

Andrea Díaz Betancourt

2018



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Efecto dosis respuesta de la fracción concentrada en lectinas
(FCL) de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) en la movilización
de calcio citoplasmático en líneas celulares de mama.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta

Andrea Díaz Betancourt

Santiago de Querétaro, Qro. Octubre 2018

- Escudo y letras doradas
- Pastas duras color negro, tamaño carta



Universidad Autónoma de Querétaro
 Facultad de Ciencias Naturales
 Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana

Efecto dosis respuesta de la fracción concentrada en lectinas (FCL) de frijol Tépari (*phaseolus acutifolius*) en la movilización de calcio citoplasmático en líneas celulares de mama
TESIS

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

Presenta:
 L.C.N. Andrea Díaz Betancourt

Dirigido por:
 Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

SINODALES

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez
 Presidente

Dr. Alejandro Blanco Labra
 Secretario

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
 Vocal

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez
 Suplente

Dr. Lino Sánchez Segura
 Suplente


Dra. Juana Elizabeth Eltón Puente
 Directora de la Facultad


 Firma

 Firma

 Firma

 Firma

 Firma


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

RESUMEN

El calcio citoplasmático ($[Ca^{2+}]_i$) provoca la activación de señales intracelulares por cambios pequeños en su concentración. El incremento no controlado de éste puede activar señales de duplicación y muerte celular. Por otra parte, se ha visto que algunas lectinas presentan propiedades anticancerígenas y efectos diferenciales dependientes de la concentración. En nuestro grupo de trabajo, se ha reportado que la fracción concentrada en lectinas (FCL) provoca la muerte celular a las 4 h. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la FCL sobre líneas celulares de mama transformadas MCF-7 y no transformadas MCF-12 a través de mediciones de dinámica de calcio y viabilidad celular a corto plazo. La obtención de la FCL dio un rendimiento de 300 mg/kg de frijol Tépari. Se utilizó el fluorocromo Fluo 4AM a concentración 5 μ M para marcar el calcio citoplasmático libre en las células y medir dinámica de calcio en tiempo real por 6 min. Mediante este método se capturó 1 imagen/segundo (1 *frame/sec*) y graficó el cambio de Unidades de Fluorescencia Arbitraria (UFA's) en función del tiempo. La FCL movilizó $[Ca^{2+}]_i$ y resultó un efecto de respuesta y tiempos de activación dosis dependiente en MCF-12 desde la concentración 0.108 μ g/mL. Las MCF-7 sólo registraron movilización de $[Ca^{2+}]_i$ a 27.85 μ g/mL. Este experimento se reprodujo en condiciones cero Ca^{2+} (0 Ca^{2+}) extracelular en MCF-12 para determinar el origen del Ca^{2+} liberado durante el tratamiento; el resultado fue un retardo en la respuesta y un decremento en las UFA's, suponiendo una liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares. En el ensayo de viabilidad celular por oxido-reducción como un indicador de salud celular, se realizaron mediciones intermitentes desde los 10 min hasta 72 h, resultando en un mayor porcentaje de inhibición en MCF-12 a altas concentraciones y antes de las 24 h, mientras que MCF-7 tuvieron una inhibición más sostenida y homogénea de todas las concentraciones desde 24 h a 72 h. Los resultados sugieren que a corto plazo MCF-12 es más sensible a la FCL con respecto a MCF-7, y que los mecanismos ON (aumento de $[Ca^{2+}]_i$) homeostasis de calcio son diferentes en ambas líneas, haciendo a la línea transformada MCF-7 más resistente a largo plazo.

Palabras clave: Lectinas, frijol Tépari, calcio citoplasmático, especies reactivas de oxígeno.

Summary

Cytoplasmic calcium ($[Ca^{2+}]_i$) causes the activation of intracellular signals by small changes in its concentration. The uncontrolled increase of Ca^{2+} can activate signals of duplication and cell death. On the other hand, it has been seen that some lectins have anticancer properties and dependent differential effects on concentration. In our work group, it has been reported that a concentrated fraction Tepary bean lectin (FCL) causes cell death at 4 h. The objective of this work was to evaluate the effect of FCL on transformed MCF-7 and non-transformed MCF-12 breast cell lines through the measurement of short-term calcium dynamics and cell viability. Obtaining of FCL gave a yield of 300 mg/kg of Tepary bean. The Fluo 4AM fluorochrome at a concentration of 5 μ M was used to label the free cytoplasmic calcium of the cells and to measure calcium dynamics in real time for 6 min. By this method was captured 1 image/second (1 frame/sec) and graphed the change of Arbitrary Fluorescence Units (UFA's) versus time. The FCL mobilized $[Ca^{2+}]_i$ and resulted in a response effect and activation times dose-dependent in MCF-12 since 0.108 μ g/mL concentration. The MCF-7 only show mobilization of $[Ca^{2+}]_i$ at 27.85 μ g/mL concentration. This experiment was reproduced under conditions of extracellular zero Ca^{2+} (0 Ca^{2+}) in MCF-12 to determine the origin of Ca^{2+} released during the treatment; the result was a delayed response and a decrease in UFAs, assuming a Ca^{2+} release from intracellular reservoirs. In cell viability assay by oxidation-reduction as an indicator of cellular health, intermittent measurements were made from 10 min to 72 h, resulting in a higher percentage of inhibition in MCF-12 at high concentrations and before 24 h, whereas MCF-7 had a more sustained and homogeneous inhibition in all concentrations from 24 h to 72 h. The results suggest that in short term, MCF-12 is more sensitive to FCL respect to MCF-7, and that ON mechanisms (increase $[Ca^{2+}]_i$) and calcium homeostasis are different in both lines, making the transformed line MCF-7 more resistant to long term.

