

2022

Caracterización biofísica y molecular de la dinámica de Calcio en células de mama MCF-7 y MCF-12F inducida por compuestos presentes en *Capsicum annum L*

Claudia M. Colín Melchor



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Caracterización biofísica y molecular de la dinámica de Calcio en células de mama MCF-7 y MCF-12F inducida por compuestos presentes en *Capsicum annum L*.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta

Claudia Maritza Colín Melchor

Dirigido por

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Santiago de Querétaro, Noviembre del 2022



Portada Interna de Tesis

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana

Caracterización biofísica y molecular de la dinámica de Calcio en células de mama MCF-7 y MCF-12F inducida por compuestos presentes en *Capsicum annum L.*

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta

Claudia Maritza Colín Melchor

Dirigido por

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

SINODALES:

Dr. Carlos Saldaña

Dra. Verónica Morales Tlalpan (Secretario)

Dra. Ana Angélica Feregrino (Vocal)

Dra. Angelina Rodríguez (Suplente)

Dr. Roberto Augusto Ferriz (Suplente)

Centro Universitario
Querétaro, Qro, México
Noviembre, 2022

Universidad Autónoma de Querétaro
 Dirección de Investigación y Posgrado
 Registro del protocolo de investigación del estudiante de posgrado

Espacio exclusivo para la Dirección

No. Registro de Proyecto*:	13100
Fecha de Registro*:	24-03-2022
Fecha de inicio de proyecto:	Agosto 2020
Fecha de término de proyecto:	Julio 2022

1. Datos del solicitante:

No. de expediente: 300951
 Nombre: _____

Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombre(s)
Colín	Melchor	Claudia Maritza

Dirección: Faisán 208 Colonia Primavera

Calle y número	Colonia	C.P.
		38200 Nicolás

Estado	Teléfono (incluir lada)
Michoacán	0444433094694

2. Datos del proyecto:

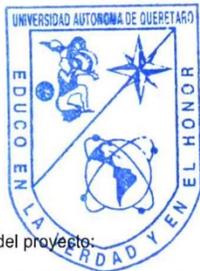
Facultad: Ciencias Naturales

Especialidad en: _____

Maestría en: Ciencias de la Nutrición Humana
 MCNH

Doctorado en: _____

Tema específico del proyecto: _____



Caracterización biofísica y molecular de la dinámica de calcio en células de mama MCF7 y MCF12F inducida por compuestos presentes en *Capsicum annum* L.

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Director de tesis

Dr. Roberto Augusto Ferriz-Martínez

Jefe de Investigación y Posgrado de la Facultad¹

Claudia Maritza Colín Melchor

Alumno¹

Dr. José Guadalupe Gómez Soto

Director de Facultad¹

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Director de Investigación y Posgrado¹



Campus Juriquilla, Qro, junio 02, 2021.

DR. CARLOS SALDAÑA GUTIÉRREZ
PROFESOR INVESTIGADOR FACULTAD DE
CIENCIAS NATURALES

Tesista: Claudia Maritza Colín Melchor

Nos permitimos hacer de su conocimiento que el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales dio la siguiente resolución del proyecto de Investigación del cual usted es responsable:

Título	Resolución
“Caracterización biofísica y molecular de la dinámica de calcio en células de mama MCF-12-f y MCF-7 inducida por biocompuestos aislados de <i>Capsicum annuum</i> L” (45FCN2021).	APROBADO

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración o duda.

Atentamente,

Oscar R. García
Dr. Oscar Ricardo García Rubio
Comité
de Bioética
Facultad de Ciencias Naturales

RESUMEN

El Calcio (Ca^{+2}) es adecuado para la regulación celular, ya que cumple con características especiales, como su radio iónico y densidad de carga. Su movilización genera una gran variedad de eventos celulares, entre ellos la proliferación y muerte celular, los cuales se llevan a cabo mediante ciertas proteínas dependientes de Calcio (Berridge et al., 2003; Mordecai & Lederer, 1999). Una movilización perturbada de este catión divalente puede provenir de la alteración en la expresión de algunas proteínas implicadas en el proceso, provocando ciertas patologías, dentro de las cuales encontramos varios tipos de cáncer (Azimi et al., 2014).

En estudios previos se ha visto que algunas sustancias o compuestos bioactivos presentes en especies del género *Capsicum*, como lo son los carotenos (luteína, tocoferol, licopeno, entre otros) y fenoles (ácido clorogénico, vainillina, quercetina, resveratrol y ácido sinápico), al entrar en contacto con la célula, provocan modificaciones en la movilización de Calcio (Jeon et al., 2008; Khan et al., 2014; Maoka et al., 2001; Park et al., 2012), reduciendo la proliferación celular.

Considerando lo anterior, es importante establecer tanto 1) la activación de mecanismos *ON* y *OFF*, mediante el uso de sondas fluorescentes, para determinar la dosis y tiempo de inducción de la respuesta biofísica del Calcio 2) el momento y dosis que activarían transcripcionalmente una respuesta celular mediante el aislamiento de mRNA e identificación cuantitativa de los genes que alteran su expresión inducida por extractos de *Capsicum annuum L* por medio de PCR en tiempo real. Con todo esto se esperan establecer las bases moleculares para proponer una serie de marcadores moleculares tempranos mediante la exposición.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, polifenoles, carotenoides, dinámica de Calcio, células de mamífero, cáncer

ABSTRACT

Calcium (Ca^{+2}) is suitable for cell regulation as it fulfils special characteristics, such as ionic radius and charge density. Its mobilization generates a wide variety of cellular events, including cell proliferation and death, which are carried out by certain calcium-dependent proteins (Berridge et al., 2003; Mordecai & Lederer, 1999). A disturbed mobilization of this divalent cation can come from the alteration in the expression of some proteins involved in the process, causing certain pathologies, among which we find several types of cancer (Azimi et al., 2014).

In previous studies it has been seen that some substances or bioactive compounds present in species of the *Capsicum* genus, such as carotenes (lutein, tocopherol, lycopene, etc) and phenols (chlorogenic acid, vanillin, quercetin, resveratrol and synapic acid), when in contact with the cell, cause modifications in the mobilization of calcium (Jeon et al., 2008; Khan et al., 2014; Maoka et al., 2001; Park et al., 2012), reducing cell proliferation.

Considering that, it is important to establish both 1) the activation of *ON* and *OFF* mechanisms, the use of fluorescent probes through, to determine the dose and time of induction of the biophysical calcium response 2) the moment and dose that would transcriptionally activate a response cell by isolating mRNA and quantitative identification of genes that alter its expression induced by extracts of *Capsicum annuum L* by means of real-time PCR. With all this, it is hoped to establish the molecular bases to propose a series of early molecular markers through exposure.

Keywords: *Capsicum annuum*, polyphenols, carotenoids, calcium dynamics, mammalian cells, cancer

DEDICATORIA

A mis padres: Josefina y Leopoldo que, sin la educación conjunta que me dieron, no habría llegado hasta donde estoy. Todos mis logros se los debo a ustedes. Gracias por apoyarme y estar conmigo en todo momento. Quiero dedicarle esta tesis también a mis hermanas Quetzaly, Sofía, Nayeli y Carmen, así como a Fran, que me han apoyado y crecido conmigo, y eso ha facilitado el camino que he recorrido.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Saldaña por los conocimientos, apoyo, paciencia y total disponibilidad.

Sin dudar a la Dra. Verónica Morales Tlalpan que me ayudó y enseñó la metodología que utilicé en el proyecto, estuvo a mi lado y me dio los consejos necesarios para que cada experimento saliera lo mejor posible.

También a la M.C. Adriana García Gallardo, quien estuvo apoyándonos en la disponibilidad del espacio en el laboratorio para que se pudieran llevar a cabo los experimentos.

A la UAQ por sus esfuerzos para poder aceptarme y finalmente hacer posible que me gradúe.

Financiamiento del proyecto:

1. CONACyT por la beca nacional de posgrado número CVU: 1078692
2. SEP-CONACyT, Ciencia básica proyecto número: A1-S-26966
3. CONACyT Laboratorios Nacionales LAVIS-UAQ.
4. FONDEC 2019 y 2022 (UAQ)

ÍNDICE

<i>RESUMEN</i>	3
<i>ABSTRACT</i>	4
<i>DEDICATORIA</i>	5
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	10
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
<i>INTRODUCCIÓN</i>	12
<i>ANTECEDENTES</i>	13
Calcio.....	13
Señalización de Calcio.....	13
Reservorios celulares.....	15
Proceso de señalización del Calcio.....	19
Mecanismos <i>ON</i>	21
Mecanismos <i>OFF</i>	25
Señalización de Calcio en el cáncer.....	28
<i>Capsicum annum</i> L.....	30
<i>JUSTIFICACIÓN</i>	34
<i>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</i>	35
<i>HIPÓTESIS</i>	36
<i>OBJETIVOS</i>	37
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	38
MATERIA VEGETAL.....	38
CULTIVO CELULAR.....	38
CONTEO CELULAR Y VIABILIDAD CELULAR POR MEDIO DE ALAMAR BLUE.....	39
DETERMINACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR POR MEDIO DE FLUO-4AM.....	40
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	41
<i>RESULTADOS</i>	42
1. Viabilidad celular por el método de Alamar blue.....	42
2. Determinación de Calcio intracelular por el método de Fluo 4-AM.....	43
2.1. Determinación de Calcio intracelular con medio rico en Calcio.....	43
2.2. Determinación de Calcio intracelular con medio libre de Calcio.....	48
3. Diseño de los primers que codifican para los genes ATP2A1, ATP2A2 y ATP2A3.....	50

<i>DISCUSIÓN</i>	52
<i>CONCLUSIONES</i>	56
<i>PERSPECTIVAS</i>	57
<i>LITERATURA CITADA</i>	58
<i>APÉNDICE</i>	66
EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL	66
CUANTIFICACIÓN DE ARN TOTAL	66
SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO POR RT-PCR.....	66
PCR CONVENCIONAL Y CUANTIFICACIÓN DE ADN.....	67
SECUENCIACIÓN.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fenoles presentes en extracto de <i>Capsicum annum</i> L.	32
Tabla 2. Carotenoides presentes en <i>Capsicum annum</i> L.	33
Tabla 3. Valores de K_i en ambas líneas celulares al aplicar las distintas variedades de <i>C. annum</i> L.	43
Tabla 4. Valores de τ_{on} obtenidos con el modelo de Boltzmann	47
Tabla 5. Valores de τ_{off} obtenidos con el modelo de Boltzmann	48
Tabla 6. Comparación de los tiempos de activación en células MCF-12F y MCF-7 al aplicar los extractos de <i>C. annum</i> L 1 mg/mL en medio con Calcio y medio libre de Calcio.	50
Tabla 7. Condiciones para el diseño de los oligonucleótidos para los genes ATP2A1, ATP2A2 y ATP2A3.....	51

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Señalización de Ca ²⁺	14
Ilustración 2. Efecto del aumento de Calcio a nivel celular por medio de un estímulo externo. Imagen tomada y modificada a partir de Berridge et al., 2003.....	15
Ilustración 3. Proteínas implicadas en la señalización de Calcio a nivel celular.	19
Ilustración 4. Diferencia en la movilización de Calcio entre una célula cancerígena y una no cancerígena. Tomado y modificado a partir de Stewart, 2015	29
Ilustración 5. Tomado de (Jiménez-García, 2015). Mapa de metabolitos presentes en <i>C. annum</i> L. var. Fasinato. Las muestras se indican en las barras inferiores (Ctrl, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9). Las columnas representan las concentraciones de elicitores	31
Ilustración 6. Morfología epitelial de las líneas celulares MCF-12F y MCF-7 respectivamente. Fotografías tomadas en exclusivo para este estudio.	39
Ilustración 7. Principio de la oxidación de resaruzina a resorufina	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Viabilidad celular en MCF-7 y MCF-12F luego de 24h y 48h de incubación con las 3 variedades de Capsicum annum L	42
Figura 2. Dinámica de Calcio en células MCF-12F y MCF-7 al aplicar Baselga a las concentraciones de 0.1, 1 y 10 mg/mL.....	44
Figura 3. Dinámica de Calcio en células MCF-12F y MCF-7 al aplicar Fasinato a las concentraciones de 0.1, 1 y 10 mg/mL.....	45
Figura 4. Dinámica de Calcio en células MCF-12F y MCF-7 al aplicar Orangela a las concentraciones de 0.1, 1 y 10 mg/mL.....	46
Figura 5. Efecto de Baselga, Fasinato y Orangela a la concentración de 1mg/mL en células MCF-12F y MCF-7, y posterior aplicación de Tapsigargina 1uM.....	49

INTRODUCCIÓN

Dentro de las células se encuentra una gran cantidad de proteínas implicadas en la dinámica del Calcio (Berridge et al., 2003; Papp & Brouland, 2011); algunas como la ATPasa de Calcio PMCA se encuentran dentro de la membrana plasmática y otras, como la ATPasa SERCa²⁺, están embebidas en la membrana interna de organelos como el retículo endoplásmico (RE) (Berridge et al., 2003; Roderick & Cook, 2008). Para que se lleve a cabo la movilización de Calcio de manera adecuada, es necesario que estas proteínas trabajen en sinergia, sin embargo, no siempre ocurre así. En algunos tipos de células como en las cancerosas, la expresión de las proteínas no es la misma que ocurre en células normales (Stewart et al., 2015), originando lo que se conoce como sellos distintivos del cáncer: proliferación celular aumentada y evasión de la muerte celular por apoptosis (Hanahan, 2014; Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Por su parte, algunos compuestos presentes en *Capsicum annuum L.*, como los polifenoles y carotenoides atenúan algunos de los sellos distintivos del cáncer (Zunun-Pérez et al., 2017). En 3 variedades de esta especie se hizo un cultivo en presencia de elicitores, lo que provocó un aumento en la concentración de compuestos carotenoides y polifenoles. Es por ello que nos interesamos en estudiar estos 3 concentrados con distintas cantidades de estos compuestos en dos líneas celulares de mamífero, una cancerosa MCF-7 y otra no cancerosa MCF-12F con la finalidad de comparar el efecto que tienen en ambas líneas celulares.

ANTECEDENTES

Calcio

El ion Calcio (Ca^{+2}) está involucrado en varios procesos celulares, como la proliferación, diferenciación, supervivencia, apoptosis, así como en la regulación de la expresión de genes en varias etapas del ciclo celular (Baumgartner et al., 2009; Brennan et al., 2013; Papp & Brouland, 2011; Parkash & Asotra, 2010; Roderick & Cook, 2008). La concentración de Calcio en el citoplasma en estado de reposo se encuentra entre 100-200 nM, aumentando hasta 1 μM cuando hay una movilización desde los reservorios, como el Retículo endoplásmico (RE) o el aparato de Golgi (AG), o por la entrada desde el líquido extracelular por canales selectivos de Ca^{+2} activados por voltaje u operados por receptores ubicados en la membrana plasmática, donde la concentración regular es de 1.2 nM (Berridge et al., 2000, 2003; Bronner, 2001; Flores-Peredo et al., 2013; Roderick & Cook, 2008). La señalización de Ca^{+2} se lleva a cabo por el trabajo conjunto de intercambiadores, bombas y canales selectivos de Ca^{+2} , los cuales regulan los niveles celulares de Calcio (Berridge et al., 2003; Heizmann & Hunziker, 1991). La localización de estas proteínas en la célula o tejido pueden variar individualmente, y los cambios en la homeostasis pueden deberse a la modificación en la expresión de estas proteínas (Monteith et al., 2007).

Señalización de Calcio

Los cambios pueden ser muy variables, puesto que provocan que se lleven a cabo funciones celulares muy distintas, como la proliferación y señalización celular. Algunos procesos requieren de sólo microsegundos, mientras que otros se llevan a cabo en minutos u horas, como se puede observar en la Ilustración 2 (Berridge et al., 2003). La cantidad de Ca^{+2} que hay dentro de la célula depende de la activación y desactivación de las proteínas movilizadoras del Calcio, a lo que llamamos mecanismos *ON* y *OFF*. Dentro de los primeros se encuentran aquellas reacciones que generan el aumento de la concentración de Calcio en el citosol, a diferencia de las últimas, que conducen a que los niveles de Calcio vuelvan a sus estados basales (Berridge et al., 2003; Flores-Peredo et al., 2013). Cada tipo celular expresa ciertas proteínas movilizadoras de Ca^{+2} , y de esas proteínas sólo se expresan algunas

isoformas en cada tipo celular. Dentro de la señalización del Calcio, esta puede deberse a la activación del complejo receptor de proteína acoplado a proteínas G (GPCR), el cual activa a la fosfolipasa C (PLC), la cual cataliza la disociación del complejo PIP₂ formando DAG e IP₃. Este último es quien abre los canales del RE para provocar la liberación del Ca²⁺ de este organelo (Sukumaran et al., 2021), tal como se muestra en la Ilustración 1.

