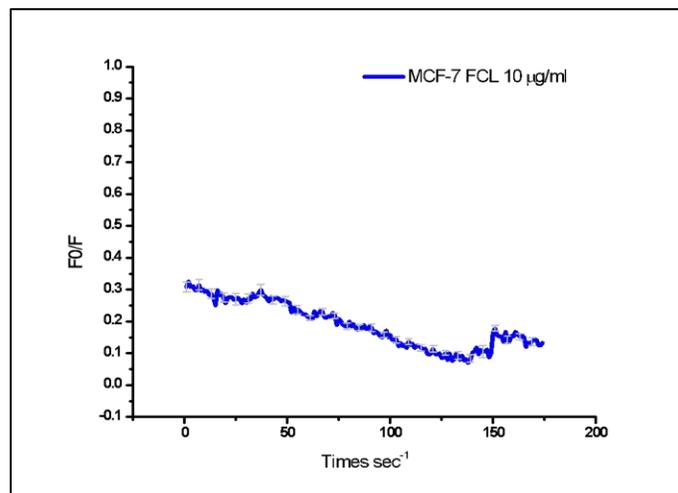


Figura 12. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL a concentraciones de 10 µg/ml en células MCF-7

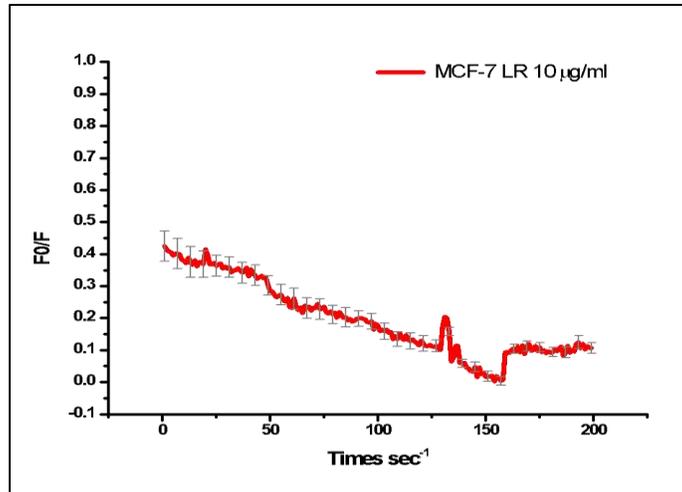


Figura 13. Determinación de transitorios de calcio inducidos por Lr a concentraciones de 10 µg/ml en células MCF-7

Tras la aplicación de una dosis de 10 µg/ml tanto de FCL Y Lr, las células transformadas a cáncer MCF-7, no mostraron una respuesta tras el estímulo, como se puede observar en la Figura 12 y Figura 13.

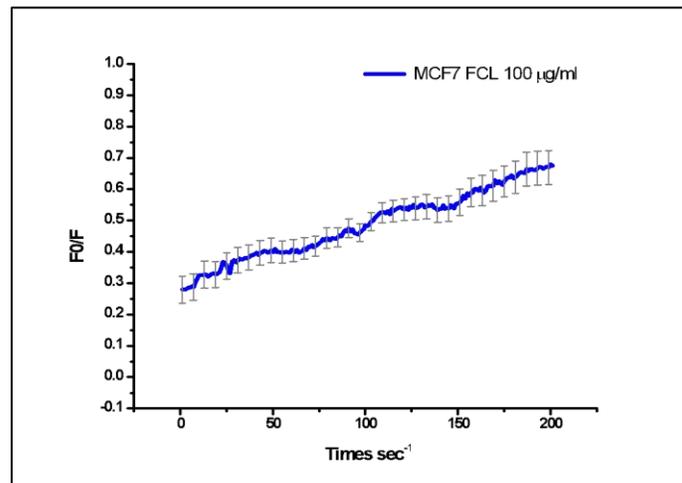


Figura 14. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL a concentraciones de 100 µg/ml en células MCF-7

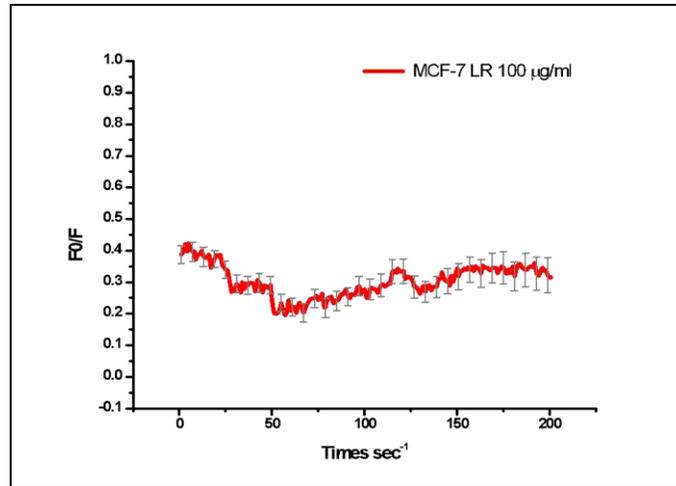


Figura 15. Determinación de transitorios de calcio inducidos por Lr a concentraciones de 100 µg/ml en células MCF-7

En la gráfica de la Figura 14 se puede apreciar que al aumentar la dosis de FCL a 100µg/ml en las células transformadas MCF-7 se logra apreciar una mayor respuesta, por su parte la Lr, no detona un efecto importante en la variación de calcio en las células MCF-12a, como se puede observar en la Figura 15. Al aumentar más la dosis tanto de FCL Y Lr a 1mg/ml, la respuesta observada es mayor con respecto a las dosis más bajas en la línea celular MCF-7, como lo vemos en la Figura 16 y Figura 17