Key words: Lectins, Tepary bean, cytoplasmic calcium, reactive oxygen species

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico principalmente a mis padres, quienes nunca me sueltan de la mano para ayudarme a alcanzar mis metas. A mi hermana, quien me brindó su apoyo desde el día uno como mi única familia en Querétaro. A Franck, que sin saberlo, comenzó y terminó a mi lado este trayecto apoyándome en todos los aspectos. A mis hermanos, quienes estuvieron siempre pendientes desde lejos. A mis amigos de la maestría, que sin ellos, esta experiencia no hubiera sido la misma.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Carlos Saldaña (FCN-UAQ) por su comprensión, paciencia, amistad y gran apoyo en este proyecto.

A la Dra. Verónica Morales Tlalpan (FCN-UAQ) por su enseñanza y gran ayuda desinteresada en los experimentos de laboratorio.

A mi co-director, el Dr. Alejandro Blanco (CINVESTAV, IRA.) por su paciencia, interés, alientos, buena actitud y fé en este proyecto.

A la Dra. Teresa García (FCN-UAQ) por su dirección y orientación. También por apoyarme en ciertas decisiones, que me llevaron a este proyecto.

Al Dr. Roberto Ferriz (FCN-UAQ) por brindarme siempre su apoyo en cualquier momento que lo necesité y por su amistad desde el principio.

Al Dr. Lino Sánchez (CINVESTAV, IRA.), por enriquecer y complementar con sus conocimientos este proyecto y siempre estar al pendiente de su desarrollo.

Al Laboratorio de Biología Molecular de la FCN-UAQ

Al Laboratorio de Mecanismos de plantas de CINVESTAV Irapuato

A la Unidad de Proteogenómica de la UNAM

M. en C. Adriana García Gallardo

Dra. Anaid Antaramian Salas

Al Laboratorio de Biofísica de membranas de CA-UAQ

Al Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada (LAVIS-UAQ y LAVIS -UNAM)

Ing. Luis Alberto Aguilar Bautista

M. en C. Alejandro de León Cuevas

Lic. Carlos Sair Flores Bautista

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero en estos dos años de posgrado. No. becario: 781144

ÍNDICE

Resumen.....	i
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Índice.....	vi
Índice de tablas	viii
Índice de Figuras	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. Lectinas de frijol Tépari	3
2.2. Citotoxicidad de las lectinas de frijol Tépari	7
2.3. Mecanismo de acción a nivel molecular de las Lectinas	8
2.4. Apoptosis.....	8
2.5. Calcio (Ca ²⁺) como segundo mensajero en la activación de procesos celulares.....	9
2.6 Dinámica de Ca ²⁺ en vías de señalización.....	11
2.6.1 Aspectos espaciales de la señalización del Ca ²⁺	12
2.6.2 Aspectos temporales de la señalización del Ca ²⁺	12
2.6.3 Ondas de Ca ²⁺	13
2.7 Mecanismo de homeostasis de Ca ²⁺	13
2.7.1. Mecanismos ON	14
2.7.2. Mecanismos OFF	15
2.8 Calcio y apoptosis.....	15
2.9 Regulación del calcio mitocondrial y de retículo endoplásmico en la muerte celular.....	16
2.10. Membranas celulares.....	19
2.11 Características de células de cáncer de mama MCF-7 y de células no transformadas MCF-12.	20
IV. JUSTIFICACIÓN	22
V. HIPÓTESIS.....	23
VI. OBJETIVOS.....	23
6.1. Objetivo general.....	23
6.2. Objetivos específicos.....	23
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	24
7.1. Material vegetal	24
7.2. Fracción concentrada de Lectina de Frijol Tépari (FCL)	24
7.3. Cultivo de celular	25