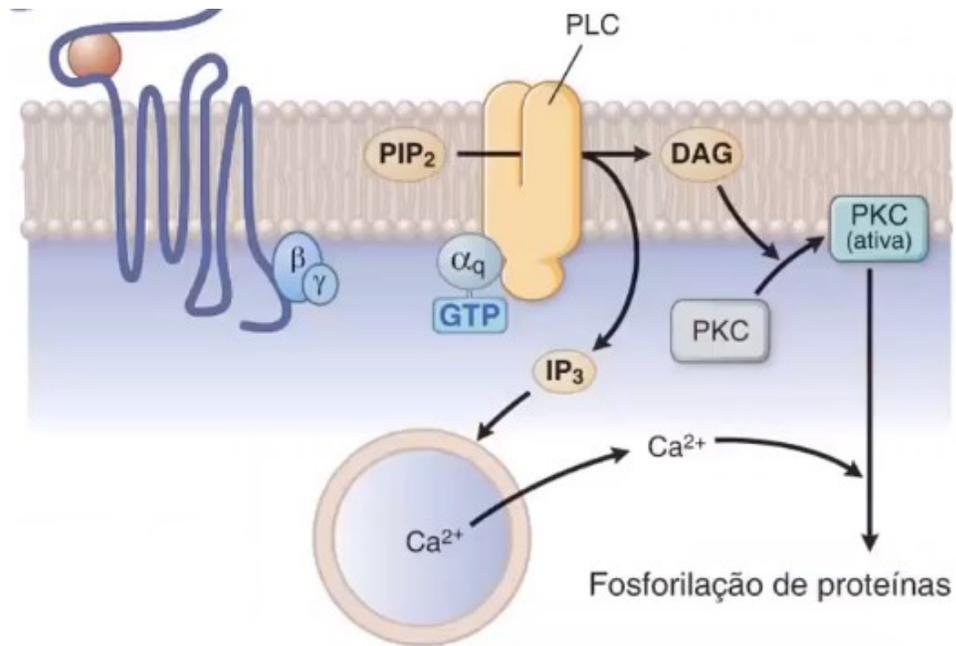


Ilustración 1. Señalización de Ca²⁺

Para que se lleve a cabo la señalización del Calcio, se generan breves pulsos de Calcio que pueden ser globales o bien localizados y que se pueden manifestar ya sea como “sparks” o “puffs”, ocurriendo como ondas o cómo oscilaciones, según lo requiera la célula (Berridge et al., 2003; Kraus et al., n.d.; Parkash & Asotra, 2010). Como se puede observar, la señalización del Calcio es bastante compleja, por ende, una alteración en estos mecanismos puede ocasionar ciertas patologías, como el cáncer (Flores-Peredo et al., 2013; Parkash & Asotra, 2010; Roderick & Cook, 2008).

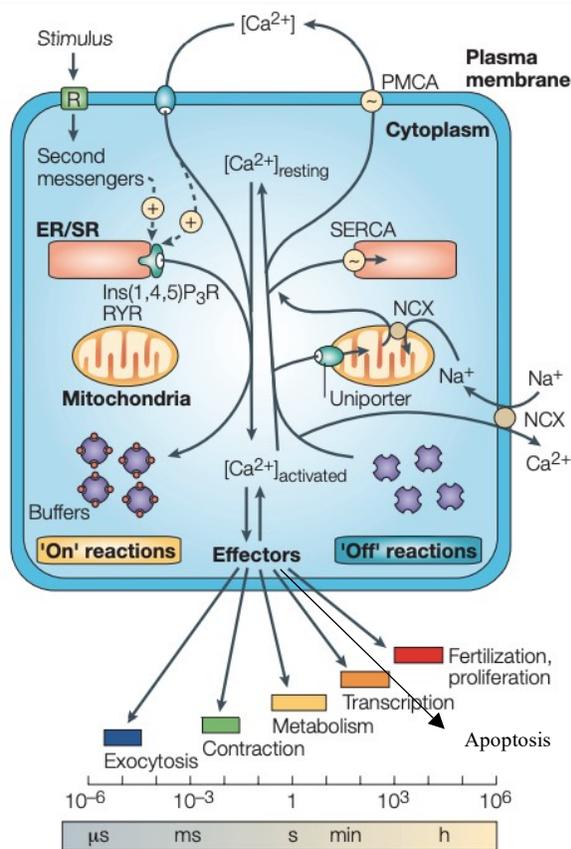


Ilustración 2. Efecto del aumento de Calcio a nivel celular por medio de un estímulo externo. Imagen tomada y modificada a partir de Berridge et al., 2003

Reservorios celulares

Los organelos principales que funcionan como reservorios de Calcio en la señalización y homeostasis del mismo son el Retículo Endoplásmico (RE) y la Mitocondria, aunque también existen otros que trabajan en conjunto. De los dos primeros se sabe que trabajan en colaboración para revertir las alteraciones de Calcio provocadas por eventos movilizados del catión (Mackrill, 1999). A continuación, se describen más detalladamente cada uno de ellos:

Retículo Endoplásmico

El RE es el depósito más importante de Ca²⁺ intracelular y se encuentra involucrado en varios mecanismos de señalización y homeostasis de Ca²⁺. El RE transmite señales estrictamente

reguladas de Ca^{2+} a la mitocondria, la cual las codifica para regular señales como producción de energía o muerte celular (Marchi et al., 2018). El RE cuenta con proteínas que almacenan Ca^{2+} en su interior, las ATPasa de Ca^{2+} del RE (SERCa^{2+}), y con proteínas que generan la liberación del catión al espacio intracelular, los Receptores de Inositol 1, 4, 5-Trifosfato (IP_3R) y el Receptor de Rianodina (RyR) (Papp et al., 2012), estas proteínas son muy importantes tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Mekahli et al., 2011). Para que el RE se encuentre funcionando de manera adecuada, las proteínas deben trabajar conjuntamente, ya que la alteración en alguna de ellas puede provocar un vaciado de Ca^{2+} en el RE, provocando estrés celular (Mekahli et al., 2011). Esto a su vez genera un aumento descontrolado de Ca^{2+} dentro del citosol, sello distintivo de algunas patologías (Monteith et al., 2007). Por un lado, la disminución de la proteína SERCa^{2+} minimiza la apoptosis, ya que existe menor transferencia de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria (Marchi et al., 2018). Y por otro lado, IP_3R media la transferencia de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria, manteniendo las funciones mitocondriales estables, por lo que una sobreexpresión de IP_3R provoca mayor proliferación celular (Cárdenas et al., 2016).

Mitocondrias.

Las mitocondrias se consideran las estructuras celulares más versátiles, ya que contribuyen al destino celular tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Bravo-Sagua et al., 2017; Srinivasan et al., 2017). Estos organelos tienen varias funciones celulares, puesto que sintetizan ATP, producen especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y amortiguan las altas concentraciones de Ca^{2+} en el citosol, ya que absorbe parte del Ca^{2+} que es liberado desde el RE (Uzhachenko et al., 2015) y del que entra desde el medio extracelular, dado que las interacciones del RE y la membrana plasmática dependen de la localización de las mitocondrias (Marchi et al., 2018; Rizzuto et al., 2004). La regulación del Ca^{2+} está bastante entrelazada con la de la mitocondria, por lo que esta toma decisiones importantes para la célula, como la supervivencia y muerte celular (Baumgartner et al., 2009; Bravo-Sagua et al., 2017).

Para que ocurra un aumento de Ca^{2+} , la absorción de este desde el medio extracelular se da por medio de un canal dependiente de voltaje conocido como uniportador mitocondrial, se estimulan las deshidrogenasas que proporcionan NADH para la respiración mitocondrial y la producción de ATP (Santo-Domingo & Demarex, 2010). Posteriormente el Ca^{2+} presente en el espacio intermembranal se introduce a la matriz por medio del complejo uniportador mitocondrial que depende del potencial de membrana producido por la cadena de transporte de electrones (Marchi & Pinton, 2014). Sin embargo, una desregulación en la homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial puede provocar una proliferación excesiva en las células, mecanismo relacionado con patologías como el cáncer (Bravo-Sagua et al., 2017; Danese et al., 2017). Se ha demostrado además, que las células cancerígenas producen gran cantidad de EROs, moléculas de señalización para activar respuestas proliferativas y angiogénicas mayores que las que existen en células normales (Sullivan & Chandel, 2014), por lo que una desregulación en la homeostasis de Ca^{2+} sería el inicio de una serie de eventos cancerígenos.

Aparato de Golgi y vesículas secretoras

Hay evidencia de que el Aparato de Golgi (AG) puede almacenar hasta el 5% del Ca^{2+} intracelular total, ya que este catión es necesario para el tráfico retrógrado de la membrana desde el AG hacia el RE, el transporte intra Golgi, distintos pasos del transporte de proteínas y la agregación selectiva de proteínas secretoras, aumentando en el citosol gracias a la liberación de Ca^{2+} desde el lumen del AG (Micaroni, 2012; Porat & Elazar, 2000; Van Baelen et al., 2004; Yang et al., 2015). Además, este organelo contiene proteínas de unión al Ca^{2+} , como bombas de Calcio (SPCA y SERCa²⁺), así como canales de liberación de Ca^{2+} (como el IP₃R y el RyR), que le dan la tarea de almacenar el catión, ayudando en la señalización espacio-temporal de Ca^{2+} dentro de la célula (Micaroni, 2012; Pizzo et al., 2011; Van Baelen et al., 2004). La dinámica de Ca^{2+} en el AG está controlada por un circuito de micro señalización que se activa y desactiva generando una regulación en el flujo del transporte (Micaroni, 2012). Además de que el Ca^{2+} se moviliza de manera importante en el AG, no afecta los niveles de Ca^{2+} en el RE, sugiriendo una independencia funcional y espacial del AG con respecto al RE (Yang et al., 2015).

Se ha observado que alteraciones en proteínas movilizadoras de Ca^{2+} como la SPCA, presentes en el AG de células cancerosas provocan cambios en la proliferación y morfología celular, así como una regulación alterada de enzimas dependientes de Ca^{2+} ubicadas en la vía secretora sin generar alteraciones importantes en la señalización de Ca^{2+} citosólico (Grice et al., 2010).

Núcleo

Se ha demostrado que la movilización del Ca^{2+} dentro del núcleo provoca señales independientes a las que se ejecutan en el citosol (Gomes et al., 2006). Cuando estas señales se ven aumentadas se efectúan procesos como la translocación de la proteína Kinasa C (PKC), la regulación hepática, el arresto del ciclo celular, la hipertrofia nuclear, además de respuestas transcripcionales, como la expresión de genes neuronales en la actividad sináptica y neuroadaptaciones, como la supervivencia, consolidación de la memoria y el dolor (Oliveira et al., 2014).

La flujo de Ca^{2+} en el núcleo puede provenir de la difusión pasiva que ocurre en la membrana nuclear, o bien por la interacción que existe entre la membrana nuclear y las membranas del RE, lo que ayuda a generar un potencial para regular el Ca^{2+} en regiones nucleares a través de estímulos eléctricos, hormonales y mecánicos que producen señales a fin de que entre Ca^{2+} por la MP o bien que salga de los almacenes intracelulares (Bootman, 2012; Gomes et al., 2006; Oliveira et al., 2014). Esta movilización se lleva a cabo debido a una gran cantidad de proteínas dependientes de Ca^{2+} que se sitúan dentro del núcleo, como las quinasas y fosfatasas, factores de transcripción como NF-AT y la proteína de unión al Ca^{2+} Calmocolina (CaM) (Bootman, 2012). La elevación de los niveles de Ca^{2+} citosólico son contrarrestada por el consumo de Ca^{2+} en la mitocondria y la SERCa^{2+} , al igual que la extrusión mediante la bomba PMCA y el intercambiador Na/Ca, las cuales mantienen bajos los niveles de Ca^{2+} en el citosol (Bengtson & Bading, 2012).

Proceso de señalización del Calcio

Dentro del esquema del estudio de (Berridge et al., 2003), Ilustración 2 se pueden observar procesos sensibles al Calcio, así como el tiempo que requieren para ser activados, los cuales resumo enseguida: El estímulo más veloz es el de la transmisión sináptica o contracción cardíaca, ya que se requieren de microsegundos a milisegundos para efectuarse. Posteriormente se encuentran procesos que provocan oscilaciones de Calcio que se distribuyen en toda la célula, generando la activación de los ovocitos en la fertilización, crecimiento y migración neuronal, desarrollo de fenotipos de neurotransmisores, desarrollo de músculos, liberación de citoquinas, entre otras (Berridge et al., 2003).

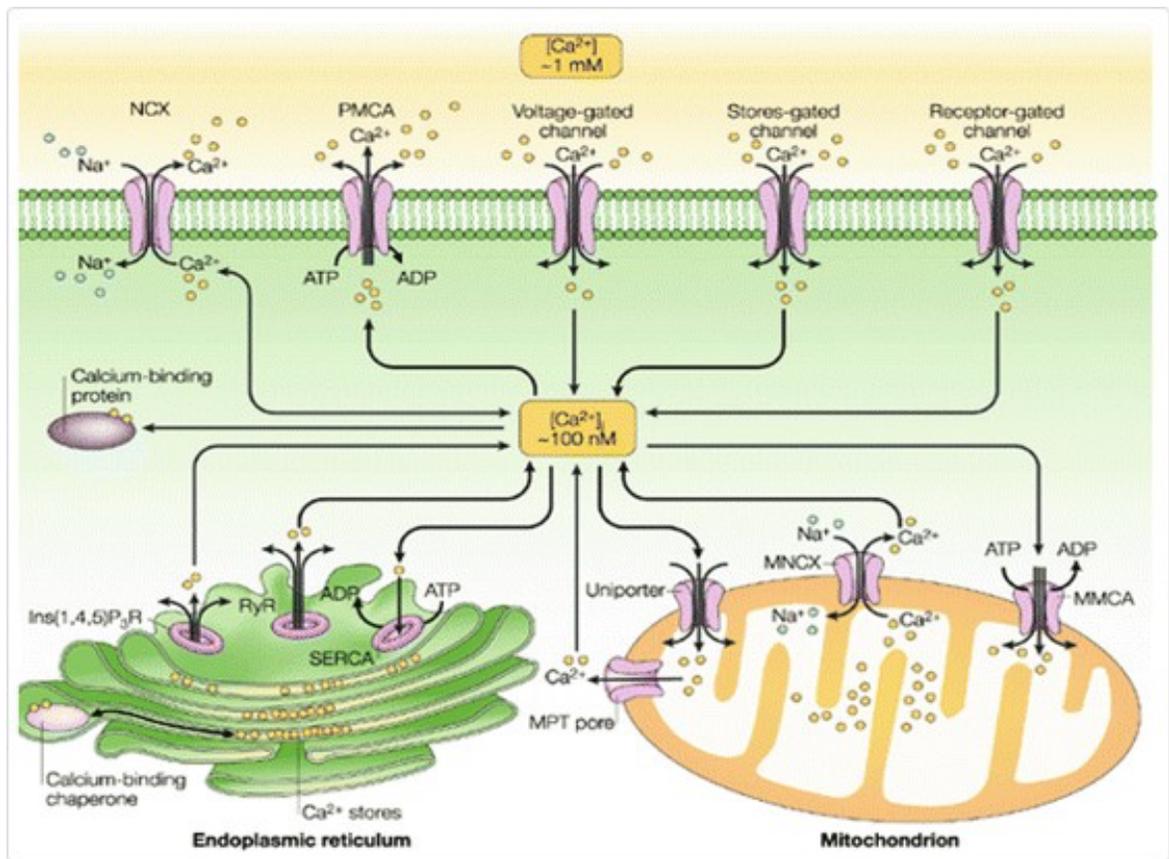


Ilustración 3. Proteínas implicadas en la señalización de Calcio a nivel celular.

En la Ilustración 3 se observan algunos de los canales implicados en la señalización de Calcio, los cuales, como mencionan (Berridge et al., 2000), se divide en 4 secciones:

1. Primero la señalización se desencadena por medio de estímulos que generan la movilización de Ca^{2+} .
2. Luego se activan los mecanismos *ON*, que introducen Ca^{2+} al citoplasma
3. El Ca^{2+} introducido funciona como un mensajero que estimula procesos sensibles a Ca^{2+}
4. Llegan los mecanismos *OFF*, compuestos de bombas e intercambiadores, los cuales remueven Ca^{2+} del citoplasma, regresando al estado basal.

Entrada capacitativa.

La entrada de Ca^{2+} es debida a la gran concentración del ion en el exterior de la célula y es provocada por la activación de canales de entrada, tales como los VOC (canales de entrada de Calcio operados por voltaje), los ROC (canales operados por receptores), los receptores de NMDA o los canales operados por segundos mensajeros (SMOC). Muchos de estos canales forman parte de la familia de los canales iónicos de la proteína del receptor transitorio (TRP) (Berridge et al., 2003). En (Azimi et al., 2014) se muestra una tabla con un conjunto de canales de Ca^{2+} de entrada capacitativa que se ven alterados en las líneas celulares de cáncer de mama, pertenecientes a la familia de los TRPC, TRPV, P2X, ORAI, entre otros.

Liberación de Ca^{2+} de los depósitos internos.

La otra fuente de Ca^{2+} es la de los depósitos internos, donde IP_3R y RyR regulan la liberación de Ca^{2+} , provocando ondas dispersadas en el citoplasma, provocando un aumento del Ca^{2+} (a 50-600 nM) durante las reacciones *ON*. En el caso de IP_3R , el enlace con IP_3 aumenta la sensibilidad de IP_3R al Ca^{2+} , siendo esto una ruta de señalización, aunque hay otras, como la fosforilación por Ca^{2+} dependiente de quinasa 2 (CaMKII). En cuanto a los RyR , este es activado a bajas concentraciones de Ca^{2+} (Berridge et al., 2003).

Recaptura de Calcio

Las proteínas SERCa^{2+} y uniportador mitocondrial regresan el Calcio a los reservorios naturales, siendo parte de los mecanismos *OFF*. El RE secuestra parte de los iones que se

encuentran en el citosol, cuando estos se encuentran en una concentración mayor a la homeostática por medio de la ATPasa del RE (SERCa²⁺), mientras que la mitocondria lo hace por medio del uniportador mitocondrial, este último liberándolo lentamente hasta llegara concentraciones adecuadas (Berridge et al., 2003).

Extrusión de Calcio

Al igual que los anteriores, los mecanismos de extrusión de Calcio forman parte de los mecanismos *OFF*. Tanto la ATPasa de Calcio de la membrana plasmática (PMCA), como los intercambiadores de Sodio/Calcio (NCX) provocan la salida del Calcio por la membrana plasmática, regulando los niveles basales del catión (Berridge et al., 2000, 2003).

Mecanismos ON

Los mecanismos *ON* se dividen en dos, aquellos que provocan el ingreso de Ca²⁺ al citosol desde el medio extracelular por medio de un gradiente electroquímico a través de la MP; y aquellos que provocan la salida de Ca²⁺ desde los reservorios intracelulares. La célula activa gran cantidad de proteínas movilizadoras de Ca²⁺ para que estos mecanismos se lleven a cabo. Cuando el Ca²⁺ entra a la célula actúa con diferentes proteínas de unión a dicho catión. Cuando el Ca²⁺ entra al citosol provoca que los buffers se carguen, esto con el objetivo de que se ajusten las propiedades espaciales y temporales de las señales de Ca²⁺. La mayoría del Ca²⁺ que entra a la célula se une a buffers (Berridge et al., 2003).