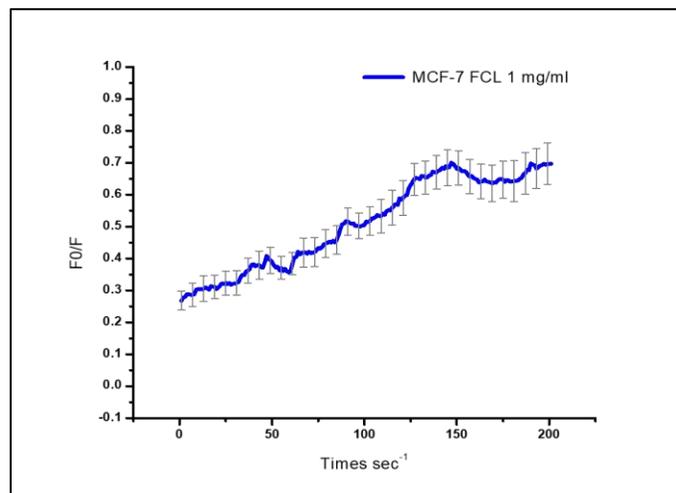


Figura 16. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL a concentraciones de 1 mg/ml en células MCF-7

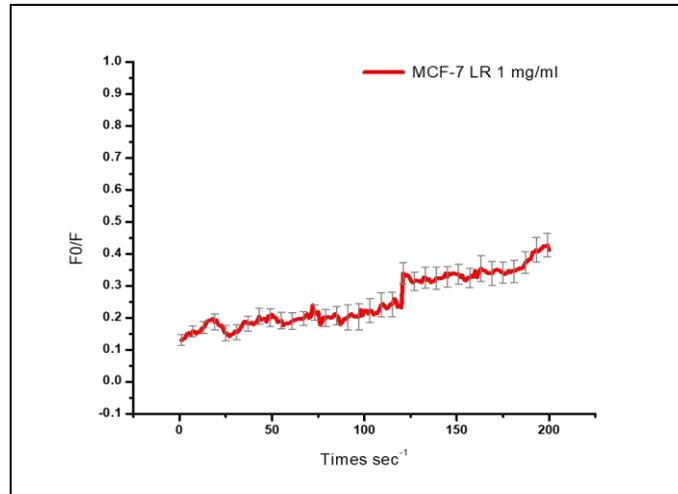


Figura 17. Determinación de transitorios de calcio inducidos por Lr a concentraciones de 1 mg/ml. en células MCF-7

Como se puede ver en las gráficas de la Figura 18 y Figura 19 al comparar la respuesta tras la aplicación de 1mg/ml de FCL en ambas líneas celulares, se aprecia una diferencia en el tiempo al cual se alcanza la mayor respuesta entre las células MCF-12F, y MCF-7

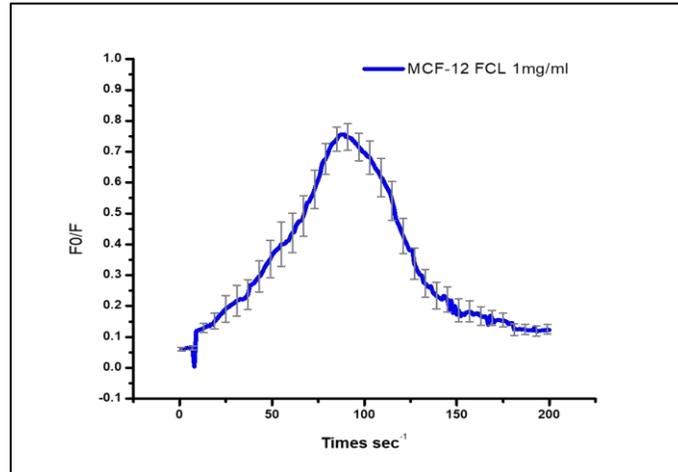


Figura 18. Señales transitorias de calcio inducidos por FCL a concentraciones de 1 mg/ml en células MCF-12F

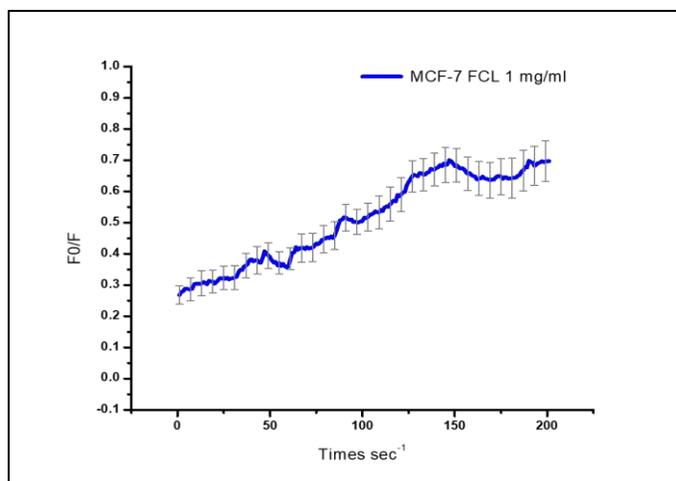


Figura 19. Señales transitorias de calcio inducidos por FCL a concentraciones de 1 mg/ml en células MCF-7

Observando las gráficas de la Figura 20 y Figura 21 se aprecia una respuesta muy diferente entre ambas líneas celulares tratadas con Lr en concentración de 1mg/ml, estas graficas muestran una respuesta del aumento de las concentraciones de calcio en ambas líneas celulares, pero siendo más representativa en las células MCF-12F, ya que en las células MCF-7 la respuesta fue menor y en un tiempo más prolongado. Estas observaciones si bien son preliminares, indican que las diferencias presentes de las células transformadas MCF-7 son menos responsivas que las células control o no transformadas MCF-12F.