7.4. Movilización intracelular de Ca^{2+}	26
7.5 Viabilidad celular por AlamarBlue®	27
7.6 Morfología celular	29
7.7. Análisis estadístico	29
VIII. RESULTADOS	30
8.1 Determinación de proteína por Bradford	30
8.2 Pruebas de aglutinación celular con eritrocitos	30
8.3 Movilización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$	30
8.3.1 MCF12 Transitorios de Calcio citoplasmático	30
8.3.2 MCF-7 Transitorios de Calcio citoplasmático	35
8.4 Viabilidad celular	37
8.4.1 Cambio visual de color	38
8.4.2 Medición cuantitativa – cambio de la intensidad de fluorescencia	41
8.4.3 Medición cualitativa - Morfología celular	47
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES	58
LITERATURA CITADA	59
ANEXOS: Figuras suplementarias	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de población: Células MFC-7. ATCC®.....	20
Tabla 2. Descripción de población: Células MFC-12. ATCC®.....	21
Tabla 3. (A) Fluorescencia al pico máximo, (B) mecanismo ON y tiempo medio de activación (τ ON) de la respuesta de calcio intracelular ante el tratamiento con la FCL en células MCF12.	32
Tabla 4. (A) Fluorescencia al pico máximo, (B) mecanismo ON y tiempo medio de activación (τ ON) de la respuesta de calcio intracelular ante el tratamiento con la FCL en células MCF7.....	37
Tabla 5. Evolución de la transformación del compuesto activo resaruzina a resorufina con respecto al tiempo y tratamientos de la FCL.....	38
Tabla 6. Estado óxido-reducido por cambio de color de las células MCF-7 y MCF-12 a diferentes tiempos y concentraciones.....	40
Tabla 7. Morfología de células cancerosas de mama MCF7: su porcentaje de circularidad y porcentaje de viabilidad celular con respecto al control negativo.....	48
Tabla 8. Morfología de células no transformadas de mama MCF12: su porcentaje de circularidad y porcentaje de viabilidad celular con respecto al control negativo.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de las estructuras tridimensionales de las lectinas vegetales.....	5
Figura 2. Localización de la zona expuesta en el modelaje del monómero de la lectina de frijol Tépari. La estructura general está en azul pálido y el péptido seleccionado o bucles se muestra en azul oscuro (flecha roja).....	6
Figura 3. IC ₅₀ para células de cáncer humano tratadas con la FCL. Recuperada de García T. y col., 2012.	7
Figura 4. Mecanismos de CICR que amplifican las señales de calcio. Recuperada y modificada de Roderick, 2003.....	11
Figura 5. Análisis de inmunifluorescencia de compartimentos mitocondriales (verde) y Retículo Endoplásmico (rojo) en fibroblastos humanos. Los puntos de contacto entre los dos organelos se indican con círculos azules. MAM's:Membranas Mitocondriales Asociadas. Recuperada de Marchi y col., 2018.	17
Figura 6. Mecanismos moleculares de muerte celular relacionados al aumento de [Ca ²⁺] _i . Esquema realizado para este proyecto de tesis a partir de Marchi S. y col., 2017 (Díaz-Betancourt A., 2018)	19
Figura 7. Principio básico de la oxidación de resaruzina a resofurina.....	28
Figura 8. Metodología para la cuantificación de fluorescencia de los cultivos de MCF7 y MCF12 ante tratamiento con la FCL	29
Figura 9. Ensayo de aglutinación de eritrocitos. (A) Pozo de control negativo; (B) Pozo 1 con la mayor aglutinación; (C) Pozo 9, último pozo con aglutinación	30
Figura 10. Determinación de transitorios de calcio inducidos por diferentes concentraciones de FCL en Células MCF-12. Las células fueron cargadas con el indicador Fluo 4- AM.....	31
Figura 11. Cambio de la respuesta al pico máximo de fluorescencia con respecto al Log de las concentraciones probadas con FCL	33
Figura 12. Cambio de la fluorescencia con respecto al tiempo en condiciones de calcio extracelular y cero calcio extracelular con las concentraciones de 1.74 y 27.85 µg/mL en células MCF12.....	34
Figura 13. Comparación de la τ ON en condiciones de cero calcio extracelular y con la concentración de 2 mM de calcio extracelular.....	35
Figura 14. Determinación de transitorios de calcio inducidos por diferentes concentraciones de FCL en Células MCF-7. Las células fueron cargadas con el indicador Fluo 4- AM.....	36
Figura 15. Distribución de los tratamientos y controles para el ensayo de viabilidad celular.....	38
Figura 16. Porcentaje de proliferación celular a los 10 minutos de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL.	41
Figura 17. Porcentaje de proliferación celular a la hora de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL.....	42
Figura 18. Porcentaje de proliferación celular a las 6 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL.....	43
Figura 19. Porcentaje de proliferación celular a las 12 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL.....	44

Figura 20. Porcentaje de proliferación celular a las 12 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL.....	45
Figura 21. Porcentaje de proliferación celular a las 48 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL.....	46
Figura 22. Porcentaje de proliferación celular a las 72 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL.....	47

I. INTRODUCCIÓN

Las lectinas son una clase de proteínas termolábiles de origen no-inmune, de unión a hidratos de carbono específicos de manera reversible y son también aglutinadoras celulares (Sharon, N., 2008). Estas proteínas tienen la capacidad de interactuar con células de respuesta inmune, lo que les confiere efectos inmunosupresores. También pueden ser tóxicas ya que inhiben el crecimiento de células tumorales y participan en la adhesión celular, teniendo en común todas estas actividades biológicas un receptor oligosacárido (Castillo-Villanueva A. y Abdullaev F., 2005).

La lectina de frijol Tépari está en la clasificación de las aisladas de leguminosas. Son la familia más estudiada de lectinas vegetales las cuales se encuentran constituidas por dos o cuatro subunidades idénticas de 25 a 30 kDa, cada una de las sub-unidades contiene un sitio de unión para iones metálicos Ca^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} (Cruz, P. y col., 2005). En diferentes estudios utilizando la fracción concentrada de lectinas (FCL) se presentaron efectos citotóxicos específicos y diferenciales en células de cáncer humano (García-Gasca. y col., 2012; Ferriz-Martínez, 2014). Se han observado efectos proapoptóticos en la línea celular de cáncer de colon HT-29 (Ángeles Zaragoza., 2010; Ferriz-Martínez y col., 2015, Moreno U., 2018) y efectos diferenciales en la inhibición de la proliferación y mayor sensibilidad a células de cáncer de colon CaCo-2 con respecto a las células de colon no transformadas IEC-18 (López J., 2007). Es por eso el interés de trabajar con la lectina de frijol Tépari, que al ser un compuesto con actividad citotóxica y selectiva posee potencial para convertirse en una herramienta quimioterapéutica.

El Ca^{2+} además de ser un segundo mensajero, es un elemento con carga y un efector bioquímico. Su naturaleza lo hace uno de los factores más versátiles para lograr una gran variedad de diferentes eventos celulares, desde la regulación metabólica hasta el control del ciclo celular y diferenciación (Berridge M. y col., 2003). Diversos estudios han encontrado que muchos agentes citotóxicos son causantes de la entrada letal de Ca^{2+} a la célula, así como también la sobreestimulación de receptores (Orrenius S. y col., 2015). Un gran número de estímulos influyen en el incremento de la concentración del Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE); Por lo tanto, las

células están constantemente trabajando para mantener el correcto gradiente de concentración.

Tomando en cuenta lo anterior, resulta necesario medir los efectos biológicos que tiene la FCL a través de la dinámica de calcio como indicador temprano de procesos proapoptóticos en los primeros minutos del tratamiento con la FCL, antes de la activación de la muerte celular. Así como también medir el efecto de inhibición de la proliferación celular como un efecto diferencial entre células transformadas y no transformadas.