1. RECEPTOR DE RIANODINA

Existen tres isoformas del Receptor de Rianodina (RyR): RyR₁, RyR₂ y RyR₃, las cuales tienen un 65% de similitud entre sí y se encuentran ubicuamente en mamíferos (Kushnir et al., 2018; Santulli et al., 2018). Estos receptores controlan la liberación de Ca²⁺ proveniente de los reservorios del RE y Retículo Sarcoplásmico (RS) (Santulli et al., 2018), respondiendo al Ca²⁺ de forma acampanada, es decir, se activa a concentraciones intermedias, pero se inactiva a altas y bajas concentraciones del catión en el citoplasma, así como en presencia de ATP, por procesos redox, por cADPR y por algunos mecanismos de

fosforilación/desfosforilación (Fill & Copello, 2002; Santulli et al., 2018). La habilidad que tiene el Ca^{2+} para estimular al RyR es modulado por la Ribosa ADP cíclica (cADPR), generando “chispas” de Ca^{2+} al momento de la movilización (Berridge et al., 2000). Mutaciones o modificaciones post traduccionales pueden llevar a la fuga de Ca^{2+} intracelular aún habiendo bajos niveles del catión en los reservorios del RE y RS, provocando el vaciado de los mismos y la activación de enzimas dependientes de Ca^{2+} . Este Ca^{2+} liberado puede introducirse a la mitocondria y generar daño en el metabolismo energético y, por consecuencia, más daño al RyR (Kushnir et al., 2018).

2. RECEPTOR DE INOSITOL TRIFOSFATO

El Receptor de Inositol Trifosfato (IP_3R) es un canal receptor que contribuye a un aumento rápido de los niveles de Ca^{2+} , generando ondas y señales locales conocidas como “puffs” (Berridge et al., 2000). Este receptor cuenta con 3 isoformas, que se activan con altas concentraciones de IP_3 y que, si provocan una liberación elevada de Ca^{2+} pueden provocar la muerte celular debido a una sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial (Bittremieux et al., 2016). Existe evidencia científica de que la pérdida de alguna de las isoformas o el splicing alternativo llegan a provocar una inhibición de la muerte celular (en células tumorales), ya que existe menor liberación de Ca^{2+} hacia la mitocondria, lo que les da ventaja proliferativa respecto a las células normales (Eighway et al., 1996; Wiel et al., 2014); y, por el lado contrario, una mayor estimulación de la acción de los receptores IP_3R provoca una mayor liberación de Ca^{2+} , lo que conlleva a una mayor producción de ERO's, mayor concentración de Bcl-2 y Mcl-XL y, por consecuencia muerte celular (Roderick & Cook, 2008).

3. CANALES DE CALCIO VOLTAJE-DEPENDIENTES

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje son transductores de los cambios de potencial de la membrana, los cuales inician gran cantidad de funciones fisiológicas para la célula. Estos canales median la entrada del catión por medio de la despolarización membranal de la célula, llevando a cabo los eventos celulares correspondientes (Catterall et al., 2011; Huang & Zamponi, 2017; P. Taylor et al., 2011). Estos canales forman complejos de señalización con

moléculas de señalización, receptores acoplados a proteína G y otros tipos de canales iónicos (P. Taylor et al., 2011). En cada tipo celular se expresan distintos subtipos de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, dependiendo de las propiedades fisiológicas y reguladoras (Catterall et al., 2011), pero estos canales suelen encontrarse en tipos celulares que requieran respuestas rápidas, pues pueden generar flujo de Ca^{2+} rápidos, controlando procesos celulares rápidos (J. T. Taylor et al., 2008). Existen aproximadamente diez miembros en la familia de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, y cada uno de ellos cumple una función distinta; por ejemplo, el canal Ca_v1 inicia la contracción, secreción, regulación de la expresión génica, entre otras; el canal Ca_v2 es responsable del inicio de la transmisión sináptica y el canal STIM1 media la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular al momento que las reservas de Ca^{2+} del RE se agotan, provocando la liberación de neurotransmisores, la plasticidad postsináptica estructural y funcional y la translocación del factor de transcripción (Catterall et al., 2011; Sather & Dittmer, 2019).

4. CANAL CONTROLADO POR RECEPTOR

Es un conjunto de canales que se encargan de introducir Ca^{2+} a la célula gracias a su activación por medio de un receptor, generalmente se unen a transmisores como el glutamato, ATP o acetilcolina (Berridge et al., 2000). En lugar de una forma de campana, la relación del Ca^{2+} con este tipo de canales es sigmoideal, sobre todo en presencia de elevadas concentraciones de IP_3 , actuando como interruptor molecular y que, una vez unidos el receptor e IP_3 , este se vuelve sensible a estímulos de Ca^{2+} , pero no a acciones inhibitorias (Berridge et al., 2000). Un ejemplo de estos son los receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA), los cuales son heterotetrámeros que se encuentran presentes en la excitabilidad sináptica y están involucrados en procesos de memoria y aprendizaje. Además son altamente permeables al Ca^{2+} , donde un exceso de entrada de este catión puede provocar muerte neuronal y, por tanto, bloqueo de los receptores a NMDA (Cull-Candy et al., 2001). En el estudio (Morelli et al., 2019) se muestra cómo la disminución de la expresión del receptor NMDAR provoca una disminución de la citotoxicidad y en la muerte celular que provocan

los enantiómeros analizados en las dos líneas celulares MCF-7 y SKBR3, lo que sugiere que NMDA está involucrado en un proceso antitumoral.

5. *RECEPTORES POTENCIALES TRANSITORIOS*

Dentro de este tipo de canales encontramos a los TRPV, receptores potenciales transitorios vaniloides. Los vaniloides son moléculas lipófilas presentes en la bicapa lipídica que le confieren estructura y fluidez y juegan un papel importante en la homeostasis del Ca^{2+} , aumentándolo en el citosol, gracias al Ca^{2+} de la dieta, absorbido desde el lumen intestinal. El Ca^{2+} es absorbido por las células apicales por canales TRPV5 y TRPV6, los cuales se desactivan a altas concentraciones de Ca^{2+} intracelular (Haustrate et al., 2020; Yelshanskaya et al., 2021; Ziglioli et al., 2009). La función de los vaniloides en la actividad celular está dada en dos niveles distintos, bien sea a través de una interacción con el receptor TRPV1, disminuyendo más rápido el potencial mitocondrial transmembranal; o a través de una interacción indirecta con la célula gracias a su habilidad para atravesar la MP (Ziglioli et al., 2009). El canal TRPV5 absorbe Ca^{2+} desde el riñón, y el TRPV6 desde el intestino (Yelshanskaya et al., 2021). Este último ayuda en la captación de Ca^{2+} en tejidos epiteliales. La desregulación de la actividad de estos canales modifica las funciones fisiológicas, dando lugar a enfermedades como el cáncer (Haustrate et al., 2020; Mcgoldrick et al., 2017; Yelshanskaya et al., 2021).

6. *ORAI*

CRAC son un conjunto de canales que provocan el ingreso de Ca^{2+} desde el medio extracelular hacia el RE cuando este está a punto de vaciarse. Dentro de estos canales encontramos a la familia ORAI, un conjunto de canales presentes en la MP que se codifican por tres genes distintos, dando pie a las proteínas ORAI1, ORAI2 y ORAI3 (Trebak & Putney, 2017). También encontramos a la familia STIM, un conjunto de proteínas diméricas (STIM1 y STIM2) ancladas a la membrana del RE (Prakriya & Lewis, 2015; Roos et al., 2005).

El canal STIM2 detecta la disminución de Ca^{2+} luminal en el RE. Cuando va descendiendo el nivel de Ca^{2+} se va aumentando la activación de STIM1 y disminuyendo la de STIM2 (Luik et al., 2008; Thiel et al., 2013). Esta disminución de Ca^{2+} provoca su disociación con los canales STIM, lo que activa a la fosfolipasa C a través de la proteína G, la cual fragmenta al PIP_2 , presente en la MP en diacilglicerol (DAG) e Inositol trifosfato (IP_3). Este último atrapa el Ca^{2+} que estaba unido a STIM y lo lleva al citosol, generando un ligero aumento de Ca^{2+} en el citosol impulsado electroquímicamente. Esto genera cambios conformacionales en STIM, uniéndose a la MP donde se activan los canales ORAI1, que abren su poro selectivo al Ca^{2+} y este fluye a través de su gradiente electroquímico desde el espacio extracelular a la célula (Parekh & Putney, 2005; Prakriya & Lewis, 2015; Roos et al., 2005). Estos canales son únicos entre los canales iónicos, tanto en sus propiedades biofísicas como en su manera de regulación (Prakriya & Lewis, 2015).

Mecanismos *OFF*

Durante las reacciones *OFF* el Ca^{2+} vuelve a sus niveles basales, es decir, parte del Ca^{2+} migra hacia el espacio extracelular y otra se almacena en los organelos a través de proteínas movilizadoras de Ca^{2+} como pueden ser bombas e intercambiadores (Berridge et al., 2003). Estos mecanismos provocan que el Ca^{2+} se mantenga en sus niveles estables y que las reservas se mantengan llenas (RE, mitocondria, AG, etc). Los componentes de las reacciones *OFF* son la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA), el intercambiador Na/Ca (NCX), SERCa^{2+} y el uniportador mitocondrial. Cada mecanismo tiene su propio umbral de actividad, por ejemplo, PMCA y SERCa^{2+} responden a elevaciones moderadas de Ca^{2+} , restableciendo los niveles basales del mismo. El NCX y el uniportador mitocondrial, por otro lado, responden a estímulos menores (Berridge et al., 2003; Roderick & Cook, 2008). A continuación, se detalla cada una de las proteínas implicadas en este proceso.

1. BOMBAS DE CALCIO DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Las bombas de Ca^{2+} de la MP (PMCA) son proteínas intermembrana que, junto a otras, ayudan en la regulación de la concentración de Ca^{2+} en el citosol, por lo que una deficiencia

de esta proteína puede provocar pérdida de la homeostasis del catión (Strehler & Zacharias, 2001; Varga et al., 2014). Las PMCA pertenecen a la superfamilia de bombas de tipo P, las cuales se caracterizan porque hidrolizan ATP para transportar iones a través de la membrana de manera activa (Benaim, 2004; Brini et al., 2013). Estas proteínas están codificadas por al menos cuatro genes distintos que, además son modificados por splicing alternativo para dar gran cantidad de isoformas que están presentes en distintos tipos celulares (Strehler & Zacharias, 2001). La PMCA se estimula con la calmodulina (CaM) ya que un aumento en la concentración de Ca^{2+} en el citosol provoca la unión de este con aquella, ocasionando que se una PMCA a la CaM, disminuyendo así la afinidad del Ca^{2+} con PMCA (Benaim, 2004).

2. ATPasa DE CALCIO DEL RETÍCULO SARCO/ENDOPLÁSMICO

La captación de Ca^{2+} en el RE se realiza mediante una ATPasa de Ca^{2+} del RE (SERCa²⁺), con el fin de mantener una homeostasis. Esta proteína reduce la concentración de Ca^{2+} en el citosol, bombeándolo al RE por medio de la hidrólisis de ATP (Bittremieux et al., 2016; Flores-Peredo et al., 2013; Papp & Brouland, 2011). Estas proteínas están codificadas por tres genes (ATP2A1, 2 y 3), dando lugar a isoformas de la misma (Flores-Peredo et al., 2013; Papp & Brouland, 2011). Las isoformas SERCa²⁺1 y SERCa²⁺2a se expresan en el músculo esquelético y cardíaco, respectivamente; la SERCa²⁺2b es ubicua; se ha descrito la expresión de SERCa²⁺3 en células de origen hematopoyético y células epiteliales seleccionadas como el epitelio colónico, gástrico, así como en tejido mamario, donde SERCa²⁺3 se ve expresada de manera abundante, teniendo un sistema de captación de Ca^{2+} bastante especializado (Papp & Brouland, 2011). En estudios previos se observa que algunas proteínas apoptóticas, como P53 estimulan la activación de la proteínas SERCa²⁺, aumentando la concentración de Ca^{2+} en el RE; por el contrario, proteínas antiapoptóticas (oncogénicas), como Bcl-2 y Ras reducen los niveles de Ca^{2+} en el RE a través de la fuga del mismo al citosol (Bittremieux et al., 2016; Palmer et al., 2004), lo que nos muestra la importancia de esta proteína en células sanas.

3. *INTERCAMBIADOR NA/CA*

El intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), es una proteína que se encuentra en la MP de todas las células de mamífero. Este es codificado por tres isoformas de genes, las cuales generan NCX1, NCX2 y NCX3 (Lytton, 2007). Esta proteína actúa moviendo iones Ca^{2+} y Na^+ hacia adentro y afuera, dependiendo de la dirección de la fuerza electroquímica en ambos lados de la membrana celular (Lytton, 2007; Mordecai & Lederer, 1999). Junto a la PMCA y canales selectivos de Ca^{2+} , esta proteína elimina Ca^{2+} del citosol, sin embargo, el NCX predomina en la extrusión de Ca^{2+} , eliminando 3 iones Ca^{2+} por cada ion Na^+ (Mordecai & Lederer, 1999). La actividad de este intercambiador es bastante activa en el corazón, ya que es importante en la regulación de la contracción (Philipson & Nicoll, 2000).

4. *BOMBA DE CALCIO DE LA RUTA SECRETORA*

La bomba de Ca^{2+} de la ruta secretora (SPCA), junto con la PMCA y SERCa^{2+} , se encuentra dentro de la familia de las ATPasas y provoca la entrada de Ca^{2+} en contra de su gradiente de concentración a los reservorios internos de la célula, es decir, promueven el retorno de Ca^{2+} a sus estados basales (Brini & Carafoli, 2009; Wootton et al., 2004). Esta bomba es muy similar a SERCa^{2+} , con la diferencia de que SERCa^{2+} se expresa tanto en el RE como en el AG, mientras que SPCA es exclusiva del AG (Wuytack et al., 2003). Otra diferencia entre ambas bombas es que SERCa^{2+} sólo moviliza el ion Ca^{2+} , mientras que SPCA transporta además un ion de Mn^{2+} por cada molécula de ATP hidrolizada pues es afín a ambos por tener un radio iónico similar (Wootton et al., 2004; Wuytack et al., 2003). Este último ion es tóxico en las células, y esta bomba es la mayor ruta de remoción de Mn^{2+} del citoplasma. Se han descrito dos isoformas de esta proteína: SPCA1, la cual se expresa ubicuamente, variando los niveles de expresión según el tipo celular; y la SPCA2, se expresa de manera más alta en las células de colon, neurona hipocampo (Brini & Carafoli, 2009).

5. *UNIPORTADOR DE Ca^{2+} MITOCONDRIAL (MCU)*

Las mitocondrias son cruciales en la señalización de Ca^{2+} intracelular (Berridge et al., 2003; Rizzuto et al., 2012), ya que estos organelos también pueden almacenar este catión (Clapham,

2007). Para que las mitocondrias ingresen Ca^{2+} a la matriz mitocondrial, se requiere que se encuentren físicamente cerca del RE (Rizzuto et al., 2012). Recordemos que, para que el Ca^{2+} ingrese a la mitocondria, debe sobrepasar dos membranas. Con la externa no tienen ningún problema, sin embargo, para que ingrese por la interna es necesario un conjunto de proteínas que pueden ser canales o transportadores, como el uniportador mitocondrial de Ca^{2+} (MCU) (Clapham, 2007; Marchi & Pinton, 2014; Rizzuto et al., 2012). Esto ocurre gracias al voltaje interno de la mitocondria que se genera al bombear protones de la cadena respiratoria (ATPasa sintasa – Complejo V) (Marchi & Pinton, 2014).

La apertura o cierre del canal MCU se debe a la unión de alguno de los dos complejos MICU1 y MICU2, los cuales tienen actividades antagónicas (Patron et al., 2014; Rizzuto et al., 2012). El primero de ellos actúa a altas concentraciones de Ca^{2+} citosólico, provocando la apertura de MCU y el ingreso de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial. Por el otro lado, cuando la concentración de Ca^{2+} citosólico es baja (100nM), MCU se une a MICU2 y se mantiene cerrado (Patron et al., 2014).

Señalización de Calcio en el cáncer

Los niveles de expresión del conjunto de proteínas movilizadoras de Ca^{2+} se han visto afectados en varios tipos de cáncer, lo que provoca un aumento en la expresión de genes, dándole ventajas proliferativas a células cancerígenas (Flores-Peredo et al., 2013; Pratt et al., 2020; Roderick & Cook, 2008). Por ejemplo, en (Pottle et al., 2013) se observó un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular en MCF-7 en comparación de MCF-10A, lo que sugiere que las células provenientes de cáncer dependen de Ca^{2+} para su proliferación. Este mismo patrón se observa en varios estudios donde las líneas celulares de cáncer generan mayor expresión de proteínas que provocan un aumento de Ca^{2+} intracelular, como se observa en la Ilustración 4, lo que respalda la idea de que estas líneas dependen de este catión para aumentar su proliferación celular (Roderick & Cook, 2008).