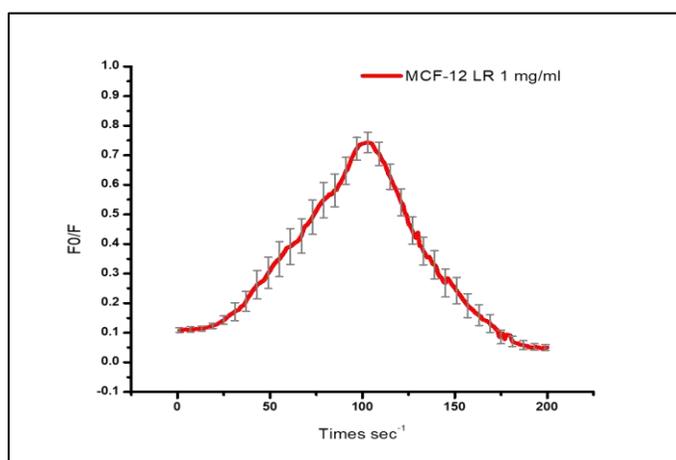


Figura 20. Señales transitorias de calcio inducidos por Lr a concentraciones de 1 mg/ml en células MCF-12F

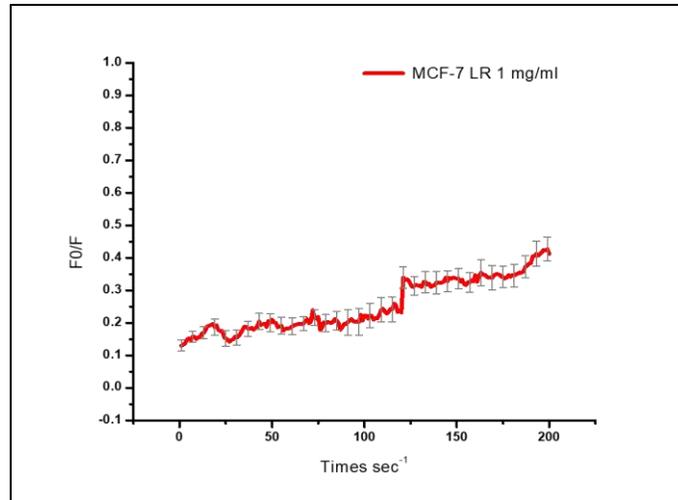


Figura 21. Señales transitorias de calcio inducidos por Lr a concentraciones de 1 mg/ml en células MCF-7

Como bien lo señala Stewart y colaboradores (2015), las señales transitorias de calcio presentan diferencias importantes al comparar células transformadas con células no transformadas, como se presentó anteriormente en la Figura 20 y Figura 21, se puede observar que las señales transitorias de Calcio en las líneas celulares transformadas MCF-7 Y no transformadas MCF-12F son distintas entre sí, esto nos pudiera indicar que tanto los mecánicos de entrada, recaptura y salida de calcio en las células tras el tratamiento son distintas en cada línea celular.

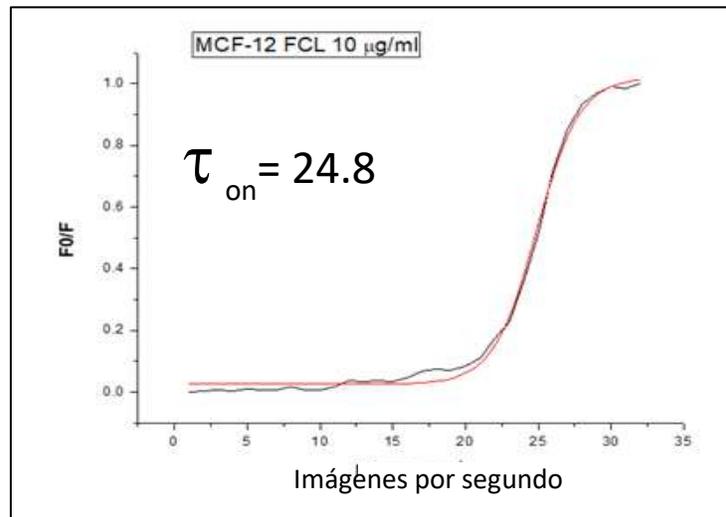


Figura 22. Determinación de la respuesta al pico, representación gráfica del Mecanismo τ_{ON} y tiempo de activación de la respuesta en presencia de una concentración de FCL 10 mg/mL en células MCF-12F.

En la Figura 22, se puede observar un ejemplo del análisis de la respuesta máxima en los tiempos de la activación τ_{ON} en los niveles de calcio. El registro de los tiempos de activación se realiza con el programa *OrigenLab 2021*, de la siguiente manera. Se aíslan los datos desde el tiempo cero; o imagen 1, hasta el dato en el cual se alcanza la fluorescencia máxima (o pico de la respuesta por incremento de calcio). En la figura es el trazo en color negro. A continuación, el programa ajusta una curva dosis respuesta mediante 1000 iteraciones (hasta mil ajustes de la curva dosis respuesta) para tener una curva de ajusta lo más optimizada a nuestros datos. En la figura se muestra como trazo rojo. El programa después de realizar el ajuste nos da una salida de datos en el cual se puede obtener un valor de τ (tao) de activación (τ_{ON}) o tiempo medio de activación que consiste básicamente en encontrar un valor de tiempo de activación del 50% de la respuesta. En el caso mostrado como ejemplo, hace referencia a 24.8 segundos. Este análisis fue realizado para cada replica de nuestra condición experimental.

En el Cuadro 2 mostramos un promedio más menos la desviación estándar encontrada para una n=3 experimentos independientes para cada tratamiento, de cada análisis de los tiempos de activación de la respuesta (τ_{ON}) a FCL y LR.

Cuadro 2. Tiempo medio de activación; en segundos, al pico de la respuesta FCL y a Lr en células MCF-12F. Los resultados representan el promedio de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar. Se utilizó una prueba t *student* para comparación de medias. $p < .05$, las letras expresan diferencia estadística entre las muestras por renglón.

Concentración	FCL	Lr
1 mg/ml	38 \pm 12 ^a	31 \pm 10 ^b
10 μ g/ml	23 \pm 4 ^a	20 \pm 2 ^a
100 ng/ml	21 \pm 4 ^a	19 \pm 3 ^a

Se observa el análisis de tres experimentos independientes, donde se usaron tres concentraciones distintas tanto de FCL Y Lr en células MCF12F. Se obtuvo el

promedio del tiempo, del pico máximo de la respuesta. Así mismo se puede determinar una diferencia significativa en la respuesta en la concentración de 1mg/ml, sugiriendo una posible diferencia en los efectos tanto de FCL y Lr en la movilización de calcio en las células MCF-12F.