II. ANTECEDENTES

2.1. Lectinas de frijol Tépari

Las lectinas son una clase de proteínas termolábiles de origen no-inmune, de unión a hidratos de carbono específicos (reversible), y son también aglutinadoras celulares (Sharon, N., 2008). Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido identificadas en diversos organismos como virus, bacterias, hongos, plantas, así como en vertebrados superiores (Cruz, P. y col, 2005). Su estudio fue iniciado por Stillmark en 1888 al descubrir el fenómeno de hemaglutinación con extracto de semillas de castor (*Ricinus communis*), llamándole ricina a la proteína responsable de la aglutinación de los eritrocitos; sin embargo, hasta el año 1954 fue cuando se introdujo el término lectina por Boyd (Boyd W., 1954). Estas proteínas tienen la capacidad de interactuar con células de respuesta inmune, lo que les confiere efectos inmunosupresores. También pueden ser tóxicas ya que inhiben el crecimiento de células tumorales y participan en la adhesión celular, teniendo en común todas estas actividades biológicas un receptor oligosacárido (Castillo-Villanueva A. y Abdullaev F., 2005).

Las lectinas pueden formar parte de conjugados como lectina-lectina, lectina-enzimas y lectina-anticuerpos, permitiendo el desarrollo de técnicas analíticas como la cromatografía de afinidad para la purificación de glicoproteínas (Ferriz-Martínez, 2014). Se ha demostrado que las lectinas son capaces de reconocer hidratos de carbono en una determinada configuración o secuencia de hidratos de carbono, es decir, que las características de especificidad por estructuras sacarídicas también está altamente conservada entre proteínas de una misma especie (Castillo-Villanueva A. y Abdullaev F., 2005).

Las lectinas vegetales pueden tener diversas funciones: participan en las interacciones entre las bacterias fijadoras de nitrógeno en la raíz de plantas de leguminosas, poseen actividad mitogénica, pueden tener efectos protectores en contra de la acción patogénica de ciertos microorganismos como es el caso de los nematodos herbívoros. Por otro lado, en especies animales, se ha reportado que las lectinas participan en fenómenos tales como el reconocimiento y la eliminación de glicoproteínas del sistema circulatorio, así como de células

envejecidas, células tumorales y microorganismos, mediante un proceso de opsonización y la participación de células con actividad fagocítica. También se ha visto y documentado que participan en procesos de reconocimiento que permiten la diferenciación celular, la organogénesis, la migración de linfocitos y como factores determinantes en la metástasis. (Merrit E. y col., 1994; Sharon N., 1984; Barondes S., 1981; Gallily R. y col., 1984)

Estructuralmente existen características comunes entre las lectinas de una familia determinada, lo que ha permitido el estudio de la interacción lectina-carbohidrato. Las lectinas vegetales pueden clasificarse por su especificidad hacia el monosacárido que inhibe su actividad hemaglutinante y hacia las estructuras oligosacáridas que reconocen, clasificándolas en aquellas que reconocen N-glicanos (oligosacáridos unidos a un residuo de asparagina en las proteínas mediante una N-acetil-glucosamina) y aquellas que reconocen O-glicanos (oligosacáridos unidos a un residuo de serina o treonina en las proteínas mediante una N-acetil-galactosamina). Sin embargo, actualmente y debido a la gran cantidad de datos cristalográficos de lectinas vegetales se ha propuesto una nueva clasificación de lectinas vegetales con base a su estructura molecular: (Mákela O., 1957) y que se mencionan a continuación:

1. Lectinas aisladas de leguminosas: Es la familia más estudiada de lectinas vegetales las cuales se encuentran constituidas por dos o cuatro subunidades idénticas de 25 a 30 kDa, cada una de las sub-unidades contiene un sitio de unión para iones metálicos Ca^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} (Figura 1-1). Una subunidad contiene aproximadamente 250 aminoácidos con una gran homología entre subunidad, construida por 12 hojas β antiparalelas conectadas entre sí mediante bucles, cuatro bucles localizados en la parte superior del monómero forman el sitio de reconocimiento a carbohidrato (Mákela O., 1957).
2. Lectinas con dominios tipo heveína o específicas a quitina: Esta familia presenta dos subunidades idénticas, ricas en cisteínas contrariamente a las lectinas de leguminosas (Figura 1-2) (Mákela O., 1957).
3. Lectinas aisladas de monocotiledóneas específicas a manosa: A este grupo de lectinas pertenecen las de orquídeas, ajo y amarilis, con

secuencias de aminoácidos altamente conservadas. Son tetrámeros (Figura 1-3) (Mákela O., 1957).

4. Lectinas en forma de prisma β o del tipo jacalina: En este grupo se encuentran lectinas vegetales que presentan estructuras tridimensionales muy similares a la de *Artocarpus integrifolia* (jacalina) (Figura 1-4) (Mákela O., 1957).

5. Lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas: Estas proteínas forman parte de los venenos más tóxicos (Figura 1-5) (Mákela O., 1957).

6. Lectinas tipo amaranto: En este grupo encontramos lectinas provenientes de distintas especies de amaranto, entre las que destacan *Amaranthus caudatus* y *Amaranthus leucocarpus* (Figura 1-6) (Mákela O., 1957).