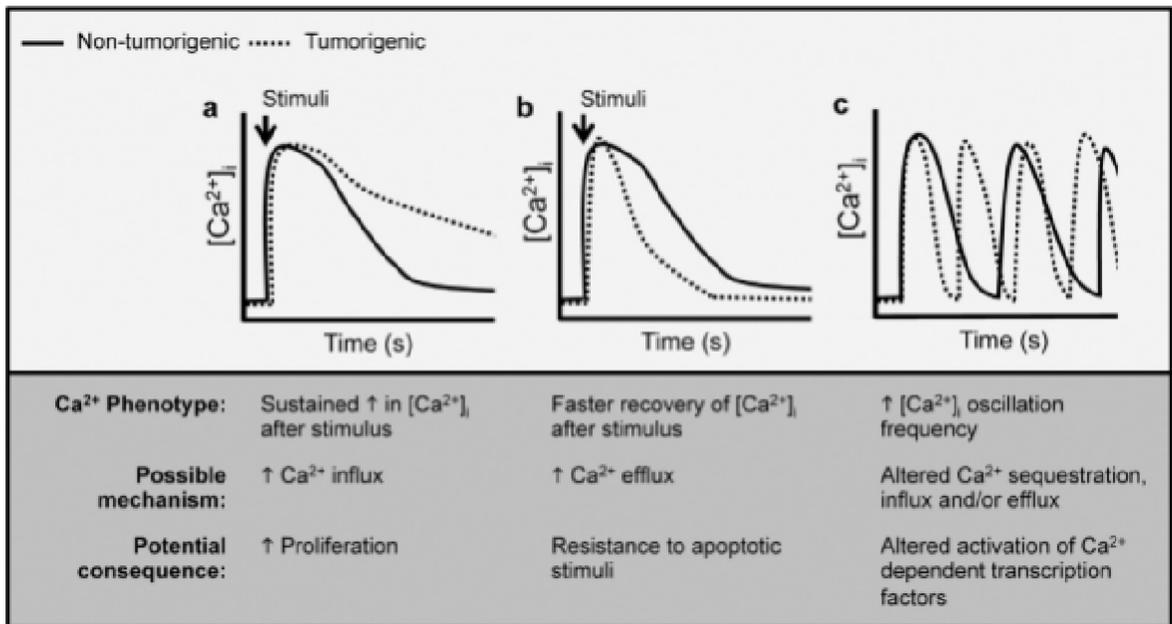


Ilustración 4. Diferencia en la movilización de Calcio entre una célula cancerígena y una no cancerígena. Tomado y modificado a partir de Stewart, 2015

Algunas bombas de Ca^{2+} de la MP, como PMCA1 y PMCA2, se ha observado sobreexpresadas entre 100 y 270% veces más en líneas celulares de cáncer con respecto a líneas celulares normales, lo que conlleva a que haya un aumento en la proliferación celular en las cancerígenas (Lee et al., 2002, 2005). Lo mismo ocurre en otras proteínas transmembrana, el silenciamiento de proteínas como TRPC3 y TRPC6 es provocado por el silenciamiento de los genes correspondientes a estas proteínas (Aydar et al., 2009). TRPV6, TRPM7 y TRPM8 son otras proteínas que se expresan más abundantemente en cáncer. Esta alta expresión se ve correlacionada con una mayor tasa de mortandad (Peters et al., 2012), un aumento en la proliferación celular (Guilbert et al., 2009), y una mayor facilidad para que ocurra una metástasis (Liu et al., 2014).

Además de proteínas de la MP, algunas proteínas embebidas en las membranas de los orgánulos también se expresan de manera diferencial en líneas celulares de cáncer con respecto a las normales, como es el IP_3R en el RE (Mound et al., 2017), la SPCA2 del AG (Feng et al., 2010) o el MCU en la mitocondria (Tang et al., 2015). Por un lado, el IP_3R

aumenta la capacidad de migración de las células cancerígenas cuando se encuentra mayormente expresado a través de la movilización del Ca^{2+} (Mound et al., 2017); y por el otro, una alta expresión de SPCA2 aumenta la concentración de Ca^{2+} citosólico, aumentando la proliferación celular en líneas de cáncer (Feng et al., 2010). Para finalizar con este apartado, también se ha observado una expresión más elevada de mRNA de ORAI 1 (McAndrew et al., 2011) y ORAI3 (Faouzi et al., 2011). Por lo visto un aumento en de ORAI1 indica una mayor proliferación celular, y una alta expresión de ORAI1 indica un aumento en el estímulo de factores de crecimiento y factores pro invasivos que se relacionan a la dinámica de Ca^{2+} .

La señalización de Ca^{2+} se logra mediante el trabajo conjunto de proteínas selectivas al Ca^{2+} (Berridge et al., 2003), una mala regulación de estas proteínas conllevaría a un aumento en la proliferación celular (Monteith et al., 2007). Esto se observa en líneas celulares de cáncer, ya que requieren una alta concentración de Ca^{2+} citosólico para asegurar el éxito de su supervivencia, metástasis y proliferación.

Capsicum annuum L.

Desde hace bastantes años se han reportado compuestos fitoquímicos como agentes citotóxicos en líneas celulares de cáncer, teniendo poder antiproliferativo, apoptótico y/o actividad antiinflamatoria (Jeon et al., 2008; Khan et al., 2014; Maoka et al., 2001; Park et al., 2012). En la Ilustración 5 se observan los compuestos presentes en *Capsicum annuum* L. var. Facinato, una de las variedades que estamos estudiando, así como estudios que respaldan el poten que tienen ante líneas celulares provenientes de cáncer.

Como se puede observar en el costado derecho de la Ilustración 5, existe una lista de compuestos que están presentes en estas variedades, por lo que nos dimos a la tarea de identificar estudios científicos que respalden que estos metabolitos tienen alguna actividad antitumoral en líneas celulares de cáncer, datos que se muestran en las Tablas 1 y 2.

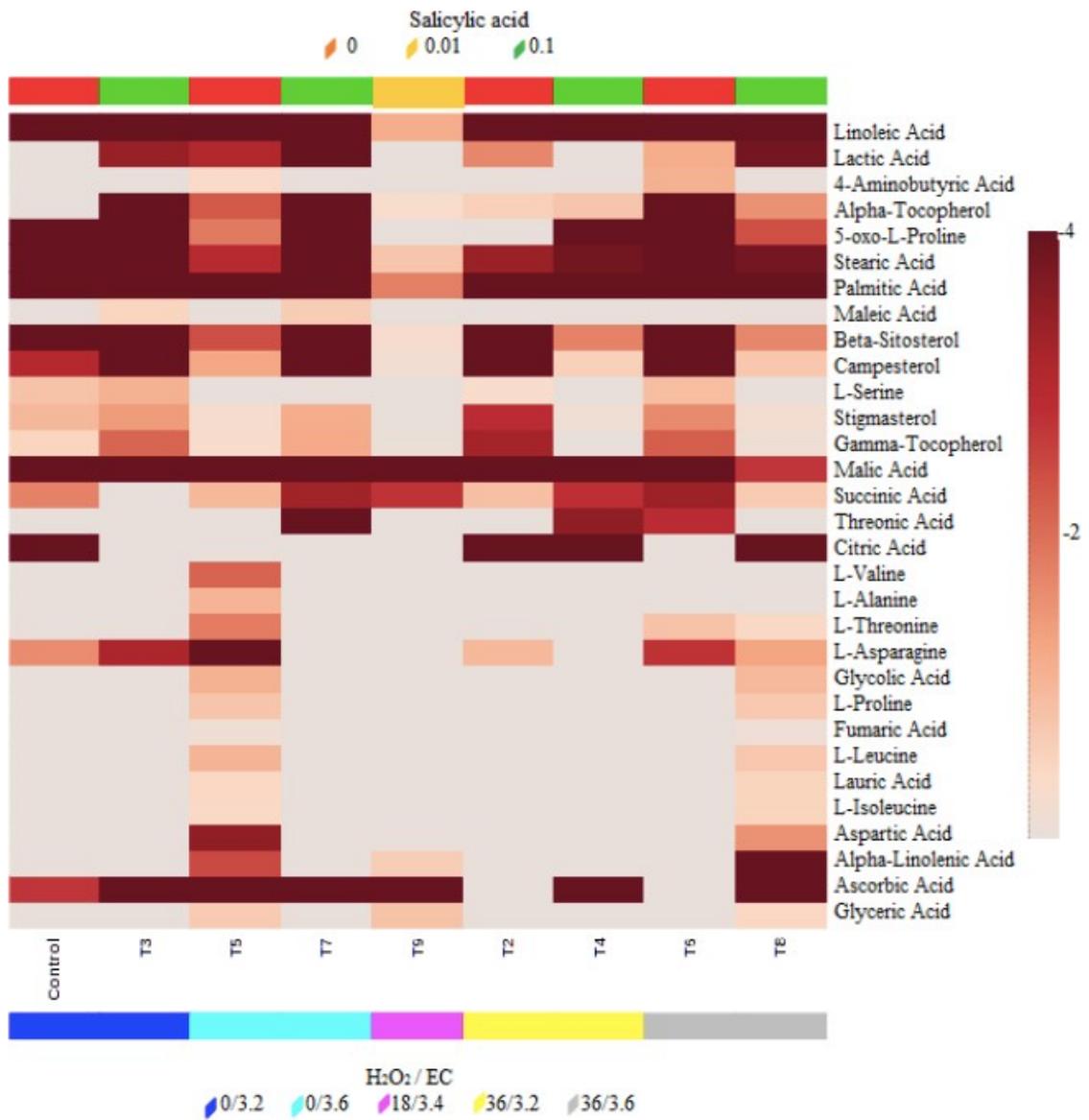


Ilustración 5. Tomado de (Jiménez-García, 2015). Mapa de metabolitos presentes en *C. annuum* L. var. Fasinato. Las muestras se indican en las barras inferiores (Ctrl, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9). Las columnas representan las concentraciones de elicitores.

Tabla 1. Fenoles presentes en extracto de *Capsicum annum L.*

FENOLES		
COMPUESTO	ACTIVIDAD	REFERENCIA
Ácido clorogénico	Disminuye la proliferación en células de cáncer de colon junto a ác. Cafféico, ác fenilpropiónico y ác. benzoico	(Ekbatan et al., 2018)
Galato de Epigallocatequina	Interfiere en la tasa de crecimiento tumoral en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231	(Gianfredi et al., 2017)
Ácido sinápico	El ácido sinápico tiene actividad antiinflamatoria, pero sus derivados tienen aún mayor actividad antiinflamatoria	(Zhang et al., 2017)
Vainillina	Antioxidante, antiinflamatorio, antibacteriano y antitumoral. Vainillina como agente anticanceroso, inhibiendo la proliferación celular (hepatocitos humanos) dosis dependiente. Reducción en la despolarización de la membrana mitocondrial y producción de EROs y apoptosis	(Naz et al., 2018)
Quercetina	Osteosarcoma. Quercetina es flavonoide con propiedades anticancerosos, atenuó la migración celular, atenuó formación de tumores, pues detiene ciclo celular, metástasis y angiogénesis celular	(Lan et al., 2017)
Resveratrol	Polifenol natural, antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno. Cáncer colorrectal y de piel. Suprime inflamación y elimina EROs, suprime estrés oxidativo	(Elshaer et al., 2018)

Tabla 2. Carotenoides presentes en *Capsicum annum L.*

CAROTENOIDES		
COMPUESTO	ACTIVIDAD	REFERENCIA
Luteína y B-Caroteno	Carotenoides dietéticos reducen cáncer de mama. Inhibe significativamente crecimiento celular, induce detección del ciclo celular y muerte celular independiente de caspasas. Luteína aumenta la producción de EROs en células de cáncer de mama, pero no en normales, se activa p53	(Gong et al., 2018)
Tocoferol	Una dosis de 0.2% de tocoferoles inhibió la tumorigénesis mamaria, hubo una reducción del crecimiento de tumores mamarios en ratas	(Gupta et al., 2018)
B-Criptoxantina	Regular diferencialmente la expresión de P73 in vitro e in vivo. Disminuye la proliferación celular e induce apoptosis regulando negativamente P73	(Millán et al., 2015)
Licopeno	Consumo de licopeno disminuye el riesgo de cáncer de próstata en estudio poblacional desde 1986 a 1998	(Giovannucci et al., 2002)
Ácido linoleico	El Ácido linoleico reduce el crecimiento celular en tumores de mama de manera dosis dependiente. También se demostró que el efecto de este ácido en las células tumorales podría estar asociado a la generación HETE, un metabolito que disminuye en tumores malignos, donde se ve mayor expresión comparado con tejidos normales.	(Kim et al., 2005)

JUSTIFICACIÓN

Estudios previos muestran que, compuestos como fenoles y carotenoides, tienen un efecto citotóxico, realizando una movilización de Ca^{2+} citoplasmático en procesos como el cáncer (Jeon et al., 2008; Khan et al., 2014; Maoka et al., 2001; Park et al., 2012), inhibiendo la viabilidad celular. Sin embargo, aún no se sabe con certeza el mecanismo por medio del cual ocurre, ni si esta movilización ocurre de manera diferencial entre líneas celulares MCF-12F y MCF-7.

Se ha considerado que los compuestos bioactivos presentes en el concentrado de *Capsicum annuum L.* modulan la expresión genética de proteínas movilizadoras de Ca^{2+} , como SERCa²⁺, teniendo un efecto en la expresión diferencial de genes, activada por cambios en la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma, así como la forma en que es regulada en el tiempo.

En nuestro grupo de trabajo, creemos que la movilización de Ca^{2+} actuando como segundo mensajero, modulará la respuesta celulares y transcripcional de las líneas celulares de mama que planteamos usar en nuestro estudio. Esto pondrá por primera vez en evidencia, cual es la respuesta a corto plazo que induce una expresión diferencial del genoma de estas líneas celulares, ante el reto de concentraciones crecientes de Calcio en espacio y tiempo, inducida por compuestos bioactivos presentes en un concentrado de *Capsicum annuum L.*

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta ahora se sabe que los componentes en el concentrado de *Capsicum annuum* L. provocan la movilización de Ca^{2+} celular por medio de la activación de genes de proteínas especializadas. Sin embargo, aún no es conocida la concentración y variedad que provoca una mayor señalización de Ca^{2+} en la célula, y si esta movilización proviene del espacio extracelular o de los reservorios intracelulares. Esto por esto que, consideramos necesario estudiar distintas concentraciones de los biocompuestos encontrados en especies de este género. El conocer el resultado implica que podamos utilizar otras especies del género. para hacer investigación que aporte en el conocimiento sobre la movilización de Ca^{2+} , deseando pueda servir en un futuro para investigación biomédica. Con el apoyo del laboratorio de Proteogenómica de la Universidad Nacional Autónoma de México, el laboratorio de Biofísica de membranas de la Universidad Autónoma de Querétaro y el Laboratorio Nacional de Visualización Científica avanzada cede UAQ (LAVIS-UAQ) y con los recursos obtenidos gracias a la Dra. en C. Verónica Morales Tlalpan y el Dr. en IBB Carlos Saldaña Gutiérrez, así como todo el equipo que está detrás de ellos y que la Universidad Autónoma de Querétaro nos aporta y apoya este proyecto será posible.

HIPÓTESIS

Los concentrados crudos de *Capsicum annum* L, alteran la expresión de genes involucrados en la dinámica de Calcio en las líneas celulares de mama MCF-12-F y MCF-7.

OBJETIVOS

Caracterizar la dinámica de Calcio a través de estudios biofísicos y moleculares en células de mama MCF-12-F y MCF-7, inducida por extractos de *Capsicum annuum* L.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el papel que tienen los extractos de *Capsicum annuum* L. en la viabilidad de células de mama MCF-12 y MCF-7.
2. Conocer la dinámica de Calcio por medio de los 3 concentrados de *Capsicum annuum* L.
3. Determinar tanto las dosis como los tiempos óptimos de respuesta que movilizan Calcio (por medio de τ_{on} y τ_{off}).
4. Establecer las condiciones de concentración de los extractos de *Capsicum annuum* L., para la generación de una base de datos transcriptómicos así como los posibles marcadores moleculares que nos den información de los cambios de expresión génica al retar a las diferentes líneas celulares.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIA VEGETAL

Los extractos metanólicos con los cuales se trabajó provienen de una extracción en crudo de los frutos del pimiento morrón *C. annuum* L., mismos que se obtuvieron de cultivos manipulados experimentalmente (ECE), permitiendo que se favoreciera la síntesis de compuestos bioactivos. Las muestras fueron cortadas, congeladas en nitrógeno líquido, molidas en licuadora marca KRUPS y guardadas protegiéndolas de la luz en un ultracongelador a T° de -70°C hasta su uso. El perfil de los concentrados se obtuvo por medio de HPLC en el Laboratorio de Metabolitos y Nanocompuestos, dando como resultado los extractos metanólicos de *C. annuum* L. ricos en fenoles y carotenoides.

CULTIVO CELULAR

Se realizó el cultivo de las líneas celulares MCF-12F y MCF-7 en el laboratorio de proteogenómica de la UNAM campus Juriquilla. Las condiciones a las cuales se mantuvo son las siguientes: 37°C, 5.0 % CO₂ y humedad controlada. Se les suministra el medio de cultivo DMEM, el cual está enriquecido con NaHCO₃, 10% de Suero Fetal Bovino, 1% de penicilina y 1% de estreptomycinina y un tampón que permite mantenerlo a un pH = 7.4. Las células crecieron en monocapa y se lavaron con PBS (Buffer Fosfato Salino) 1X y verseno 1X, posteriormente se les añadió tripsina al 0.5% para despegarlas, la cual se inactivó al resuspenderlas en el medio DMEM. Las cajas al 80-100% de confluencia se utilizaron para realizar los siguientes experimentos. Se comienza a trabajar con una confluencia entre el 80 y 100%. En la Ilustración 6 se puede observar su morfología.