X. DISCUSIÓN

Cada día surge nueva información que permite comprender más el efecto anticancerígeno de algunos compuestos activos naturales. La mayoría de estos compuestos han mostrado capacidad para modificar la naturaleza de las señales celulares, entre ellas la regulación del ciclo celular y la activación de procesos proapoptóticos. En este sentido, poco o nada se sabe de los mecanismos a corto plazo que pudieran activar y descontrolar la transducción de señales. La propuesta presentada en este trabajo, es que las Lectinas; ya sea en Fracción Concentrada (FCL) o en Lectina Recombinante (Lr), muestran por primera vez, que son capaces de activar movilización de calcio en un periodo corto de tiempo del orden de segundos. Se conoce perfectamente en la literatura, que el calcio es un segundo mensajero muy importante en la generación de respuestas celulares a diferentes tiempos (Berridge 2003). Este tiempo respuesta generada por un segundo mensajero van del orden de milisegundos hasta horas o días. Por ejemplo, liberación de neurotransmisores hasta la diferenciación celular durante del desarrollo embrionario. Evidentemente pasando por procesos celulares de duración intermedia como la transcripción (segundos), traducción (minutos) e incluso la activación de la apoptosis (horas) (ver Figura 3).

Por otra parte, se ha podido determinar que algunos compuestos bioactivos, pueden producir un aumento en la concentración de calcio y como consecuencia la activación de procesos de muerte celular por diferentes vías (Varghese et al., 2017). En un estudio realizado por Yu y colaboradores en el (2018), se evaluó el efecto de la citisina (alcaloide utilizado para el tratamiento a la nicotina), que es uno de los principales componentes bioactivos que se encuentran en el árbol *Sophora Alopecuraides L*, descubriendo un incremento en los niveles de calcio dosis

dependiente en células hepáticas HepG2, en el estudio se concluyó que la citisina es capaz de inducir apoptosis vía estrés del retículo endoplasmático (RE). De igual forma Gerbino y colaboradores (2018) estudiaron el efecto de un extracto etanólico de raíz de diente de león (DRE) sobre la señalización de Ca^{2+} en células de riñón embrionario humano HEK-293, encontrando que la DRE aumenta de manera dosis dependiente las concentraciones de calcio. Como se puede ver muchos de los compuestos activos naturales con efecto anticancerígeno ya demostrado, causan aumentos sobre las concentraciones de calcio citosólico y su efecto suele ser dosis dependiente.

El presente estudio muestra que al igual que en el estudio realizado por Yu y Gerbino (2018), el aumento en las concentraciones de calcio es dependiente de la dosis de Lr. Este no es un de los primeros estudios donde ya se ha visto ello, ya que en años anteriores Winter y colaboradores en el (2015) estudiaron el efecto de las chalconas; flavonoides naturales de cadena abierta, que al igual que la Lr han demostrado actividad anticancerígena en múltiples células tumorales. En el estudio se mostró que las chalconas inducen un aumento en la concentración de calcio celular, concluyendo que las chalconas podrían inducir estrés en el RE al igual que la citisina

Actualmente existe poca información en relación al efecto de la Lr sobre las concentraciones de calcio en líneas celulares. En el grupo de trabajo es la primera vez que se ha informado que tanto la FCL como la Lr son capaces de movilizar calcio en líneas celulares de cáncer de mama. A partir del 2018 se empezó a estudiar el efecto de la FCL, los primeros resultados obtenidos por Díaz-Betancourt (2018) abrieron una ventana para seguir analizando los efectos causados por la Lectina en células de cáncer de mama MCF-7 Y MCF-12F, ya que por primera vez se demostró que la FCL era capaz de movilizar calcio no solo en líneas células transformadas, sino también en células no transformadas.

Galicia-Castillo (2021) demuestran que tanto FCL y Lr pueden movilizar el calcio citosólico de ambas células transformadas y no transformadas, sin embargo, las concentraciones utilizadas por Galicia-Castillo no lograron demostrar si la Lr

realmente tiene un efecto importante en la movilización de calcio de ambas líneas celulares. Los estudios realizados a largo plazo tanto por el grupo de trabajo de Saldaña y colaboradores, , muestran que las células MCF-7 tras la exposición a la lectina no logran recuperarse, sin embargo, las células MCF-12F se recuperan dándole a la FCL una capacidad selectiva.

Se conoce que los aumentos de calcio en diferentes líneas celulares, puede activar diferentes vías por la cual una célula termina muriendo, como lo es el caso de Wong y colaboradores (2013) que identificaron un nuevo inductor autofágico, saikosaponin-d (Ssd), de una planta *Bupleurum falcatum* L. (Umbelliferae) que induce la autofagia en varios tipos de células cancerosas a través de la formación de autofagosomas medidos por la formación GFP-LC3, demostrando que Ssd aumenta el nivel de calcio citosólico a través de la inhibición directa de la bomba Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoplásmico/endoplásmico, lo que lleva a la inducción de autofagia a través de la activación del Ca^{2+} /calmodulina objetivo de la vía de la rapamicina.

Es importante que los próximos estudios con la Lectina recombinante (Lr), vayan dirigidos a evaluar las posibles vías relacionadas con el aumento de calcio por las que la Lr induce este efecto citotóxico en las líneas celulares cancerígenas, es necesario evaluar la función de los principales canales, bombas, transportadores de calcio en líneas celulares específicas, ampliando la información se puede tener un dato más preciso de cómo se da este aumento de calcio en las líneas celulares, con la finalidad de poder conocer cómo es que afecta de manera selectiva a las líneas celulares transformadas.

Finalmente consideramos en el grupo de trabajo que el mecanismo de acción de FCL y Lr, son diferentes en ambas líneas celulares estudiadas. Esta diferencia sugerimos que se deben a las isoformas de las proteínas encargadas de regular la concentración de calcio (mecanismos ON y OFF). Esto debido a que probablemente los procesos de biotransformación celular por el cáncer, produce una serie de cambios en el genoma que han culminado con una poliploidía en células MCF 7 (aproximadamente 100 cromosomas por célula) y a mutaciones en diversos genes

e incluso en aquellos involucrados en la regulación de la concentración de calcio citosólico.

Así mismo, se están realizando estudios de la secuenciación de transcriptomas para desvelar algunos de los cambios en los genomas de ambas líneas celulares y que son retadas; de manera dosis dependiente, por diversos compuestos bioactivos.