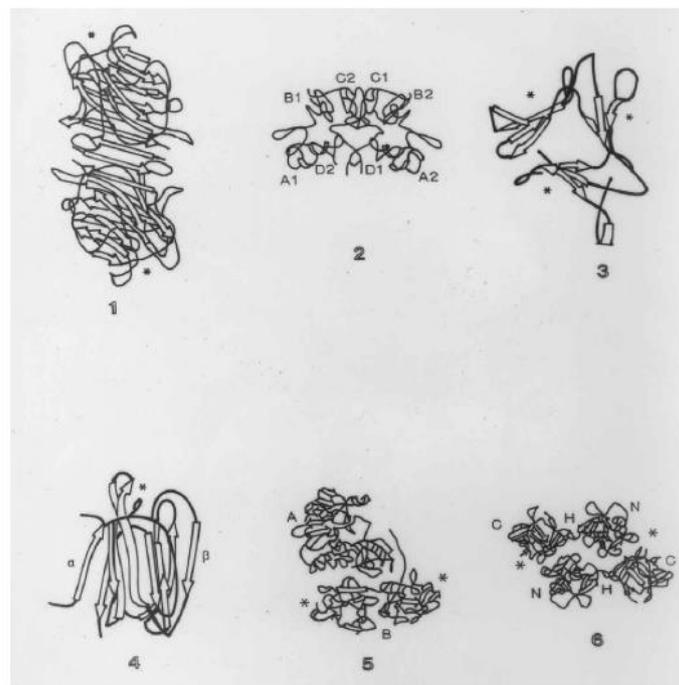


Figura 1. Representación esquemática de las estructuras tridimensionales de las lectinas vegetales. Lectinas aisladas de leguminosas (1), lectinas con dominio tipo heveina, en donde cada uno de los dominios son representados con letras de la A-D, mismos que tienen un sitio de reconocimiento a carbohidrato (2), lectinas aisladas de monocotiledóneas, específicas de manosa (3), lectinas con estructura tipo prisma β (4), lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas(5), lectinas tipo Amaranto (6). Sitio de unión al carbohidrato (*). (Cruz, P. y col., 2005) Modificado de Rudiger H. y Rouge P., 1998).

Las lectinas se han utilizado para estudiar cambios estructurales en los glicoconjugados presentes en las superficies de las células. También, para la detección de transformaciones malignas en células transformadas, un ejemplo de ello son las anomalías en las glicosilaciones en el cáncer de colon relacionadas al potencial invasivo y pronóstico (Torres I., 2010).

Debido a esto, existe un gran interés por seguir estudiando las propiedades de estas lectinas, siendo las lectinas de frijol Tépari las de nuestro interés y que han sido estudiados en nuestro equipo de trabajo. El nombre científico del frijol Tépari es *Phaseolus acutifolius*, pertenece a la familia Fabaceae, y crece de forma silvestre en algunas regiones áridas y semiáridas del suroeste de Estados Unidos, desde la parte central del estado de Arizona, EU hasta el sur de Nicaragua (Debouk D., 1994).

A lo largo del tiempo, desde los años 80's, diferentes grupos de investigación han intentado purificar y caracterizar las lectinas de frijol Tépari basándose en diferentes métodos cromatográficos. Específicamente en nuestro laboratorio se ha obtenido una fracción concentrada en lectinas (FCL) por medio de cromatografía de exclusión molecular, la cual se sabe que es un terámero con cuatro subunidades de aproximadamente 30 kDa y un sitio de reconocimiento a carbohidratos (Figura 2) (García-Gasca, 2002; López M., 2007).

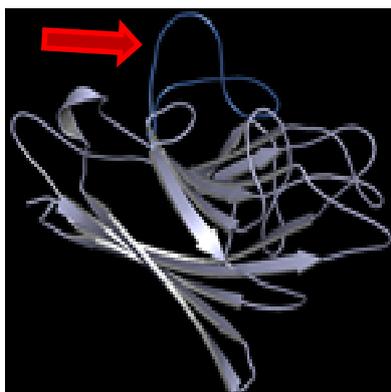


Figura 2. Localización de la zona expuesta en el modelaje del monómero de la lectina de frijol Tépari. La estructura general está en azul pálido y el péptido seleccionado o bucles se muestra en azul oscuro (flecha roja).

2.2. Citotoxicidad de las lectinas de frijol Tépari

Las lectinas de leguminosas son capaces de sobrevivir a al paso a través del tracto gastrointestinal, presentando una alta resistencia a la digestión por las enzimas proteolíticas y una unión efectiva con los receptores de superficie de las células epiteliales del intestino, interfiriendo con la absorción de nutrientes (Lajolo F. y Genovese M., 2002)

En diferentes estudios *in vitro* con la FCL de frijol tépari han presentado un efecto citotóxico específico en células de cáncer humano. Ha mostrado actividad citotóxica diferencial sobre diferentes líneas celulares, siendo las de cáncer de colon las más sensibles al tratamiento. Específicamente las células CaCo2 que tuvieron la más baja concentración letal 50, concentración a la que el 50% de la población celular muere (CL₅₀), y la más baja concentración inhibitoria 50, concentración a la cual se inhibe el 50% de la población (CI₅₀) (Figura 3). Siguiéndole las células ZR-74 y MCF-7. (García-Gasca. y cols., 2012; Ferriz-Martínez, 2014).

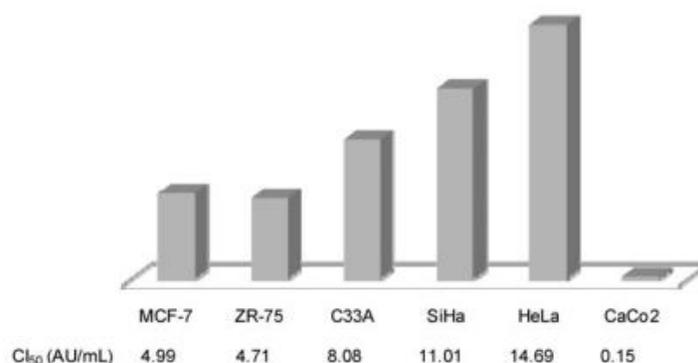


Figura 3. IC₅₀ para células de cáncer humano tratadas con la FCL. Recuperada de García T. y col., 2012.