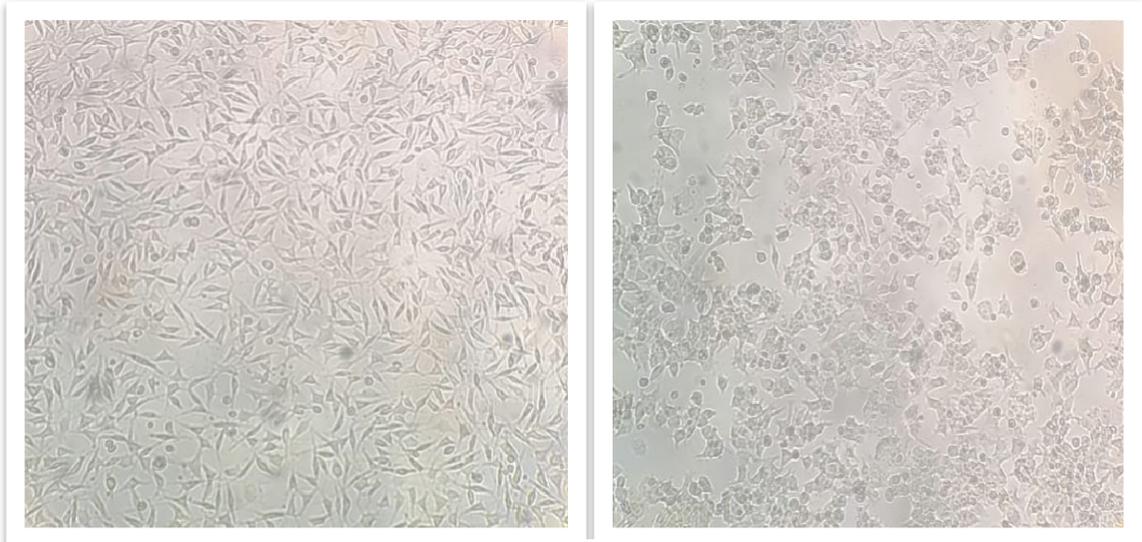


Ilustración 6. Morfología epitelial de las líneas celulares MCF-12F y MCF-7 respectivamente. Fotografías tomadas en exclusivo para este estudio.

CONTEO CELULAR Y VIABILIDAD CELULAR POR MEDIO DE ALAMAR BLUE

Se realizó un conteo celular para conocer la viabilidad del cultivo por medio de Alamar Blue (Rampersad, 2012), el cual consiste en producir EROs en nuestros cultivos a diferentes concentraciones y tiempos en presencia de los extractos de *Capsicum annuum* L. El reactivo utilizado es el Alamar Blue, el cual detecta a las células que tienen un metabolismo activo, haciendo una cuantificación de células viables y proliferación de las mismas. El objetivo de este reactivo es detectar el estado redox de las células al momento de la oxidación de la resazurina (de color azul) reducida a resorufina (color rosa), cambio de color que corresponde a la oxidación del reactivo, como se puede observar en la Ilustración 7. En este ensayo se utilizó una placa de 96 pozos, 48 para MCF-7 y 48 para MCF-12-F, de cada pozo de la placa se sembraron 5,000 células (contadas por medio de cámara de Neubauer), 1mL de medio de cultivo DMEM, 20 μ L del extracto de *Capsicum annuum* L. a diferentes concentraciones y el 10% del reactivo Alamar Blue (poniendo controles tanto negativos como positivos). Se les añadieron los extractos de *Capsicum annuum* L. a distintas concentraciones (0.01, 0.1, 1

y 10mg/ml) y se determinó la actividad metabólica a distintos tiempos (24h y 48h) con el 10% del reactivo Alamar Blue. Se determinó la fluorescencia en un espectrofotómetro de placas (VariosKan™ Lux LUX Multimode Microplate Reader; Thermo Fisher, USA; Colaboración con la Unidad de Proteogenómica UNAM) a una longitud de onda de excitación de 530- 560 nm y de emisión a una longitud de onda de 590 nm. Finalmente, los resultados se analizaron trazando la intensidad de la fluorescencia vs la concentración del tratamiento con el extracto de *Capsicum annuum* L. (AlamarBlue® Cell Viability Assay Protocol, ThermoFisher).

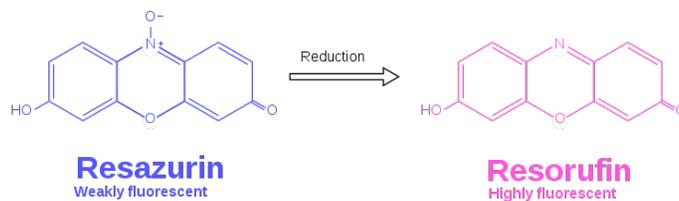


Ilustración 7. Principio de la oxidación de resaruzina a resorufina (imagen de referencia)

DETERMINACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR POR MEDIO DE FLUO-4AM

El desarrollo de indicadores sensibles al Calcio, como lo es Fluo-4AM, ha apoyado en la comprensión e interpretación de la señalización de Calcio intracelular, intentando cuantificar el Calcio tanto en el citoplasma como en los reservorios internos. El Fluo-4AM es un reportero que se une al Calcio y, al ocurrir la unión, aumenta la fluorescencia del mismo. Se espera que se registren las concentraciones intracelulares de Calcio a las 24h de cultivo. A las líneas celulares se les añadió 5 μM de Fluo-4-AM (Invitrogen, 2011), solución Krebs (KS, contenido en mM): 150 NaCl, 1 KCl, 1 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 4 Glucosa, 10 HEPES, pH ajustado a 7.4, suplementado con 0,5% de BSA y 0,01% de ácido plurónico, durante 20 min a temperatura ambiente. Se les realizó un lavado a las células con KS, para eliminar el Fluo-4-AM extracelular. Se observaron las células cargadas y se colocaron en un microscopio MVX 10 Olympus con una amplificación de 630 aumentos, y una cámara XM10 Olympus, a una

velocidad de captura de una imagen por segundo. Se realizaron mediciones fluorescentes utilizando un cubo de fluorescencia de GFP.

La captura de imágenes en tiempo real de las células tratadas con los extractos metanólicos se obtuvieron con el programa Cell P y CellSence de Olympus. Las imágenes se guardaron en formato avi. En el programa *Image J* se realizó el análisis de las regiones de interés 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 2019, en donde se reporta la media de las UFAs de los ROIs seleccionados a través del tiempo de las diferentes concentraciones de los extractos metanólicos (Saldaña et al., 2009a).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de las imágenes obtenidas en la dinámica de Calcio se utiliza el software estadístico OriginLab Pro 2019. Se utilizó un diseño experimental aleatorizado para evaluar el efecto en la movilización de Calcio debido a la aplicación de cada uno de los 3 extractos en las líneas celulares MCF-12F y MCF-7 a distintas concentraciones (0.1mg/mL, 1mg/mL y 10mg/mL), con duplicado de cada tratamiento.

RESULTADOS

1. Viabilidad celular por el método de Alamar blue

En la Figura 1 se muestra la citotoxicidad de los liofilizados en las líneas celulares MCF-12F y MCF-7 debido a la reducción del Alamar Blue oxidado gracias a las mitocondrias de las células viables. El equipo de trabajo encontró que las células tratadas con mayor concentración de los liofilizados mostraron una reducción significativa en la viabilidad celular en ambas líneas celulares, es decir, se muestra una citotoxicidad dosis-dependiente. Además, se observa una menor viabilidad celular en células tratadas sólo por 24h con los liofilizados, comparado con las células tratadas durante 48h con los mismos.

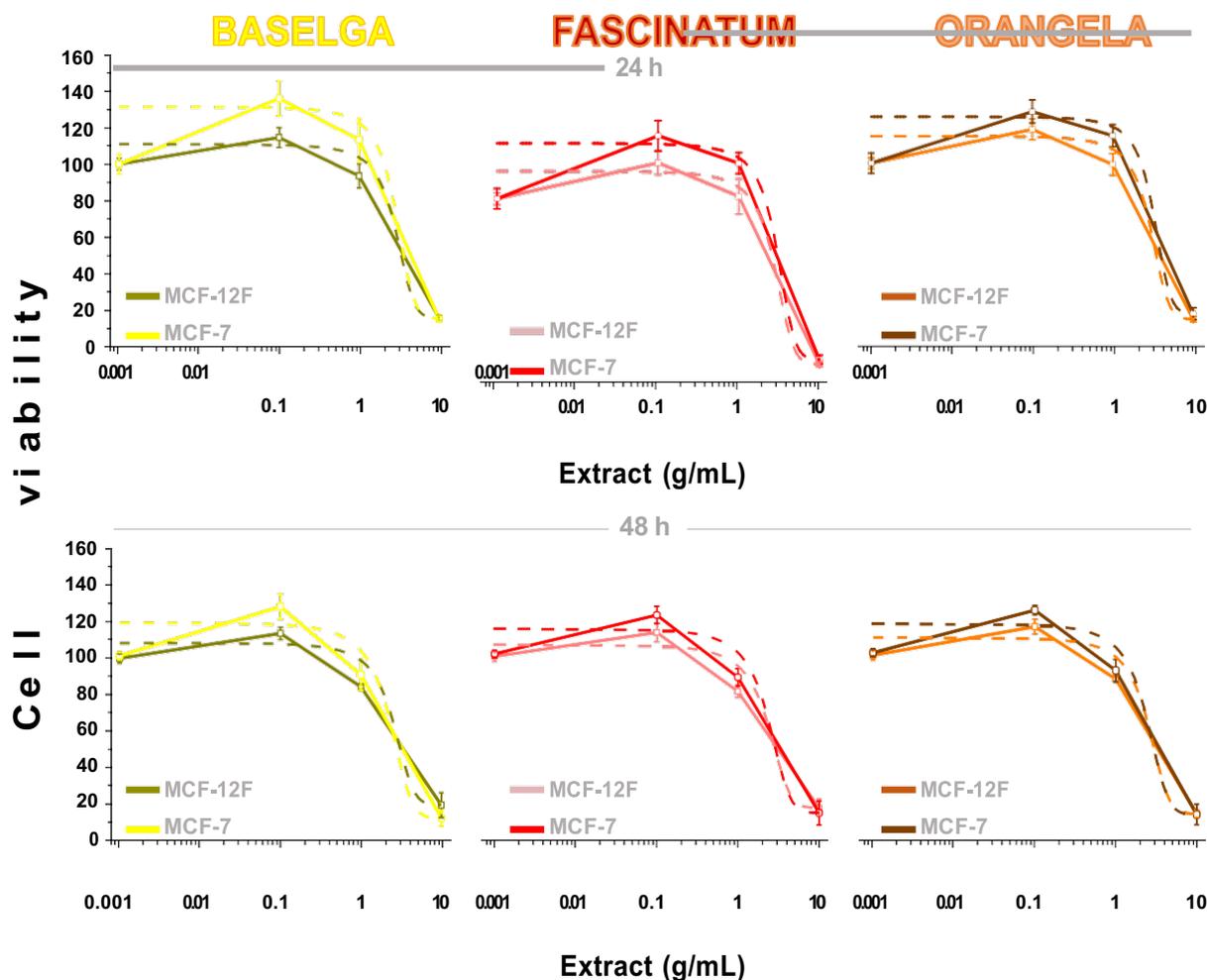


Figura 1. Viabilidad celular en MCF-7 y MCF-12F luego de 24h y 48h de incubación con las 3 variedades de *Capsicum annum L.*

La viabilidad celular de MCF-12F y MCF-7 se vio disminuida al agregar los extractos crudos de *Capsicum annuum* L. de las 3 variedades. Ambas líneas celulares muestran valores de Ki similares para las 3 variedades de *Capsicum annuum* L., como se puede observar en la ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.. Los resultados indican que la viabilidad celular se ve disminuída en ambas líneas celulares, obteniendo una citotoxicidad dosis-dependiente.

Tabla 3. Valores de Ki en ambas líneas celulares al aplicar las distintas variedades de *C. annuum* L.

Extract	MCF-12F		MCF-7	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Baselga	2.80616	2.45323	2.80616	2.15467
Fascinatum	2.71954	2.24948	2.92376	2.25852
Orangela	2.86619	2.42248	3.17695	2.30444
$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)*p)})$ Logx0 = Ki				

2. Determinación de Calcio intracelular por el método de Fluo 4-AM

2.1. Determinación de Calcio intracelular con medio rico en Calcio

En este trabajo también nos centramos en el estudio de la dinámica de Calcio citosólica provocada por tres extractos metanólicos provenientes de la especie *Capsicum annuum* L. en dos líneas celulares de mama, MCF-12F y MCF-7. Se utilizó un indicador sensible a Calcio, llamado Fluo-4AM que, al unirse a Calcio emite mayor fluorescencia, misma que nos ayudará a cuantificar el Calcio citosólico de manera indirecta.

La movilización basal de Calcio se midió antes de realizar el experimento, con el objetivo de observar el transitorio que provocan los extractos al aplicarlos. Posteriormente se aplicó cada extracto a cierta concentración y se realizó la medición del experimento durante 200 seg.

En la Figura 2 se muestran los resultados de los transitorios de Calcio, donde se presenta la dinámica basal y, posteriormente, 200 seg de dinámica de Calcio al aplicar el extracto Baselga a distintas concentraciones (0.1, 1 y 10 mg/mL) en las líneas celulares MCF-12F y MCF-7. Podemos observar que existe un aumento bastante pronunciado y veloz, así como

una disminución lenta en ambas líneas celulares. Se observa además que la disminución es más lenta a mayor concentración del extracto.

En la Figura 3 y la Figura 4 se observan los mismos resultados, pero al aplicar los extractos Fasinato y Orangela, respectivamente. Se puede observar que la disminución de Calcio en la línea celular MCF-7 es más lenta que en la línea MCF-12F, debido, probablemente, a la deficiencia que tienen las células MCF-7 de almacenar Calcio en el RE.

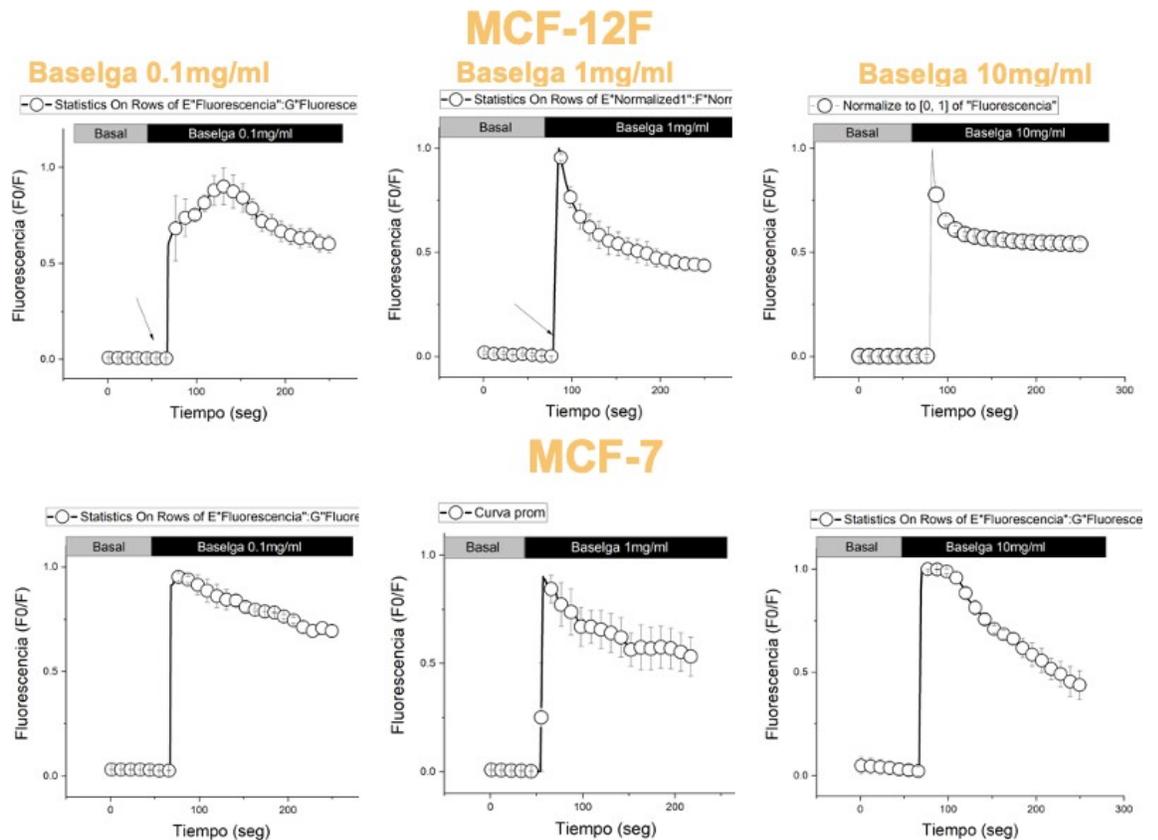


Figura 2. Dinámica de Calcio en células MCF-12F y MCF-7 al aplicar Baselga a las concentraciones de 0.1, 1 y 10 mg/mL

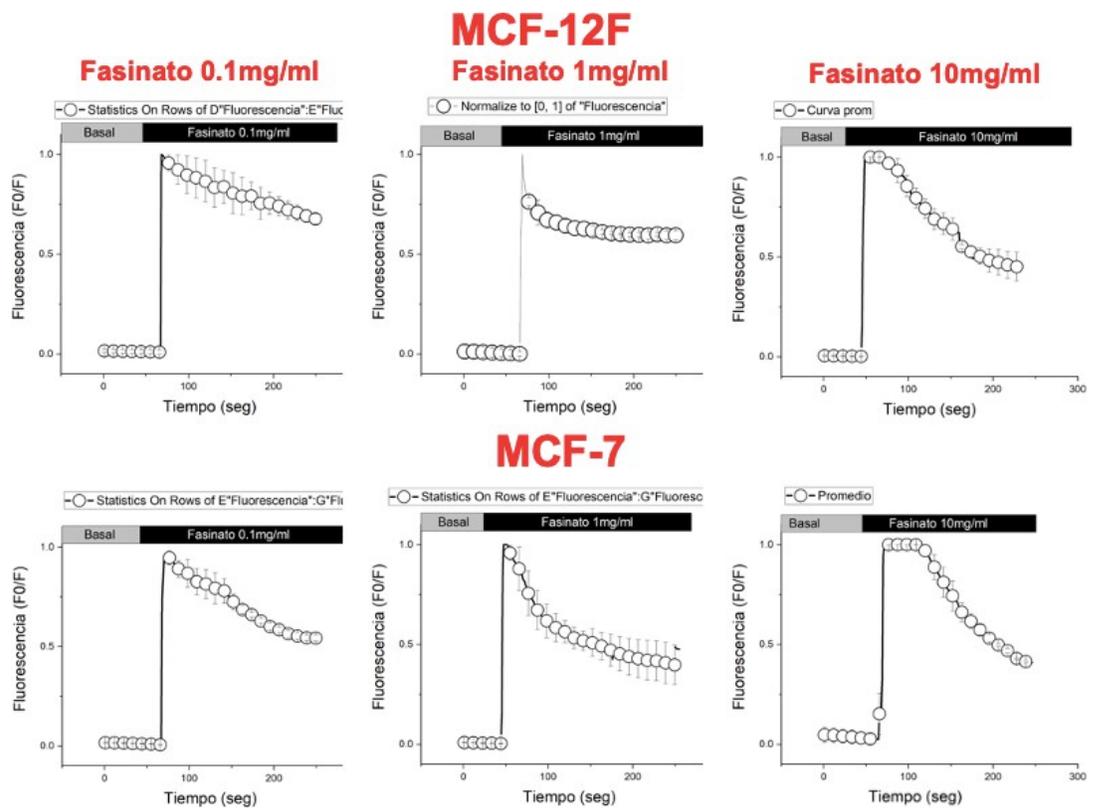


Figura 3. Dinámica de Calcio en células MCF-12F y MCF-7 al aplicar Fasinato a las concentraciones de 0.1, 1 y 10 mg/mL