XI. CONCLUSIONES

- Este trabajo junto con los de Díaz-Betancourt (2018) y Galicia-Castillo (2021), muestran las primeras evidencias de que las FCL y la Lr son capaces de movilizar calcio en el citosol de células de mama y células de cáncer de mama.
- Se ha mostrado que la FCL es más eficiente en la movilización de calcio que la Lr y esto probablemente se debe a un efecto sinérgico que se da en la fracción concentrada y la cantidad de compuestos bioactivos presentes en dicha fracción. Esto pudiera explicar porque cuando se trabaja con una Lectina recombinante (Lr); más pura, las respuestas se ven disminuidas.
- Estos resultados sugieren que la Lr es capaz de movilizar calcio en ambas líneas celulares, sin embargo, es necesario que se hagan más estudios, con otras concentraciones de Lr en ambas líneas celulares MCF-7 Y MCF-12F, así como también en líneas celulares distintos a las utilizadas en este trabajo.
- Por otro lado, las concentraciones de calcio citoplasmático tras la aplicación de la Lr, fueron distintas en ambas líneas, lo que pudiera demostrar que las señales de calcio tras un estímulo son muy distintas en las líneas celulares transformadas en comparación con la no transformadas.
- El presente trabajo ha logrado determinar las concentraciones a la cual la lectina recombinante es capaz de producir una activación de calcio en las células no cancerígenas, estas concentraciones podrán ser utilizadas en estudios posteriores en los cuales se buscará evaluar marcadores moleculares relacionados a la dinámica de calcio en ambas líneas celulares. Sin embargo, este trabajo no logró de terminar a que concentración de Lr puede inducir movilización de calcio a corto plazo.
- Es relevante mencionar que trabajos de García-Gasca, han demostrado que la Lr es capaz de activar la apoptosis a tiempos aproximados de 2 h de incubación. Mientras que los resultados de este proyecto muestran que a concentraciones de 1mg/mL, evidenciamos un incremento de la concentración de calcio en el citoplasma de las células MCF-7 o células

transformadas a cáncer y no logramos ver una recaptura del calcio, por lo que podemos sugerir que la incapacidad de recaptura del calcio pudiera deberse a cambios estructurales en proteínas como la ATPasa de calcio del Retículo Endoplásmico (SERCA) debido a mutaciones, lo cual percibimos solo como un incremento lento y paulatino de la concentración de calcio en el citoplasma (mecanismo ON) y no logramos ver la recaptura del catión (mecanismo OFF).

- Sin lugar a dudas, el efecto de la Lr y de la FCL, pueden seguir estudiándose desde diversos enfoques científicos como la Biofísica o la Biología Celular, sin embargo, en el grupo de trabajo consideramos que las respuestas a corto plazo las podremos encontrar volteando a ver los sistemas de expresión a corto plazo a nivel transcripcional.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), 517–529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>.
- Bonora, M., Giorgi, C., Bononi, A., Marchi, S., Patergnani, S., Rimessi, A., ... Pinton, P. (2013). Subcellular calcium measurements in mammalian cells using jellyfish photoprotein aequorin-based probes. *Nature Protocols*, 8(11), 2105–2118. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.127>
- Brini, M., Murgia, M., Pasti, L., Picard, D., Pozzan, T., & Rizzuto, R. (1998). Nuclear Ca²⁺ concentration measured with specifically targeted recombinant aequorin. *EMBO J*, 12(18), 4813–4819. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.18.5298>
- Cummings, R. D., Trowbridge, I. S., & Kornfeld, S. (1982). A mouse lymphoma cell line resistant to the leukoagglutinating lectin from *Phaseolus vulgaris* is deficient in UDP-GlcNAc: α -D-mannoside β 1, 6 N-acetylglucosaminyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 257(22), 13421-13427.
- Danese, A., Patergnani, S., Bonora, M., Wieckowski, M. R., Previati, M., Giorgi, C., & Pinton, P. (2017). Calcium regulates cell death in cancer: Roles of the mitochondria and mitochondria-associated membranes (MAMs). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1858(8), 615–627. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2017.01.003>
- Díaz-Betancourt, A. (2018). Efecto dosis respuesta de la fracción concentrada en lectinas (FCL) de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) en la movilización de calcio citoplasmático en líneas celulares de mama. (tesis de maestría). Universidad Autónoma de Querétaro.
- Dubois, C., Vanden Abeele, F., & Prevarskaya, N. (2013). Targeting apoptosis by the remodelling of calcium-transporting proteins in cancerogenesis. *FEBS Journal*, 280(21), 5500–5510. <https://doi.org/10.1111/febs.12246>

- Ferriz-Martínez, R., García-García, K., Torres-Arteaga, I., Rodríguez-Mendez, A. J., Guerrero-Carrillo, M. de J., Moreno-Celis, U., García-Gasca, T. (2015). Tolerability assessment of a lectin fraction from Tepary bean seeds (*Phaseolus acutifolius*) orally administered to rats. *Toxicology Reports*, 2, 63–69. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2014.10.015>
- Fleckenstein, A. (1977). Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers, and vascular smooth muscle. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 17(1), 149-166.
- Fu, L., Zhou, C., Yao, S., Yu, J., Liu, B., & Bao, J. (2011). Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(10), 1442–1449. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.07.004>
- Galicia-Castillo, M. E. (2021). Caracterización de la dinámica de calcio inducida por una fracción concentrada de lectinas (FCL) y lectina recombinante de *Phaseolus acutifolius* sobre líneas celulares de mama.
- García-Gasca, T., Hernandez-rivera, E., Lopez-Martínez, J., Casta, A. L., Yllescas-gasca, L., Rodríguez, A. J., Blanco-labra, A. (2012). Effects of Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) Protease Inhibitor and Semipure Lectin Fractions on Cancer Cells, 64(8), 1269–1278. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.722246>
- Gerbino, A., Russo, D., Colella, M., Procino, G., Svelto, M., Milella, L., & Carmosino, M. (2018). Dandelion root extract induces intracellular Ca²⁺ increases in HEK293 cells. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1112.
- Giampazolias, E., & Tait, S. W. G. (2016). Mitochondria and the hallmarks of cancer. *FEBS Journal*, 283(5), 803–814. <https://doi.org/10.1111/febs.13603>.
- Harr, M. W., & Distelhorst, C. W. (2010). Apoptosis and autophagy: decoding calcium signals that mediate life or death. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(10), a005579.