En otro estudio se observó un efecto diferencial entre células CaCo-2 y células de íleon no transformadas IEC-18 (López F., 2007). Valdéz Vega y colaboradores reportaron un efecto inhibitorio sobre la proliferación de células cancerosas SW-480 hasta las 48 horas ante el tratamiento con lectinas de frijol Tépari (Valadez-Vega y col., 2007). Ese mismo año, Hernández Rivera y colaboradores mostraron que la FCL de la lectina de frijol Tépari es capaz de inhibir el crecimiento de células de ratón transformadas 3T3v-mos en función de

la concentración y de forma diferencial con respecto a su contraparte no transformada (Hernández-Rivera y col., 2007).

2.3. Mecanismo de acción a nivel molecular de las Lectinas

Diversos estudios han descrito muchos posibles mecanismos de acción de la lectinas, algunos de ellos se describen a continuación: 1) Unión de las lectinas a moléculas de adhesión de la superficie (epCAM) participando en la señalización transduccional de la regulación celular; 2) Mediciones de marcadores de muerte celular como sobreexpresión de caspasa 3, 8 y 9, porcentaje de células en fase celular G0-G1, anexina V, activación de Bax e inhibición de Bcl-2, entre otros. (Ferriz-Martínez y col., 2015; Moreno, U., 2017; Deepa, M. y col., 2012) Internalización de la lectina e inactivación ribosomal (Fu, L., 2011).

Si bien se han descrito una variedad de posibles mecanismos como los antes mencionados, aún es incierto el mecanismo específico mediante el cual las lectinas actúan a nivel molecular y metabólico, este último en el caso de estudios en animales de experimentación.

2.4. Apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular programado, mediado por un grupo de proteínas especializadas denominadas caspasas (Thornbery N. y Lazebnik Y., 1998). Kerr, Wyllie y Currie identificaron la morfología de este tipo de muerte en los años setenta (Kerr J. y col., 1972). Posteriormente, se demostró que la apoptosis era una muerte programada controlada por genes gracias a estudios realizados en *Caenorhabditis elegans* (Ellis H. y Horvitz H., 1986). Se identificaron genes específicos en nematodos que tienen sus homólogos en mamíferos, entre los más relevantes se encontró el gen CED-3 que representa la familia de las caspasas que juega un papel crucial como iniciadores y ejecutores de la muerte celular. También el gen CED-9 que en mamíferos representa la familia de genes BCL-2, los cuales tienen un rol en el control de la apoptosis; otro gen es el CED-4, el cual es homólogo en mamíferos con Apaf-1, componente del complejo apoptosoma que conduce a la activación de las caspasas en muchos contextos (Ashkenazi, A. y Salvesen, G., 2014).

La apoptosis es un mecanismo interno latente inherente a la mayoría de las células nucleadas, está activada por defecto, cuando una célula está privada de factores de supervivencia. Por otro lado, la apoptosis puede ser provocada también por señales de estrés celular severo o en respuesta a señales extracelulares por ligandos específicos de muerte celular (Ashkenazi, A. y Salvesen, G., 2014).

Ángeles Zaragoza en el 2010 observó una disminución de la proliferación dependiente de la concentración y una sobreexpresión de caspasa 3 en la línea celular de cáncer de colon HT-29, descartando efectos necróticos por los bajos niveles de lactato deshidrogenasa (Ángeles-Zaragoza, 2010). En otro estudio realizado por Ferriz en el 2015 utilizando la misma línea celular observó efectos proapoptóticos con la FCL en la línea celular de cáncer de colon HT-29. Las caspasas 3 y 9 se encontraron sobreexpresadas, mientras que la caspasa 8 disminuida y la expresión de Bid sin cambios (Ferriz-Martínez y col., 2015). Moreno en el 2018 midió marcadores de muerte celular igualmente en la línea HT-29 tratada con FCL y observó una sobreexpresión de caspasa 3, 8 y 9, muerte celular por anexina V, activación de Bax e inhibición de Bcl-2 (Moreno U., 2018).

Esto sugiere que la FCL pudiera inducir la apoptosis por la activación de la vía intrínseca y/o extrínseca, sin saber aún, los mecanismos moleculares específicos que provocan esta activación desde etapas tempranas antes de la transducción de las señales.

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

Históricamente, el papel del ion Calcio (Ca^{2+}) como un marcador de la muerte celular se remonta a la observación de Fleckenstein de que la entrada de Ca^{2+} en exceso a los cardiomiocitos conlleva a la patología cardíaca después de la isquemia (Fleckenstein A. y col., 1974). Subsecuentes estudios enfatizaron la importancia general de este hallazgo, ya que tanto la sobre estimulación de receptores como muchos agentes citotóxicos fueron encontrados como

causantes de la entrada letal de Ca^{2+} dentro de la célula. (Orrenius S. y col., 2003).

Un gran número de estímulos influyen en el incremento de la concentración del Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y la liberación de Ca^{2+} del Retículo Endoplásmico (RE); Por lo tanto, las células están constantemente trabajando para mantener el correcto gradiente de concentración. En condiciones fisiológicas, los estímulos generalmente promueven el incremento en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de forma lenta y transitoria, bajo condiciones patológicas, variaciones en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por estos estímulos son más pronunciados y sostenidos. En particular, durante la muerte celular programada, especialmente la apoptosis, el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es incrementado de forma dramática. Como consecuencia de ello, la mitocondria introduce grandes cantidades de Ca^{2+} , dando pie a la inducción de la apoptosis (Harr M. y col., 2009).