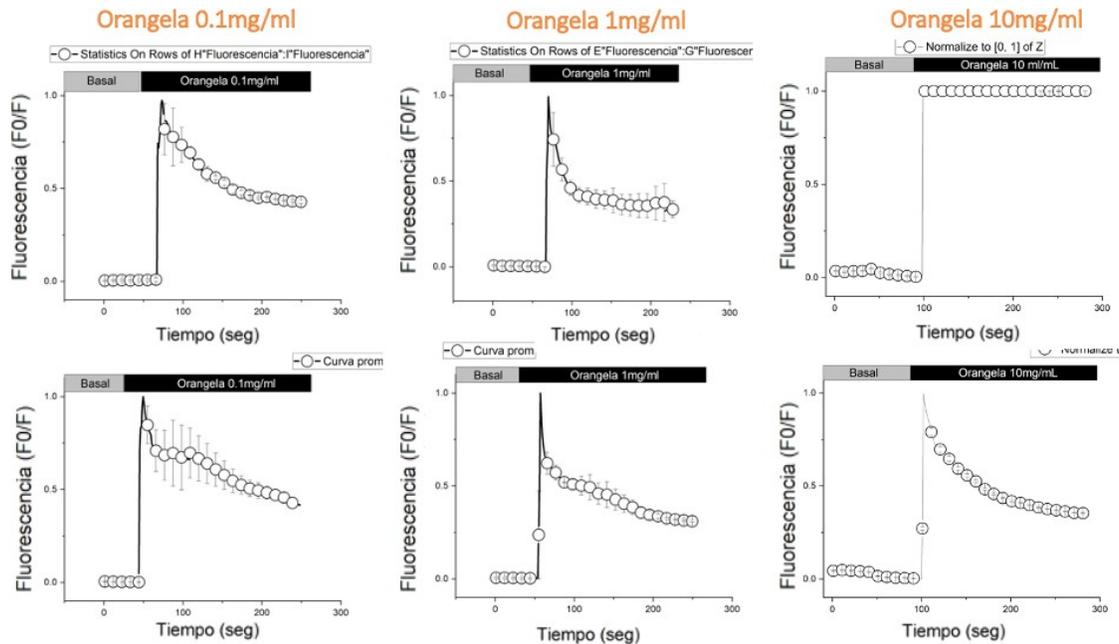
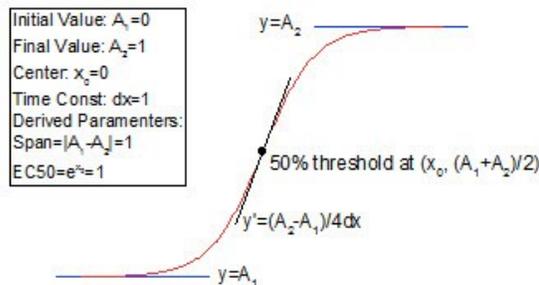


Figura 4. Dinámica de Calcio en células MCF-12F y MCF-7 al aplicar Orangela a las concentraciones de 0.1, 1 y 10 mg/mL

Para conocer los tiempos de activación (τ_{on} y τ_{off}) que se requieren para aumentar el Calcio al aplicar los extractos se utilizó la función matemática que mejor se ajustara al comportamiento presentado: el modelo de Boltzmann, el cual presenta una gráfica sigmoideal. La ecuación de Boltzmann es la siguiente:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2$$

Donde:



Como se puede observar, el valor de X_0 es el tiempo que se tarda en llegar al valor medio de Y , es decir, es el tiempo medio que tarda el Calcio en llegar a su pico máximo desde que inicia el aumento. A continuación, se muestran los resultados obtenidos al analizar tanto el aumento como el descenso de Calcio con la ecuación de Boltzmann.

En la Tabla 4 se muestran los valores de X_0 obtenidos al someter cada uno de los resultados al modelo de Boltzmann. Como se puede observar, al aumentar la concentración del extracto, disminuye el valor de X_0 , indicando que, a mayor concentración del extracto, mayor velocidad de activación de Calcio. Este comportamiento se observa en todos los datos, en ambas líneas celulares. Además, cabe destacar que, a pesar de que la velocidad de activación es bastante similar y rápida, se observan valores de activación menores en la línea celular MCF-7 que en la línea MCF-12F, lo que podría indicar una de dos cosas: a) que el ligeramente elevado nivel de Calcio basal presente en esta línea celular MCF-7 genere que el Calcio aumente a mayor velocidad que en MCF-12F o que b) los mecanismos de activación son más eficientes en la línea MCF-7 que en la MCF-12F.

Tabla 4. Valores de τ_{on} obtenidos con el modelo de Boltzmann

τ_{on}	BASE GA		FASINATO		ORANGELA	
	MCF-12F	MCF-7	MCF-12F	MCF-7	MCF-12F	MCF-7
0.1 mg/mL	19.73	4.50	5.47	3.92	5.82	5.40
1 mg/mL	4.91	4.00	4.62	3.01	5.17	3.35
10 mg/mL	3.60	3.05	3.32	2.73	4.50	3.22

Posteriormente se sometieron los datos de τ_{off} al modelo de Boltzmann para conocer sus tiempos de retorno de Calcio a los niveles basales, obteniendo los datos de la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** En estos datos se observa un patrón en los resultados, pues a mayor concentración del extracto, el valor de la derivada de X_0 es menor, es decir, tiene una pendiente menor, lo que indica que se requiere mayor cantidad de tiempo para que el Calcio retorne a sus niveles basales. Esto podría deberse a que hubo mayor movilización

de Calcio hacia el citosol, por lo que el tiempo de retorno tendría que ser mayor (este comportamiento se observa en todos los datos obtenidos).

Tabla 5. Valores de τ_{off} obtenidos con el modelo de Boltzmann

$\Delta\tau_{off}$	BASELGA		FASINATO		ORANGELA	
	MCF-12F	MCF-7	MCF-12F	MCF-7	MCF-12F	MCF-7
0.1	15.11	25.6	29.47	36.82	20.9	26.84
1	13.09	24.3	22.04	33.85	6.48	22.88
10	9.23	21.7	14.58	23.79		38.15

2.2. Determinación de Calcio intracelular con medio libre de Calcio

Por otro lado, para poder descartar que el aumento de Calcio citosólico se debe sólo a la entrada capacitativa desde el medio extracelular, se realizaron los experimentos a la concentración de 1 mg/mL, esperando observar un aumento transitorio de Calcio. Las células se bañaron en KS rico en Calcio durante 20 min. En estas condiciones, la célula almacenó Calcio en el RE. Posteriormente se eliminó el medio y se añadió KS libre de Calcio, manteniendo a la célula en un ambiente extracelular sin Calcio, con el objetivo de observar si se presentaba un aumento de Calcio al aplicar los extractos. Posteriormente se añadió taspigargina 1 μ M para descartar la presencia de Calcio en el RE luego de la aplicación del extracto. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se observan los resultados obtenidos en ambas líneas celulares.

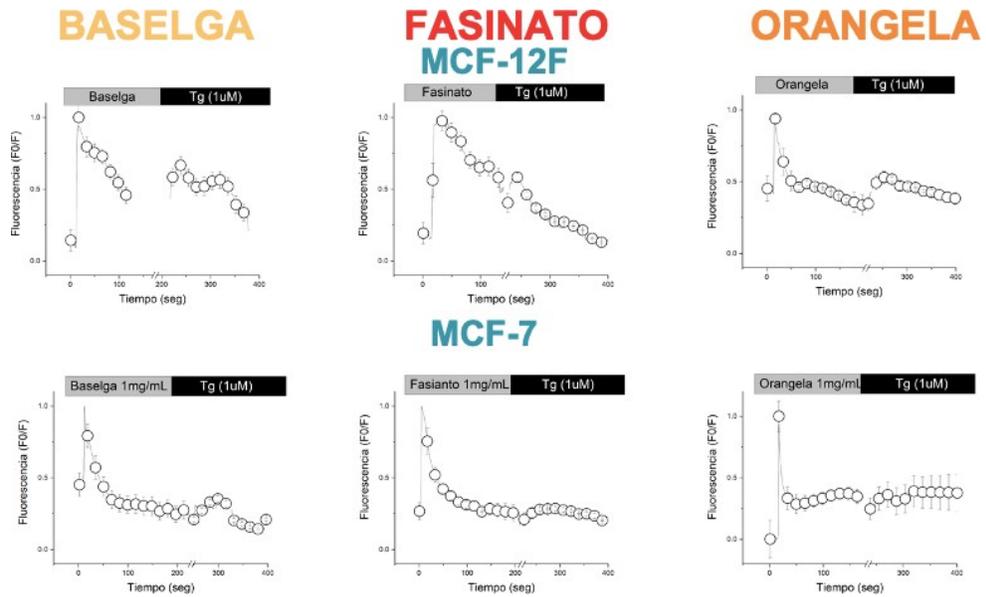


Figura 5. Efecto de Baselga, Fasinato y Orangelá a la concentración de 1mg/mL en células MCF-12F y MCF-7, y posterior aplicación de Tapsigargina 1uM.

Como podemos observar, en las gráficas de cero Calcio, también se aprecia un pico, lo que nos indica que este Calcio proviene del RE y demás reservorios internos de la célula, puesto que no había Calcio en el medio extracelular.

Al comparar los tiempos de activación de las células en medio rico en Calcio con los de medio libre de Calcio se encontraron resultados bastante interesantes. En ambas líneas celulares hubo mayor retardo en la subida de Calcio en los experimentos libres de Calcio extracelular, en comparación con aquellos donde sí había Calcio, por lo que: 1) la subida de Calcio en los primeros experimentos se debía tanto a la entrada capacitativa desde el medio extracelular, como a la liberación de reservorios como el RE y 2) la escasez de Calcio en el medio extracelular retrasó la subida de Calcio en el citosol, sin embargo no la anuló, pues el Calcio se liberó del RE. Otro aspecto importante es que ahora la línea celular MCF-7 es la que requiere mayor cantidad de tiempo en aumentar el Calcio citosólico (al menos en Baselga y Fasinato), debido quizá a 1) la deficiencia de isoformas de RyR que tiene esta línea celular, pues se ha reportado que sólo presenta la isoforma RyR1 o a que 2) la mayor cantidad de Calcio que ingresaba al citosol provenía del medio extracelular y que, al no tenerlo,

provocó una disminución en el tiempo de aumento de Calcio. En cuanto a la disminución de Calcio, se observa que la línea MCF-7 moviliza Ca^{2+} de manera más eficiente en comparación a su contraparte MCF-12F, esta debido posiblemente a la menor concentración de Calcio que almacena esta línea celular, en comparación con MCF-12F, donde las bombas y canales del RE trabajan de manera eficiente. A menor concentración de Ca^{2+} en el RE, menor tiempo de retorno de Calcio a sus niveles basales.

Tabla 6. Comparación de los tiempos de activación en células MCF-12F y MCF-7 al aplicar los extractos de *C. annuum* L 1 mg/mL en medio con Calcio y medio libre de Calcio.

	BASE GA		FASINATO		ORANGELA	
	MCF-12F	MCF-7	MCF-12F	MCF-7	MCF-12F	MCF-7
$\Delta\tau_{\text{on}} 0\text{Ca}^{2+}$ extracelular	4.90	6.40	5.27	6.40	5.93	5.58
$\Delta\tau_{\text{off}} 0\text{Ca}^{2+}$ extracelular	33.97	21.08	64.03	19.23	16.45	10.73

3. Diseño de los primers que codifican para los genes ATP2A1, ATP2A2 y ATP2A3.

Para obtener los fragmentos parciales específicos de las secuencias para los genes de las tres isoformas de la proteína ATPasa de Calcio del Retículo Endoplásmico (SERCa^{2+}) *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*, se requirió del diseño de oligonucleótidos. El diseño de dichos cebadores lo realizó el compañero L. B. Roberto García, utilizando el portal Integrated DNA Technologies, tomando en cuenta el tamaño óptimo, temperatura de fusión, especificidad, etc. El resultado se muestra en la Tabla 7:

Tabla 7. Condiciones para el diseño de los oligonucleótidos para los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*

Tipo	Secuencia	Inicio	Tamaño	Tm	% GC	Amplicon
5'-3' Primer	CACAGAACAGGACAAGACC	723	19	59.782	52.632	
3'-5'Primer	TGTTGATAAGCCAGACAGC	826	19	59.794	47.368	
Producto						104
5'-3' Primer	GTCACTCCACTTCCTGATCC	179	20	61.412	55	
3'-5'Primer	ATGAGAATCACGGGCAAGG	377	19	61.985	52.632	
Producto						199
5'-3' Primer	CTGAAGAAAGCAGAGATCGG	532	20	60.014	50	
3'-5'Primer	TCATGTTGCTGTAGATGGC	673	19	59.87	47.368	
Producto						142

Para determinar el comportamiento transcripcional de los genes que codifican para SERCa²⁺, se requiere de poner en contacto las líneas celulares con los extractos de *Capsicum annuum* L. y realizar la extracción de RNA por el método de Trizol. A pesar de que ya se cuenta con las muestras de RNA, se requiere mayor cantidad de material genético para poder realizar los experimentos de qPCR, información que se encuentra en perspectivas.

DISCUSIÓN

Muchos factores están implicados en el desarrollo del cáncer y la señalización de Calcio parece tener un papel muy importante en muchos de ellos. Como se vio a lo largo del presente escrito, estudios previos han establecido que algunos cánceres están asociados con los cambios en la expresión de proteínas implicadas en dicha señalización, como canales, bombas e intercambiadores, provocando un aumento en la proliferación y evasión de la muerte celular. La remodelación de la señalización de estas células da como resultado el enfoque en los canales y bombas de Calcio específicos como dianas farmacológicas contra ciertos estados patológicos dentro del cáncer.

Nos hemos centrado en los posibles cambios de la expresión de proteínas implicadas en la dinámica de Calcio de la línea celular MCF-7, al suministrar extractos metanólicos ricos en compuestos fenólicos y carotenoides. De esta línea celular ya se tenían antecedentes de aberración en la expresión de proteínas como RyR y SERCa²⁺ (Saldaña et al., 2009b), sin embargo, aún no se sabía, a ciencia cierta, cómo es que se movilizaba el Calcio en ellas y qué ocurría si se suministraban compuestos bioactivos. A continuación, analizaremos los resultados obtenidos durante este proyecto, evidenciando el papel que juegan los compuestos presentes en los extractos en las líneas celulares estudiadas.

En el Figura 1, se muestra cómo es que al aumentar la dosis de los extractos metanólicos, disminuye la viabilidad celular, lo que nos indica que los extractos contienen componentes que provocan no sólo disminución en la proliferación, sino también muerte celular. El tipo de muerte que se provoca podría deberse al proceso de apoptosis, ya que se cuenta con evidencia de cuerpos apoptóticos, restos celulares que se forman solamente si la muerte celular ocurrió por apoptosis, sin embargo, aún nos falta evidenciar de manera más contundente que el mecanismo de muerte celular es programado. También es importante mencionar que los rangos de concentración que se manejaron están concentrados entre los 0.1 y los 10 mg/ml, un rango bastante amplio que nos da un rango de resultados bastante extenso. Como se observó en el Figura 2, una dosis baja (0.1 mg/mL) no genera muerte

celular, o al menos no de manera visible, pues la viabilidad celular aumentó con respecto al inicio del experimento y, por el contrario, una concentración bastante amplia (10 mg/mL) provoca una muerte celular casi completa en ambas líneas celulares, resultando sumamente tóxica para poder obtener resultados analizables. Es por ello que concluimos que la dosis que genera un cambio en la viabilidad celular considerable, sin eliminar a la mayoría de la población es la concentración de 1 mg/mL. Al analizar la función de la curva dosis respuesta, mostrados en la Tabla 3, observamos que los valores de EC_{50} (también llamados valores de K_i) son similares en ambas líneas celulares, lo que nos indica que se requiere una concentración de los extractos metanólicos bastante similar para producir un 50% del efecto máximo, es decir, para eliminar el 50% de las células viables.

En cuanto a la comparación de las dos líneas celulares, recordemos que MCF-7 proviene de un tejido de adenocarcinoma de tejido mamario, mientras que MCF-12F proviene de un tejido de mama sano, siendo este último considerado como línea control con respecto a la primera. Cuando observamos los resultados, se puede ver que la línea celular MCF-7 tiene mayor viabilidad celular que MCF-12F al aplicarle bajas concentraciones, mientras que, al aplicarle la concentración más alta, se observa una caída de la viabilidad celular similar a la línea MCF-12F.

Por otro lado, se realizaron experimentos de señalización celular, donde se midió el aumento de la concentración de Calcio citosólica en ambas líneas celulares al suministrarle los distintos extractos metanólicos a distintas concentraciones en un rango de pocos minutos.