- Ji, H.-F., Li, X.-J., & Zhang, H.-Y. (2009). Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? *EMBO Reports*, 10(3), 194–200. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.12>
- Jiménez Galindo, J. C., & Acosta Gallegos, J. A. (2012). Caracterización de genotipos criollos de frijol Tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) y común (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo temporal. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(8), 1565-1577.
- Lagarda-Díaz, I., Guzman-Partida, A., & Vazquez-Moreno, L. (2017). Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1242. <https://doi.org/10.3390/ijms18061242>
- Lim, W., Ham, J., Bazer, F. W., & Song, G. (2019). Carvacrol induces mitochondria-mediated apoptosis via disruption of calcium homeostasis in human choriocarcinoma cells. *Journal of Cellular Physiology*, 234(2), 1803–1815. <https://doi.org/10.1002/jcp.27054>
- Lim, W., Yang, C., Jeong, M., Bazer, F. W., & Song, G. (2017). Coumestrol induces mitochondrial dysfunction by stimulating ROS production and calcium ion influx into mitochondria in human placental choriocarcinoma cells. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 23(11), 786–802. <https://doi.org/10.1093/molehr/gax052>
- Marchi, S., & Pinton, P. (2016). Alterations of calcium homeostasis in cancer cells. *Current opinion in pharmacology*, 29, 1-6.
- Martínez-Alarcón, D., Blanco-Labra, A., & García-Gasca, T. (2018). Expression of lectins in heterologous systems. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 616.
- Martínez-Alarcón, D., Mora-Avilés, A., Espinoza-Núñez, A., Jamaica, L. M. S., Cruz-Hernández, A., Rodríguez-Torres, A., ... & García-Gasca, T. (2019). Rhizosecretion of a cisgenic lectin by genetic manipulation of Tepary bean plants (*Phaseolus acutifolius*). *Journal of Biotechnology: X*, 3, 100013.
- Martínez-Alarcón, D., Varrot, A., Fitches, E., Gatehouse, J. A., Cao, M., Pyati, P., ... &

- Garcia-Gasca, T. (2020). Recombinant lectin from Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) with specific recognition for cancer-associated glycans: Production, structural characterization, and target identification. *Biomolecules*, 10(4), 654.
- McKenzie, M., Lim, S. C., & Duchon, M. R. (2017). Simultaneous measurement of mitochondrial calcium and mitochondrial membrane potential in live cells by fluorescent microscopy. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (119), e55166. No está en texto
- Moreira, R. de A., Ainouz, I. L., De Oliveira, J. T., & Cavada, B. S. (1991). Plant lectins, chemical and biological aspects. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 86 Suppl 2, 211–218. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1842004>
- Moreno-Celis, U., López-Martínez, J., Blanco-Labra, A., Cervantes-Jiménez, R., Estrada-Martínez, L. E., García-Pascalín, A. E., ... & García-Gasca, T. (2017). Phaseolus acutifolius lectin fractions exhibit apoptotic effects on colon cancer: Preclinical studies using dimethylhydrazine or azoxi-methane as cancer induction agents. *Molecules*, 22(10), 1670.
- Moreno-Celis, U., López-Martínez, F. J., Cervantes-Jiménez, R., Ferríz-Martínez, R. A., Blanco-Labra, A., & García-Gasca, T. (2020). Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) lectins induce apoptosis and cell arrest in G0/G1 by P53 (Ser46) phosphorylation in colon cancer cells. *Molecules*, 25(5), 1021.
- Nagini, S. (2017). Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 17(2), 152–163. <https://doi.org/10.2174/1871520616666160502122724>
- Nasi, A., Picariello, G., & Ferranti, P. (2009). Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legume seeds lectins. Perspectives for the assessment of food quality and safety. *Journal of Proteomics*, 72(3), 527–538. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.02.001>
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., & Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(7), 552-565.

- Rizzuto, R., Simpson, A., Brini, M., & Pozzan, T. (1992). Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*, *358*(6384), 325–327. <https://doi.org/10.1038/358325A0>
- Saldaña, C., Díaz-Muñoz, M., Antaramián, A., González-Gallardo, A., García-Solís, P., & Morales-Tlalpan, V. (2009). MCF-7 breast carcinoma cells express ryanodine receptor type 1: functional characterization and subcellular localization. *Molecular and cellular biochemistry*, *323*(1-2), 39.
- Schwarz, R. E., Wojciechowicz, D. C., Picon, A. I., Schwarz, M. A., & Paty, P. B. (1999). Wheatgerm agglutinin-mediated toxicity in pancreatic cancer cells. *British Journal of Cancer*, *80*(11), 1754–1762. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690593>
- Stewart, T. A., Yapa, K. T. D. S., & Monteith, G. R. (2015). Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1848*(10), 2502–2511. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2014.08.016>
- Torres-Arteaga, I., Guillen, J. C., Olaya, E. M., Gasca, T. G., Zaragoza, M. V. Á., García-Santoyo, V., ... & Blanco-Labra, A. (2016). Characterization of two non-fetuin-binding lectins from Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) seeds with differential cytotoxicity on colon cancer cells. *J. Glycobiol.*, *5*, 1-7.
- Varghese, E., Samuel, S. M., Sadiq, Z., Kubatka, P., Liskova, A., Benacka, J., ... & Büsselberg, D. (2019). Anti-cancer agents in proliferation and cell death: the calcium connection. *International journal of molecular sciences*, *20*(12), 3017.
- Yeh, J.-H., Chou, C.-T., Chen, I.-S., Lu, T., Lin, K.-L., Yu, C.-C., ... Jan, C.-R. (2017). Effect of Thymol on Ca⁽²⁺⁾ Homeostasis and Viability in PC3 Human Prostate Cancer Cells. *The Chinese Journal of Physiology*, *60*(1), 32–40. <https://doi.org/10.4077/CJP.2017.BAF447>
- Yu, L., Jiang, B., Chen, Z., Wang, X., Shang, D., Zhang, X., ... & Ji, Y. (2018). Cytisine induces endoplasmic reticulum stress caused by calcium overload in HepG2 cells. *Oncology reports*, *39*(3), 1475-1484.