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

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

El incremento del calcio intracelular se puede dar a través del paso de este ion por la membrana plasmática o liberado de reservorios intracelulares, usualmente

del RE, el cual, se encuentra distribuido ubicuamente en toda la célula. La liberación de calcio del RE es activada por una variedad de segundos mensajeros como el inositol 1,4,5-trifosfato (InsP_3) o el mismo calcio. Este último mecanismo de liberación es conocido como Liberación de Calcio Inducida por Calcio (CICR) (Figura 4), el cual provoca una amplificación de eventos de iniciación en la propagación de señales de calcio. Los receptores para InsP_3 y Rianodina (RY) son los principales canales de liberación de calcio en la CICR. por lo que InsP_3 y RY controlan la sensibilidad y la activación de sus receptores al calcio. Estos receptores son macromoléculas que contienen proteínas como cinasas y fosfolipasas, que sirven para regular la sensibilidad de estos canales al calcio (Roderick H. y col., 2003).

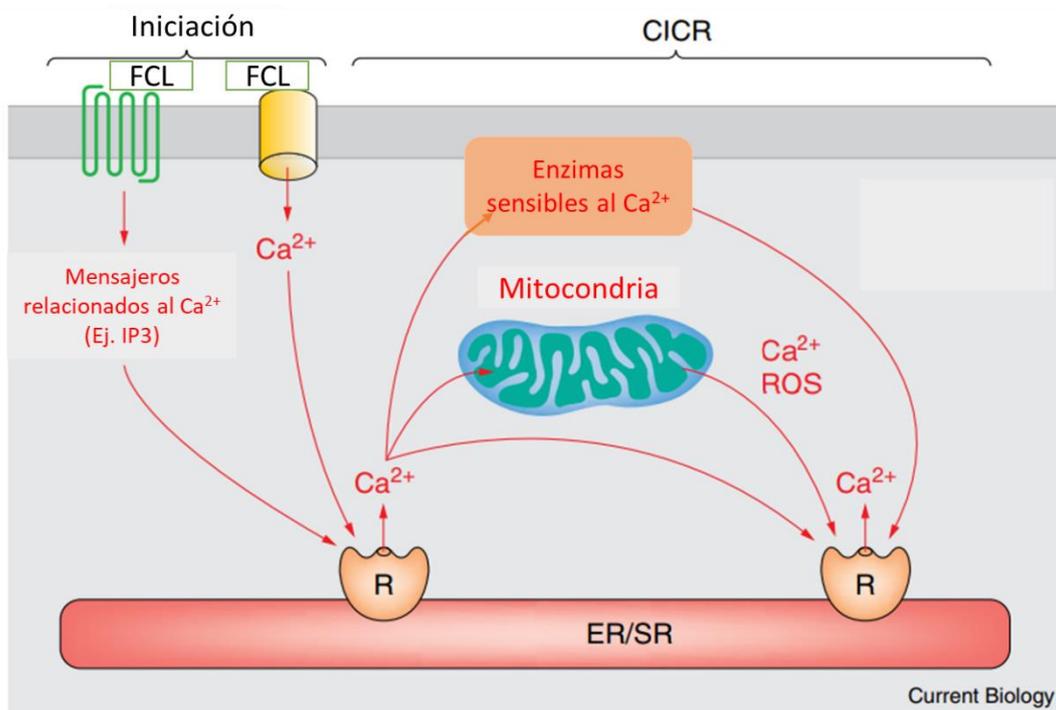


Figura 4. Mecanismos de CICR que amplifican las señales de calcio. Recuperada y modificada de Roderick, 2003.

2.6 Dinámica de Ca^{2+} en vías de señalización

La naturaleza de un conjunto de herramientas de señalización del Ca^{2+} puede crear muchos sistemas diferentes de señalización. Los patrones de expresión de los diferentes componentes de señalización pueden estar regulados por el propio Ca^{2+} y establecer un “sistema sensor” para asegurar que estos sistemas de señalización permanezcan constantes. Alteraciones en este mecanismo

homeostático dependiente de Ca^{2+} podría ser la causa de muchas enfermedades prominentes (Berridge M. y col., 2003)

Cada tipo de célula expresa un conjunto de herramientas de señalización de Ca^{2+} para crear su propio sistema de señalización con diferentes propiedades espaciales y temporales. Casi todos los sistemas de señalización de Ca^{2+} tienen una cosa en común: funcionan generando pulsos breves de Ca^{2+} . Estos transitorios de Ca^{2+} son creados por variaciones de aumento y disminución de calcio citoplasmático (conocidos como mecanismos ON y OFF respectivamente).

Además del antes mencionado conjunto de herramientas de señalización de Ca^{2+} , otro factor que contribuye a la versatilidad de la señalización del Ca^{2+} es su alto grado de diversidad espacial y temporal (Berridge M. y col., 2000). Las propiedades espaciales son relevantes para respuestas rápidas cuando componentes del mecanismo ON y sus efectores cascada abajo están estrechamente asociados. Es menos evidente para las respuestas lentas como la transcripción de genes y la proliferación celular, cuando las señales de Ca^{2+} usualmente se presentan en formas repetitivas de transitorio y ondas de Ca^{2+} (Berridge M. y col., 2003).

2.6.1 Aspectos espaciales de la señalización del Ca^{2+}

Muchos componentes de la señalización de Ca^{2+} están organizados en complejos macromoleculares, en donde las funciones de señalización de Ca^{2+} están en ambientes altamente localizados. Estos complejos pueden funcionar como unidades autónomas o módulos, que se pueden multiplicar, mezclar o combinar para crear sistemas de señalización más grandes y diversos (Berridge M. y col., 2003).

2.6.2 Aspectos temporales de la señalización del Ca^{2+}

Casi todos los procesos sensibles al Ca^{2+} están programados para responder a los transitorios de Ca^{2+} que son generados por los mecanismos ON y OFF. Por ejemplo, en la transmisión sináptica o contracción cardíaca, el sistema efector responde a pulsos dentro de los microsegundos a milisegundos. En órdenes de segundos a minutos las señales resultantes generalmente se extienden como una onda de Ca^{2+} para alcanzar otros objetivos celulares (Berridge M. y col.,

2003). Durante la estimulación prolongada, estos transitorios de Ca^{2+} se repiten para establecer oscilaciones regulares de Ca^{2+} que están implicadas en el control de muchos procesos diferentes, como la activación de oocitos en la fertilización (Ozil J. y Swann K., 1995), crecimiento axonal de neuronas corticoides (Tang F. y col., 2003), migración celular neuronal (Komuro H. y Rakic P., 1996), desarrollo muscular (Ferrari M. y col., 1998), liberación de citoquinas de células renales epiteliales (Uhlén P. y col., 2000), entre otras.