En las Figuras 2, 3 y 4 se observan los cambios de fluorescencia en función del tiempo en ambas líneas celulares con cada uno de los extractos metanólicos a las distintas concentraciones analizadas. Se observa que el aumento en la fluorescencia es casi instantáneo, mientras que la disminución requiere varios minutos para que llegue a los niveles basales. Al observar que ocurre lo mismo en todas las concentraciones, se determinó cuantitativamente el cambio en la velocidad entre las concentraciones y se obtuvieron los datos mostrados en la Tabla 4, donde observamos una ligera tendencia de aumento en la

velocidad al aumentar la dosis de los extractos suministrados a las células, lo que nos indica que la velocidad es dosis dependiente, entre mayor concentración se encuentre en las células, mayor es la velocidad de aumento de fluorescencia en las células, es decir, mayor aumento en la concentración de Calcio citosólico. Al tener esta eficiencia, podemos concluir que los mecanismos de aumento de Calcio citosólico son bastante eficientes en ambas líneas celulares, estando implicados mecanismos de entrada capacitativa y mecanismos de liberación de los reservorios, es decir, proteínas implicadas en la señalización de Calcio como RyR, IP₃R, en el RE; y canales controlados por voltaje y canales controlados por receptores, en la MP. Sin embargo, se requiere eliminar el Calcio que se encuentra en el espacio extracelular, con el objetivo de determinar si el aumento de Calcio de estos experimentos proviene del espacio externo o bien es liberado desde los reservorios internos, así tendríamos mayor evidencia de qué proteínas están implicadas en este proceso, las del RE o las de la MP.

Por el contrario, en la Tabla 5 se mostraron los datos resultantes de la cuantificación de la disminución de la fluorescencia, es decir, el retorno de Calcio a su lugar de origen o subsecuente disminución de Calcio citosólico. Los datos nos muestran una disminución bastante lenta en ambas líneas celulares, sin embargo, la línea celular MCF-7 tiene tiempos más prolongados, indicando que su mecanismo de extrusión de Calcio y/o almacenamiento en reservorios internos es más lento, pues el tiempo que le toma para disminuir el Calcio es mayor, esto se podría responder bien sea por las proteínas de la MP que liberan Calcio al espacio extracelular y/o con la mala ubicación de la bomba SERCa²⁺ (Saldaña et al., 2009b), única que almacena Calcio en el retículo endoplásmico, pues dicha ubicación genera disminución en la eficiencia celular.

Para determinar si las proteínas implicadas en el proceso de retorno de Calcio a sus niveles basales se encuentran en la MP o en la membrana del RE, es necesario eliminar el Calcio extracelular y dejar actuar solamente a las proteínas internas. En la Figura 5 se observan las gráficas resultantes de dichos experimentos. La primera curva pertenece al aumento de

fluorescencia debido al suministro de *Capsicum annuum* L. a las células y se puede observar cómo es que aumenta el Calcio y disminuye de manera similar a los experimentos obtenidos con Calcio externo, lo que nos indica que el aumento citosólico de Calcio se debe a las proteínas embebidas en la membrana de los reservorios, como IP₃R y RyR para aumento de Calcio y a SERCa²⁺ para la disminución del mismo. Sin embargo, vemos una disminución lenta, lo que nos indica que, en efecto, el mal posicionamiento de SERCa²⁺ genera que el Calcio no retorne al RE de manera eficiente. Consideramos pues que esta proteína es muy importante en los resultados obtenidos y nos muestra valores fuertemente prometedores al momento de hacer la transcripción. En la tabla 6 se muestran con valores del tiempo τ_{on} y τ_{off} obtenidos de las gráficas previas donde demostramos la lentitud del almacenamiento, debido al mal posicionamiento de la proteína SERCa²⁺.

Para obtener más datos, precisamos el diseño de primers para la proteína SERCa²⁺. En la Tabla 7 mostramos las secuencias forward y reverse de los primers que se diseñaron, para poder amplificar la proteína implicada en el proceso de disminución de Calcio citosólico. En los siguientes estudios nos gustaría enfocarnos en conocer las isoformas de la bomba SERCa²⁺ de esta línea celular que se encuentran funcionales en la línea celular estudiada.

Se espera que en un futuro cercano se aumente el estudio de proteínas implicadas en la dinámica de Calcio para ayudar como terapia contra diferentes neoplasias, aumentando el número de estudios que definan la importancia de la señalización de Calcio en el ámbito oncológico.

CONCLUSIONES

Viabilidad celular. Los extractos de *Capsicum annuum* L. son citotóxicos en ambas líneas celulares tanto a las 24 como a las 48h. Sin embargo, se requiere de una concentración mayor a 1mg/mL para observar este efecto. A pesar de que existe muerte celular, los valores de K_i que exhiben ambas líneas celulares no presentan diferencia significativa. Para conocer el tipo de muerte celular que suponen estos resultados

Se cree que el tipo de muerte celular que suponen estos ejercicios es por apoptosis, sin embargo, aún faltan resultados para corroborarlo.

Dinámica de Calcio. Los tres extractos de *C. annuum* L. movilizan Calcio en las líneas celulares MCF-12F y MCF-7 de manera diferencial. Al analizar los tiempos de activación (τ_{on} y τ_{off}) se muestra que el valor de τ_{on} es bastante similar entre las tres concentraciones de los tres extractos, pero la diferencia surge al momento de analizar los valores de τ_{off} . A medida que aumenta la concentración del extracto, la velocidad de decaimiento disminuye y la velocidad de decaimiento es menor en MCF-7 que en MCF-12F. Por otro lado, los resultados obtenidos en condiciones libres de Calcio nos muestran que la línea celular MCF-7 es más lenta en el aumento de Calcio y más rápida en la disminución, en comparación con MCF-12F, debido quizá a la deficiencia de la proteína del RE llamada $SERCa^{2+}$, por lo que es importante analizar más detalladamente esta proteína.

PERSPECTIVAS

A partir de los resultados y discusiones expuestos en el presente proyecto, las perspectivas de trabajos futuros se orientan en dos direcciones. Por un lado, es importante analizar el tipo de muerte celular que causan estos compuestos en las células. Parece ser que la muerte es causada debido al proceso de apoptosis, sin embargo, se requiere hacer estudios específicos para determinar esto. Por un lado, se podría utilizar la técnica de citometría de flujo, para la detección de apoptosis o bien, analizar el aumento de la transcripción de las proteínas de apoptosis con el transcriptoma podría ser una solución alternativa.

Por el otro lado, se requiere hacer el banco de cDNA de los primers que ya fueron diseñados y con los cuales ya se cuenta en el laboratorio, con el objetivo de conocer la expresión de las proteínas implicadas en el proceso de dinámica de Calcio.

LITERATURA CITADA

- Aydar, E., Yeo, S., Djamgoz, M., & Palmer, C. (2009). Abnormal expression, localization and interaction of canonical transient receptor potential ion channels in human breast cancer cell lines and tissues: A potential target for breast cancer diagnosis and therapy. *Cancer Cell International*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-9-23>
- Azimi, I., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2014). Calcium influx pathways in breast cancer: Opportunities for pharmacological intervention. *British Journal of Pharmacology*, 171(4), 945–960. <https://doi.org/10.1111/bph.12486>
- Baumgartner, H. K., Gerasimenko, J. V., Thorne, C., Ferdek, P., Pozzan, T., Tepikin, A. V., Petersen, O. H., Sutton, R., Watson, A. J. M., & Gerasimenko, O. V. (2009). Calcium elevation in mitochondria is the main Ca²⁺ requirement for mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening. *Journal of Biological Chemistry*, 284(31), 20796–20803. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.025353>
- Benaim, G. (2004). La Ca²⁺-ATPasa de la membrana plasmatica como enzima clave en la homeostasis intracelular del calcio. Estimulacion por etanol y otros efectores. *Acta Cientifica Venezolana*, 55(3), 304–314.
- Bengtson, C. P., & Bading, H. (2012). *Nuclear Calcium Signaling*. 377–405. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8>
- 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>
- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), 11–21. <https://doi.org/10.1038/35036035>
- Bittremieux, M., Parys, J. B., Pinton, P., & Bultynck, G. (2016). ER functions of oncogenes and tumor suppressors: Modulators of intracellular Ca²⁺ signaling. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(6), 1364–1378. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.002>
- Bootman, M. D. (2012). Calcium signaling. *Calcium Signaling, Second Edition*, 1–540. <https://doi.org/10.1201/9781420038231>
- Bravo-Sagua, R., Parra, V., López-Crisosto, C., Díaz, P., Quest, A. F. G., & Lavandero, S. (2017). Calcium transport and signaling in mitochondria. *Comprehensive Physiology*, 7(2), 623–634. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160013>
- Brennan, S. C., Thiem, U., Roth, S., Aggarwal, A., Fetahu, I. S., Tennakoon, S., Gomes, A. R., Brandi, M. L., Bruggeman, F., Mentaverri, R., Riccardi, D., & Kallay, E. (2013). Calcium sensing receptor signalling in physiology and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(7), 1732–1744. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.12.011>
- Brini, M., Cali, T., Ottolini, D., & Carafoli, E. (2013). The plasma membrane calcium pump in health and disease. *FEBS Journal*, 280(21), 5385–5397. <https://doi.org/10.1111/febs.12193>
- Brini, M., & Carafoli, E. (2009). Calcium pumps in health and disease. *Physiological Reviews*, 89(4), 1341–1378. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2008>
- Bronner, F. (2001). Extracellular and intracellular regulation of calcium homeostasis. *TheScientificWorldJournal*, 1, 919–925. <https://doi.org/10.1100/tsw.2001.489>

- Cárdenas, C., Müller, M., McNeal, A., Lovy, A., Jaña, F., Bustos, G., Urrea, F., Smith, N., Molgó, J., Diehl, J. A., Ridky, T. W., & Foskett, J. K. (2016). Selective Vulnerability of Cancer Cells by Inhibition of Ca²⁺ Transfer from Endoplasmic Reticulum to Mitochondria. *Cell Reports*, *14*(10), 2313–2324. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.030>
- Catterall, W. A., Rosenberg, S. S., Spitzer, N. C., Fearnley, C. J., Roderick, H. L., Bootman, D., Catterall, W. A., Dupont, G., Combettes, L., Gary, S., Webb, S. E., Miller, A. L., Lewis, R. S., Hill-eubanks, D. C., Werner, M. E., & Heppner, T. J. (2011). *Voltage-Gated Calcium Channels*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>
- Clapham, D. E. (2007). Calcium Signaling. *Cell*, *131*(6), 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Cull-Candy, S., Brickley, S., & Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: Diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, *11*(3), 327–335. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00215-4](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00215-4)
- 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 - Bioenergetics*, *1858*(8), 615–627. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.01.003>
- Eighway, J. I. M. H., Etticher, D. A. C. B., Oban, P. A. U. L. R. H., Ltermatt, H. A. N. S. J. A., Hospital, C., Trust, N. H. S., & Road, W. (1996). *Triphosphate Receptor Gene , and a Novel Human Gene , KRAG. 214*, 207–214.
- Ekbatan, S. S., Li, X. Q., Ghorbani, M., Azadi, B., & Kubow, S. (2018). Chlorogenic acid and its microbial metabolites exert anti-proliferative effects, S-phase cell-cycle arrest and apoptosis in human colon cancer caco-2 cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(3), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms19030723>
- Elshaer, M., Chen, Y., Wang, X. J., & Tang, X. (2018). Resveratrol: An overview of its anti-cancer mechanisms. *Life Sciences*, *207*(June), 340–349. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.06.028>
- Fauzi, M., Hague, F., Potier, M., Ahidouch, A., Sevestre, H., & Ouadid-Ahidouch, H. (2011). Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, *226*(2), 542–551. <https://doi.org/10.1002/jcp.22363>
- Feng, M., Grice, D. M., Faddy, H. M., Nguyen, N., Leitch, S., Wang, Y., Muend, S., Kenny, P. A., Sukumar, S., Roberts-Thomson, S. J., Monteith, G. R., & Rao, R. (2010). Store-independent activation of orai1 by SPCA2 in mammary tumors. *Cell*, *143*(1), 84–98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.040>
- Fill, M., & Copello, J. (2002). Ryanodine receptor calcium release channels. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *740*, 159–182. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_7
- Flores-Peredo, L., Rodríguez, G., & Zaráin Herzberg, Á. (2013). *Participación de las Bombas De Calcio del Retículo Endoplásmico en el cáncer*. *32*(4), 137–144.
- Gianfredi, V., Nucci, D., Vannini, S., Villarini, M., & Moretti, M. (2017). In vitro Biological Effects of Sulforaphane (SFN), Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), and Curcumin on Breast Cancer Cells: A Systematic Review of the Literature. *Nutrition and Cancer*, *69*(7), 969–978. <https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1359322>

- Giovanucci, E., Rimm, E. B., Liu, Y., Stampfer, M. J., & Willett, W. C. (2002). A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, *94*(5), 391–398. <https://doi.org/10.1093/jnci/94.5.391>
- Gomes, D. A., Leite, M. F., Bennett, A. M., & Nathanson, M. H. (2006). Calcium signaling in the nucleus. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *84*(3–4), 325–332. <https://doi.org/10.1139/Y05-117>
- Gong, X., Smith, J. R., Swanson, H. M., & Rubin, L. P. (2018). Carotenoid lutein selectively inhibits breast cancer cell growth and potentiates the effect of chemotherapeutic agents through ROS-mediated mechanisms. *Molecules*, *23*(4), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules23040905>
- Grice, D. M., Vetter, I., Faddy, H. M., Kenny, P. A., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2010). Golgi calcium pump secretory pathway calcium ATPase 1 (SPCA1) is a key regulator of Insulin-like Growth Factor Receptor (IGF1R) processing in the basal-like breast cancer cell line MDA-MB-231. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(48), 37458–37466. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.163329>
- Guilbert, A., Gautier, M., Dhennin-Duthille, I., Haren, N., Sevestre, H., & Ouadid-Ahidouch, H. (2009). Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *297*(3), 493–502. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00624.2008>
- Gupta, S. Das, Patel, M., Wahler, J., Bak, M. J., Wall, B., Lin, Y., Shih, W. J., Cai, L., Yang, C. S., Suh, N., State, T., & Brunswick, N. (2018). *HHS Public Access*. *10*(12), 694–703. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-17-0190.Differential>
- Hanahan, D. (2014). Rethinking the war on cancer. *The Lancet*, *383*(9916), 558–563. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62226-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62226-6)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). Hallmarks of Cancer. *Cell*, *100*(4), 57–70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Haustrate, A., Prevarskaya, N., & Lehen, V. (2020). *Role of the TRPV Channels in the Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis. 1*, 1–8. <https://doi.org/10.3390/cells9020317>
- Huang, J., & Zamponi, G. W. (2017). ScienceDirect Regulation of voltage gated calcium channels by GPCRs and post-translational modification. *Current Opinion in Pharmacology*, *32*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.10.001>
- Invitrogen. (2011). Fluo Calcium Indicators. *Molecular Probes*, 1–5.
- Jeon, G., Han, J., Choi, Y., Lee, S. M., Kim, H. T., & Lee, J. (2008). Antioxidant and antiproliferative activity of pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, *37*(8), 1079–1083. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2008.37.8.1079>
- Khan, F. A., Mahmood, T., Ali, M., Saeed, A., & Maalik, A. (2014). Pharmacological importance of an ethnobotanical plant: *Capsicum annuum* L. *Natural Product Research*, *28*(16), 1267–1274. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.895723>
- Kim, J. H., Hubbard, N. E., Ziboh, V., & Erickson, K. L. (2005). Attenuation of breast tumor cell growth by conjugated linoleic acid via inhibition of 5-lipoxygenase activating protein. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1736*(3), 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.08.015>
- Kraus, D., Khoury, S., Fendyur, A., Kachalsky, S. G., & Rahamimoff, R. (n.d.). *INTRACELLULAR CALCIUM DYNAMICS - SPARKS OF INSIGHT*.