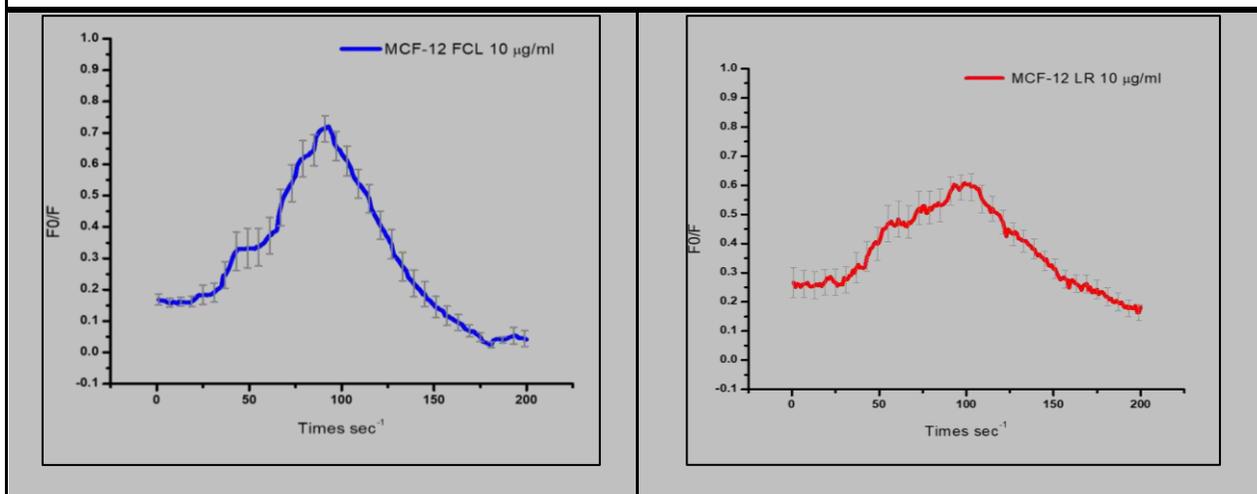
Winter, E., Chiaradia, L. D., Silva, A. H., Nunes, R. J., Yunes, R. A., & Creczynski-Pasa, T. B. (2014). Involvement of extrinsic and intrinsic apoptotic pathways together with endoplasmic reticulum stress in cell death induced by naphthylchalcones in a leukemic cell line: advantages of multi-target action. *Toxicology in Vitro*, *28*(5), 769-777.

Wong, V. K., Li, T., Law, B. Y., Ma, E. D., Yip, N. C., Michelangeli, F., ... & Liu, L. (2013). Saikosaponin-d, a novel SERCA inhibitor, induces autophagic cell death in apoptosis-defective cells. *Cell death & disease*, *4*(7), e720-e720.

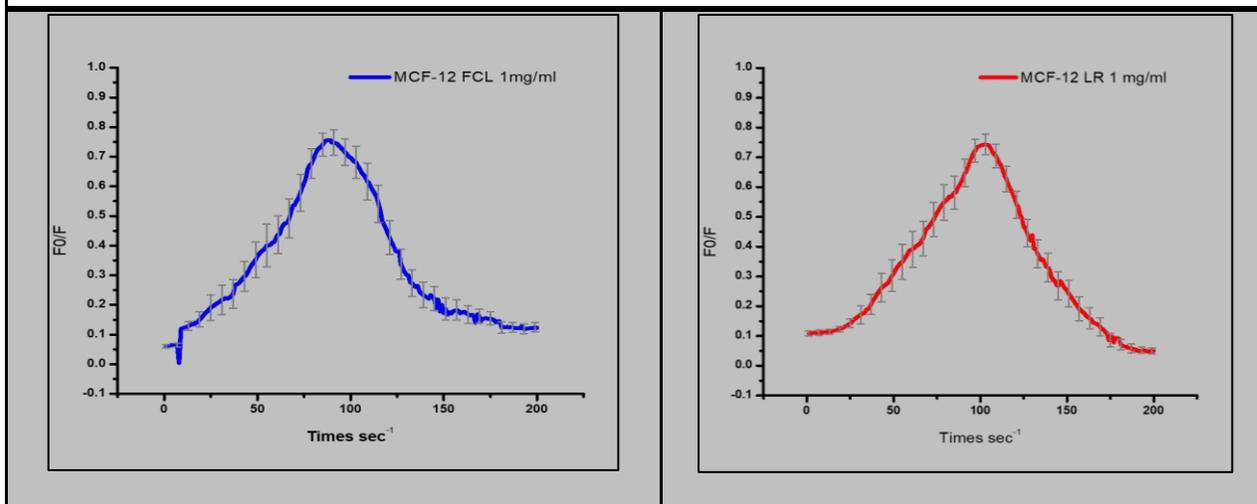
Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews*, *94*(3), 909–950. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>.

ANEXOS

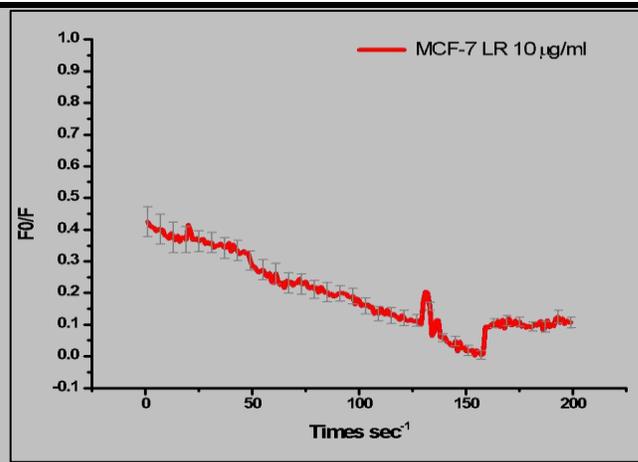
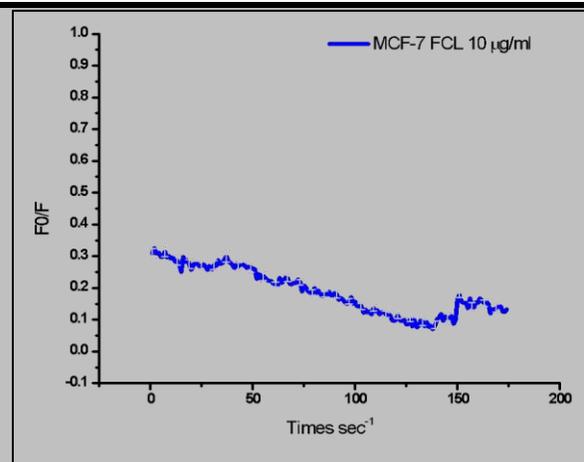
Comparación de señales de calcio inducidos por FCL y Lr a concentraciones de 10 µg/ml. en células MCF-12F.