- Kushnir, A., Wajsberg, B., & Marks, A. R. (2018). Ryanodine receptor dysfunction in human disorders. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1865(11), 1687–1697. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.07.011>
- Lan, H., Hong, W., Fan, P., Qian, D., Zhu, J., & Bai, B. (2017). Quercetin Inhibits Cell Migration and Invasion in Human Osteosarcoma Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(2), 553–567. <https://doi.org/10.1159/000480528>
- Lee, W. J., Roberts-Thomson, S. J., Holman, N. A., May, F. J., Lehrbach, G. M., & Monteith, G. R. (2002). Expression of plasma membrane calcium pump isoform mRNAs in breast cancer cell lines. *Cellular Signalling*, 14(12), 1015–1022. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(02\)00049-9](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(02)00049-9)
- Lee, W. J., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2005). Plasma membrane calcium-ATPase 2 and 4 in human breast cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(3), 779–783. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.119>
- Liu, J., Chen, Y., Shuai, S., Ding, D., Li, R., & Luo, R. (2014). TRPM8 promotes aggressiveness of breast cancer cells by regulating EMT via activating AKT/GSK-3 β pathway. *Tumor Biology*, 35(9), 8969–8977. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2077-8>
- Luik, R. M., Wang, B., Prakriya, M., Wu, M. M., & Lewis, R. S. (2008). Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. *Nature*, 454(7203), 538–542. <https://doi.org/10.1038/nature07065>
- Lytton, J. (2007). Na⁺/Ca²⁺ exchangers: Three mammalian gene families control Ca²⁺ transport. *Biochemical Journal*, 406(3), 365–382. <https://doi.org/10.1042/BJ20070619>
- Mackrill, J. J. (1999). Protein-protein interactions in intracellular Ca²⁺-release channel function. *Biochemical Journal*, 337(3), 345–361. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3370345>
- Maoka, T., Mochida, K., Kozuka, M., Ito, Y., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Enjo, F., Ogata, M., Nobukuni, Y., Tokuda, H., & Nishino, H. (2001). Cancer chemopreventive activity of carotenoids in the fruits of red paprika *Capsicum annuum* L. *Cancer Letters*, 172(2), 103–109. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00635-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00635-8)
- Marchi, S., Patergnani, S., Missiroli, S., Morciano, G., Rimessi, A., Wieckowski, M. R., Giorgi, C., & Pinton, P. (2018). Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell Calcium*, 69, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.05.003>
- Marchi, S., & Pinton, P. (2014). The mitochondrial calcium uniporter complex: Molecular components, structure and physiopathological implications. *Journal of Physiology*, 592(5), 829–839. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.268235>
- McAndrew, D., Grice, D. M., Peters, A. A., Davis, F. M., Stewart, T., Rice, M., Smart, C. E., Brown, M. A., Kenny, P. A., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2011). ORAI1-mediated calcium influx in lactation and in breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(3), 448–460. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0923>
- Mcgoldrick, L. L., Singh, A. K., Saotome, K., Maria, V., Twomey, E. C., Grassucci, R. A., & Sobolevsky, A. I. (2017). Opening of the human epithelial calcium channel TRPV6. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/nature25182>
- Mekahli, D., Bultynck, G., Parys, J. B., de Smedt, H., & Missiaen, L. (2011). Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(6), 1–30. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004317>

- Micaroni, M. (2012). Calcium around the Golgi apparatus: Implications for intracellular membrane trafficking. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 740, 439–460. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_18
- Millán, C. S., Soldevilla, B., Martín, P., Gil-Calderón, B., Compte, M., Pérez-Sacristán, B., Donoso, E., Peña, C., Romero, J., Granado-Lorencio, F., Bonilla, F., & Domínguez, G. (2015). β -Cryptoxanthin synergistically enhances the antitumoral activity of oxaliplatin through Δ NP73 negative regulation in colon cancer. *Clinical Cancer Research*, 21(19), 4398–4409. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2027>
- Monteith, G. R., McAndrew, D., Faddy, H. M., & Roberts-Thomson, S. J. (2007). Calcium and cancer: Targeting Ca^{2+} transport. *Nature Reviews Cancer*, 7(7), 519–530. <https://doi.org/10.1038/nrc2171>
- Mordecai, B., & Lederer, J. (1999). Sodium / Calcium Exchange : Its Physiological Implications. *Society*, 79(3), 763–854.
- Morelli, M. B., Amantini, C., Nabissi, M., Santoni, G., Wünsch, B., Schepmann, D., Cimarelli, C., Pellei, M., Santini, C., Fontana, S., Mammoli, V., Quaglia, W., Bonifazi, A., Giannella, M., Giorgioni, G., Piergentili, A., & Del Bello, F. (2019). Role of the NMDA Receptor in the Antitumor Activity of Chiral 1,4-Dioxane Ligands in MCF-7 and SKBR3 Breast Cancer Cells. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 10(4), 511–516. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.8b00536>
- Mound, A., Vautrin-Glabik, A., Foulon, A., Botia, B., Hague, F., Parys, J. B., Ouadid-Ahidouch, H., & Rodat-Despoix, L. (2017). Downregulation of type 3 inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor decreases breast cancer cell migration through an oscillatory Ca^{2+} signal. *Oncotarget*, 8(42), 72324–72341. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20327>
- Naz, H., Tarique, M., Khan, P., Luqman, S., Ahamad, S., Islam, A., Ahmad, F., & Hassan, M. I. (2018). Evidence of vanillin binding to CAMKIV explains the anti-cancer mechanism in human hepatic carcinoma and neuroblastoma cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 438(1–2), 35–45. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3111-0>
- Oliveira, A. G., Guimarães, E. S., Andrade, L. M., Menezes, G. B., & Leite, M. F. (2014). Decoding calcium signaling across the nucleus. *Physiology*, 29(5), 361–368. <https://doi.org/10.1152/physiol.00056.2013>
- Palmer, A. E., Jin, C., Reed, J. C., & Tsien, R. Y. (2004). Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca^{2+} analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(50), 17404–17409. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408030101>
- Papp, B., & Brouland, J. P. (2011). Altered endoplasmic reticulum calcium pump expression during breast tumorigenesis. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 5(1), 163–174. <https://doi.org/10.4137/BCBCR.S7481>
- Papp, B., Brouland, J. P., Arbabian, A., Gélébart, P., Kovács, T., Bobe, R., Enouf, J., Varin-Blank, N., & Apáti, Á. (2012). Endoplasmic reticulum calcium pumps and cancer cell differentiation. *Biomolecules*, 2(1), 165–186. <https://doi.org/10.3390/biom2010165>
- Parekh, A. B., & Putney, J. W. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiological Reviews*, 85(2), 757–810. <https://doi.org/10.1152/physrev.00057.2003>
- Park, J. H., Jeon, G. I., Kim, J. M., & Park, E. (2012). Antioxidant activity and antiproliferative action of methanol extracts of 4 different colored bell peppers (*Capsicum annum* L.). *Food Science and Biotechnology*, 21(2), 543–550. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0069-2>

- Parkash, J., & Asotra, K. (2010). Calcium wave signaling in cancer cells. *Life Sciences*, 87(19–22), 587–595. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.09.013>
- Patron, M., Checchetto, V., Raffaello, A., Teardo, E., VecellioReane, D., Mantoan, M., Granatiero, V., Szabò, I., DeStefani, D., & Rizzuto, R. (2014). MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca²⁺ uniporter by exerting opposite effects on MCU activity. *Molecular Cell*, 53(5), 726–737. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.013>
- Peters, A. A., Simpson, P. T., Bassett, J. J., Lee, J. M., Da Silva, L., Reid, L. E., Song, S., Parat, M. O., Lakhani, S. R., Kenny, P. A., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2012). Calcium Channel TRPV6 as a Potential Therapeutic Target in Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(10), 2158–2168. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0965>
- Philipson, K. D., & Nicoll, D. A. (2000). *S ODIUM -C ALCIUM E XCHANGE: A Molecular Perspective*. 111–133.
- Pizzo, P., Lissandron, V., Capitanio, P., & Pozzan, T. (2011). Ca²⁺ signalling in the Golgi apparatus. *Cell Calcium*, 50(2), 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.01.006>
- Porat, A., & Elazar, Z. (2000). Regulation of intra-Golgi membrane transport by calcium. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29233–29237. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005316200>
- Pottle, J., Sun, C., Gray, L., & Li, M. (2013). Exploiting MCF-7 Cells' Calcium Dependence with Interlaced Therapy. *Journal of Cancer Therapy*, 04(07), 32–40. <https://doi.org/10.4236/jct.2013.47a006>
- Prakriya, M., & Lewis, R. S. (2015). Store-operated calcium channels. *Physiological Reviews*, 95(4), 1383–1436. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2014>
- Pratt, S. J., Hernández-Ochoa, E., & Martin, S. S. (2020). Calcium signaling: breast cancer's approach to manipulation of cellular circuitry. *Biophysical Reviews*, 12(6), 1343–1359. <https://doi.org/10.1007/s12551-020-00771-9>
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Switzerland)*, 12(9), 12347–12360. <https://doi.org/10.3390/s120912347>
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., & Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(9), 566–578. <https://doi.org/10.1038/nrm3412>
- Rizzuto, R., Duchen, M. R., & Pozzan, T. (2004). Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, 2004(215). <https://doi.org/10.1126/stke.2152004rel>
- Roderick, H. L., & Cook, S. J. (2008). Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: Remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nature Reviews Cancer*, 8(5), 361–375. <https://doi.org/10.1038/nrc2374>
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. v., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D., Velicelebi, G., & Stauderman, K. A. (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *Journal of Cell Biology*, 169(3), 435–445. <https://doi.org/10.1083/jcb.200502019>
- Saldaña, C., Díaz-Muñoz, M., Antaramián, A., González-Gallardo, A., García-Solís, P., & Morales-Tlalpan, V. (2009a). MCF-7 breast carcinoma cells express ryanodine receptor type 1:

- Functional characterization and subcellular localization. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 323(1–2), 39–47. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9962-7>
- Saldaña, C., Díaz-Muñoz, M., Antaramián, A., González-Gallardo, A., García-Solís, P., & Morales-Tlalpan, V. (2009b). MCF-7 breast carcinoma cells express ryanodine receptor type 1: Functional characterization and subcellular localization. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 323(1–2), 39–47. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9962-7>
- Santo-Domingo, J., & Demaurex, N. (2010). Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1797(6–7), 907–912. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.005>
- Santulli, G., Lewis, D., des Georges, A., Marks, A. R., & Frank, J. (2018). Ryanodine receptor structure and function in health and disease. *Subcellular Biochemistry*, 87, 329–352. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_11
- Sather, W. A., & Dittmer, P. J. (2019). ScienceDirect Regulation of voltage-gated calcium channels by the ER calcium sensor STIM1. *Current Opinion in Neurobiology*, 57, 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.01.019>
- Srinivasan, S., Guha, M., Kashina, A., & Avadhani, N. G. (2017). Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1858, Issue 8). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.01.004>
- Stewart, T. A., Yapa, K. T. D. S., & Monteith, G. R. (2015). Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1848(10), 2502–2511. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.08.016>
- Strehler, E. E., & Zacharias, D. A. (2001). Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiological Reviews*, 81(1), 21–50. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.1.21>
- Sullivan, L., & Chandel, N. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer and Metabolism*, 99–116. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-17>
- Tang, S., Wang, X., Shen, Q., Yang, X., Yu, C., Cai, C., Cai, G., Meng, X., & Zou, F. (2015). Mitochondrial Ca²⁺ uniporter is critical for store-operated Ca²⁺ entry-dependent breast cancer cell migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(1), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.092>
- Taylor, J. T., Huang, L., Pottle, J. E., Liu, K., Yang, Y., Zeng, X., Keyser, B. M., Agrawal, K. C., Hansen, J. B., & Li, M. (2008). Selective blockade of T-type Ca²⁺ channels suppresses human breast cancer cell proliferation. *Cancer Letters*, 267(1), 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.032>
- Taylor, P., Turner, R. W., Anderson, D., Zamponi, G. W., Turner, R. W., Anderson, D., & Zamponi, G. W. (2011). *Signaling complexes of voltage-gated calcium channels* Signaling complexes of voltage-gated calcium channels. *May 2015*, 37–41. <https://doi.org/10.4161/chan.5.5.16473>
- Thiel, M., Lis, A., & Penner, R. (2013). STIM2 drives Ca²⁺ oscillations through store-operated Ca²⁺ entry caused by mild store depletion. *Journal of Physiology*, 591(6), 1433–1445. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.245399>
- Trebak, M., & Putney, J. W. (2017). ORAI calcium channels. *Physiology*, 32(4), 332–342. <https://doi.org/10.1152/physiol.00011.2017>

- Uzhachenko, R., Shanker, A., Yarbrough, W. G., & Ivanova, A. V. (2015). Mitochondria, calcium, and tumor suppressor Fus1: At the crossroad of cancer, inflammation and autoimmunity. *Oncotarget*, 6(25), 20754–20772. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4537>
- Van Baelen, K., Dode, L., Vanoevelen, J., Callewaert, G., De Smedt, H., Missiaen, L., Parys, J. B., Raeymaekers, L., & Wuytack, F. (2004). The Ca²⁺/Mn²⁺ pumps in the Golgi apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1742(1–3), 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.08.018>
- Varga, K., Pászty, K., Padányi, R., Hegedus, L., Brouland, J. P., Papp, B., & Enyedi, A. (2014). Histone deacetylase inhibitor- and PMA-induced upregulation of PMCA4b enhances Ca²⁺ clearance from MCF-7 breast cancer cells. *Cell Calcium*, 55(2), 78–92. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2013.12.003>
- Wiel, C., Lallet-Daher, H., Gitenay, D., Gras, B., Le Calvé, B., Augert, A., Ferrand, M., Prevarskaya, N., Simonnet, H., Vindrieux, D., & Bernard, D. (2014). Endoplasmic reticulum calcium release through ITPR2 channels leads to mitochondrial calcium accumulation and senescence. *Nature Communications*, 5(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms4792>
- Wootton, L. L., Argent, C. C. H., Wheatley, M., & Michelangeli, F. (2004). The expression, activity and localisation of the secretory pathway Ca²⁺-ATPase (SPCA1) in different mammalian tissues. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1664(2), 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.05.009>
- Wuytack, F., Raeymaekers, L., & Missiaen, L. (2003). PMR1/SPCA Ca²⁺ pumps and the role of the Golgi apparatus as a Ca²⁺ store. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 446(2), 148–153. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1011-5>
- Yang, Z., Kirton, H. M., MacDougall, D. A., Boyle, J. P., Deuchars, J., Frater, B., Ponnambalam, S., Hardy, M. E., White, E., Calaghan, S. C., Peers, C., & Steele, D. S. (2015). The Golgi apparatus is a functionally distinct Ca²⁺ store regulated by the PKA and Epac branches of the β1-adrenergic signaling pathway. *Science Signaling*, 8(398), 1–12. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa7677>
- Yelshanskaya, M. V., Nadezhdin, K. D., Kurnikova, M. G., & Sobolevsky, A. I. (2021). Structure and function of the calcium-selective TRP channel TRPV6. *Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1113/JP279024>
- Zhang, Q., Hu, J. X., Kui, X., Liu, C., Zhou, H., Jiang, X., & Zeng, L. (2017). Sinapic acid derivatives as potential anti-inflammatory agents: Synthesis and biological evaluation. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 16(4), 1405–1414. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2017.2137>
- Ziglioli, F., Frattini, A., Maestroni, U., Dinale, F., Ciuffreda, M., & Cortellini, P. (2009). Vanilloid-mediated apoptosis in prostate cancer cells through a TRPV-1 dependent and a TRPV-1-independent mechanism. *Acta Biomedica de l'Ateneo Parmense*, 80(1), 13–20.
- Zunun-Pérez, A. Y., Guevara-Figueroa, T., Jimenez-Garcia, S. N., Feregrino-Pérez, A. A., Gautier, F., & Guevara-González, R. G. (2017). Effect of foliar application of salicylic acid, hydrogen peroxide and a xyloglucan oligosaccharide on capsiate content and gene expression associated with capsinoids synthesis in *Capsicum annuum* L. *Journal of Biosciences*, 42(2), 245–250. <https://doi.org/10.1007/s12038-017-9682-9>

APÉNDICE

A continuación, se muestra la serie metodológica que se requiere para continuar con el proyecto:

EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

Por medio del protocolo Trizol (Tomado y modificado de (Simms et al., 1993)) se aisló el ARN total. El reactivo Trizol es una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidinio. Durante la lisis celular, el reactivo mantiene la integridad del RNA. Las células se mantuvieron en cultivo y se levantaron con el Tampón Fosfato Salino (PBS), el cual contiene sales como cloruro de sodio, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio. Se les añadió dicho buffer ya que su osmolaridad y concentración de iones es muy semejante a la del líquido extracelular, manteniendo un pH estable de 7.4. Posterior al suministro de PBS las células se transfirieron a tubos y se centrifugaron para formar un pellet en el fondo del tubo. Se añadió 1mL de Trizol, se incubó por 5 min a T°amb y se suministraron 0.2mL de cloroformo (mezclando por inversión). Se incubó a T°amb por 3min. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 15min. La fase acuosa resultante se transfirió a un tubo nuevo adicionándole 0.5ml de isopropanol e incubando a T°amb por 10min. Se volvió a centrifugar a 13,000 rpm durante 10min. El sobrenadante se descartó, se secó la pastilla de ARN total y se resuspendió en 100µL de agua previamente suministrada con inhibidor de ARNasas.

CUANTIFICACIÓN DE ARN TOTAL

El ARN se cuantifica por medio de un espectrofotómetro Nanodrop 1000 y para verificar la integridad de la muestra se utiliza gel de agarosa para ARN, evitando así la formación de estructuras secundarias y permitiendo observar la calidad de la muestra.

SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO POR RT-PCR

Para realizar esta etapa del experimento se añaden oligonucleótidos dT antisentido, seleccionando a los ARNm que contienen la cola poliadenina, descartando aquellos que no la tienen. Posteriormente se añade la enzima M-MLV RT, una ARN reverso transcriptasa (Promega TM). Se realiza la síntesis de ADNc, almacenándolo a una temperatura de -70°C. Para la cuantificación absoluta de ADN se requiere una RT-PCR. Se utiliza TaqMan Universal PCR Master Mix y TaqMan assay para la realización de la PCR en tiempo real. Se suministra ADN polimerasa acoplada a un fluoróforo específico, mismo que permite la visualización de la duplicación del material genético. Se va cuantificando a la par por medio de la señal fluorescente. Los resultados que se obtengan de este paso se evaluarán por medio de la metodología de Kenneth et al 2001.

PCR CONVENCIONAL Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

La cuantificación absoluta de los genes que codifican para las proteínas sensibles a calcio se realiza por medio del ADNc previamente sintetizado. Se preparan tres reacciones usando los oligos para las proteínas sensibles a calcio. Se añade el Mix oligos y ADNc mezclando ligeramente con el vortex, se coloca de la mezcla de reacción en un capilar para separar por peso molecular las secuencias de ADN. Light Cycler para realizar la corrida y obtener los perfiles de expresión de proteínas.

SECUENCIACIÓN

Se realiza la visualización de los resultados mediante un secuenciador automático de 4 capilares ABI Prism-Avant. Para la preparación de la placa que se introdujo al secuenciador, se toma el marcador de peso molecular GeneScan 600 LIZ Size Standard v2.0 y se introduce a cada uno de los orificios de la placa, junto a Hi-Di Formamide, una formamida altamente desionizada que se utiliza para resuspender muestras antes de la inyección electrocinética en sistemas de electroforesis capilar. Al introducirlas, se le añade la muestra que se va a analizar y, posteriormente, se introduce la placa a la centrifuga de placas (2,000 rpm durante 30 seg)

para, posteriormente introducir las placas preparadas al secuenciador. Finalmente, se realizó la lectura a partir de la intensidad de señal emitida por los respectivos fluoróforos por muestra.