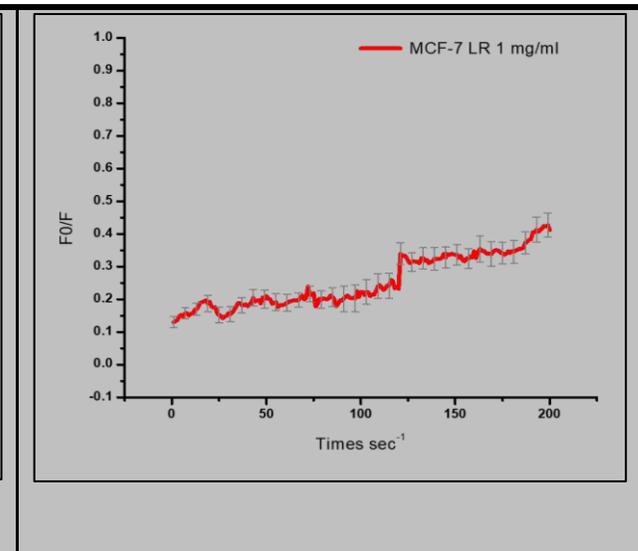
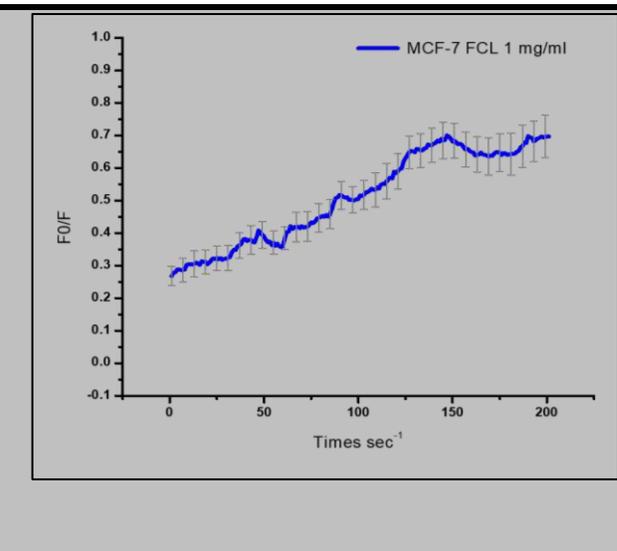
Comparación de señales de calcio inducidos por FCL y Lr a concentraciones de 1 mg/ml. en células MCF-12F.



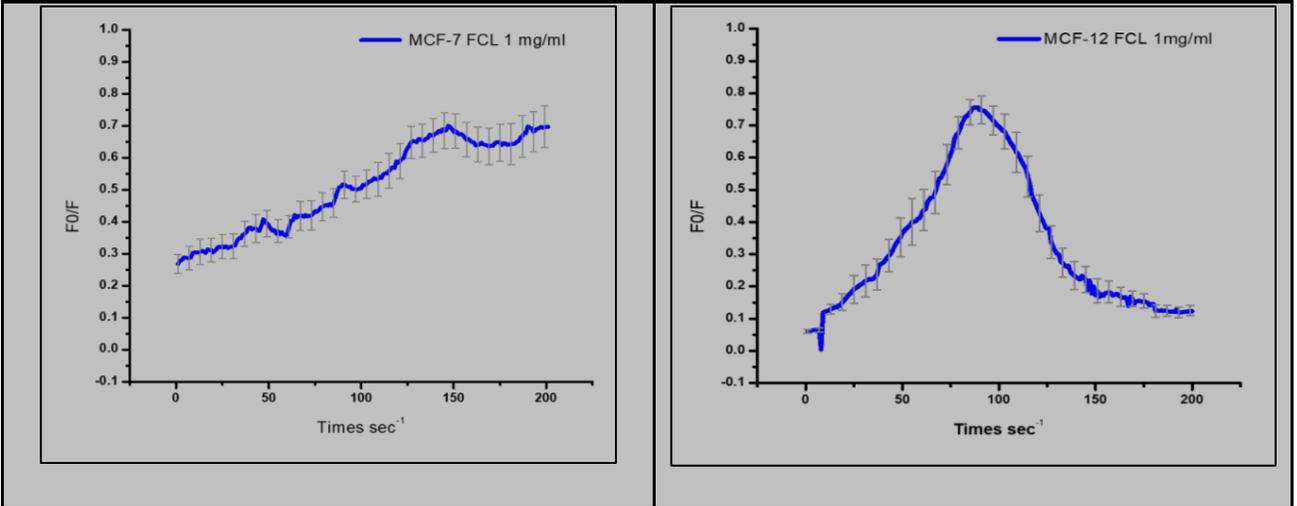
Comparación de señales de calcio inducidos por FCL y Lr a concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$. en células MCF-7.



Comparación de señales de calcio inducidos por FCL y Lr a concentraciones de 1 mg/ml. en células MCF-7.



Comparación de señales de calcio inducidos por FCL a concentraciones de 1 mg/ml. en células MCF-7 y MCF-12F.



Comparación de señales de calcio inducidos por Lr a concentraciones de 1 mg/ml. en células MCF-7 y MCF-12F.