Las células responden a dichas oscilaciones usando mecanismos altamente sofisticados, incluida la habilidad de interpretar cambios en la frecuencia. Dicha señalización de Ca^{2+} frecuencia-modulada ocurre en muchas células, regulando respuestas específicas como exocitosis (Tse A., y col, 1993), estado redox mitocondrial (Hajnóczky, G. y col, 1995) y transcripción genética diferencial (Dolmetsch R. y col, 1998; Buonanno, A. y Fields, R., 1999)

2.6.3 Ondas de Ca^{2+}

Las señales de Ca^{2+} que dan lugar a las oscilaciones, a menudo se propaga a través del citoplasma como una onda regenerativa (Berridge M. y col., 2000), y depende de rondas sucesivas de liberación y difusión de Ca^{2+} desde los *clusters* de receptores a Inositol (1,4,5) P_3 (Ins P_3R) o receptores a Ryanodina (RYR). En el caso de Ins P_3R , elevan el número de señales locales que se conocen como Ca^{2+} “*puffs*”, mientras que RYR genera Ca^{2+} “*sparks*”. Estas señales de Ca^{2+} elementales producen una modesta elevación de la concentración de Ca^{2+} citosólico (~50-600 nM) con una dispersión espacial limitada (~2-6 μm), provocando la apertura transitoria de los canales (duración de <1 seg) (Niggli E., 1999; Thomas D. y col, 2000). El Ca^{2+} que es liberado por estos canales puede difundir a un sitio vecino y activarlo. Este mecanismo de propagación saltatoria permite la señal local inicial que desencadena ondas y oscilaciones globales de Ca^{2+} (Berridge M. y col., 2000).

2.7 Mecanismo de homeostasis de Ca^{2+}

En todo momento, los niveles de Ca^{2+} intracelular son determinados por un balance entre los mecanismos ON que introducen Ca^{2+} en el citoplasma y los mecanismos OFF a través de los cuales esta señal se da por la acción combinada de buffers, bombas e intercambiadores (Berridge M. y col., 2003).

2.7.1. Mecanismos ON

Los mecanismos ON dependen de canales de Ca^{2+} que controlan la entrada de Ca^{2+} exterior o del Ca^{2+} liberado de reservorios intracelulares. En el caso del medio extracelular, existen muchos canales de membrana plasmática diferentes estímulos que son definidos por la forma en que se activan y que controlan la entrada de calcio desde el medio exterior, que incluyen la despolarización de membrana, estiramiento, estímulos nocivos, agonistas extracelulares, mensajeros intracelulares y la depleción de reservorios intracelulares (Berridge M. y col., 2003). La mayor atención se ha enfocado en la entrada de Ca^{2+} capacitativa, donde los reservorios vacíos activan los canales operados por reservorios (SOC's) en la membrana plasmática (Mignen, O. y Shuttleworth T., 2000). Esta evidencia apoya el mecanismo de un acoplamiento conformacional (Berridge, M., 1995) que propone que el InsP₃R en el RE está directamente acoplado a SOC's. Esto lleva a un interés en SOC's ya que proporciona señales de Ca^{2+} que controlan muchos procesos.

Los InsP₃R y RYR están regulados por varios factores, de los cuales el más importante es el mismo Ca^{2+} , que regula la liberación Ca^{2+} actuando desde el lado del canal luminal o citoplasmático. Incrementar el nivel de Ca^{2+} dentro del lumen del RE mejora la sensibilidad del canal a RYR e InsP₃R. La acción citosólica del Ca^{2+} es más compleja: puede ser tanto estimulante como inhibidora y puede variar entre las diferentes isoformas de InsP₃R. En general, este canal tiene un comportamiento al Ca^{2+} en forma de campana tratado a bajas concentraciones (100-300 nM) y es estimulatorio, mientras que a concentraciones más elevadas, el comportamiento de la relación entre la actividad del InsP₃R y el calcio citosólico es sigmoidal (Bootman, M. y Lipp, P., 1999).

El proceso de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} habilita al InsP₃R y RYR a comunicarse entre sí para establecer señales coordinadas de Ca^{2+} , a menudo organizadas en ondas de propagación (Berridge M.,1993; Clapham D.,1995). Por lo tanto, la función principal de los mensajeros que movilizan Ca^{2+} es alterar la sensibilidad de InsP₃ y RYR (Berridge M. y col, 2000).

2.7.2. Mecanismos OFF

Una vez que el Ca^{2+} ha llevado a cabo sus funciones de señalización, se elimina rápidamente del citoplasma mediante varios tipos de bombas (Pozzan T. y col., 1994) e intercambiadores (Blaustein M. y Lederer W., 1999). Las bombas de membrana plasmática Ca^{2+} -ATPasa (PMCA) y los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ extruyen el Ca^{2+} hacia afuera, mientras que la ATPasa de RE (SERCA) regresa el Ca^{2+} a los reservorios intracelulares. La mitocondria es otro componente importante en la desactivación ya que secuestra Ca^{2+} rápidamente durante el desarrollo de señalización, para después liberarlo lentamente durante la fase de recuperación. Esto es importante en la remodelación tanto de patrones de amplitud como de espacio-temporalidad de las señales de Ca^{2+} (Jouaville L. y col., 1995; Collins, T. y col., 2000).

Las mitocondria liberan protones para crear el gradiente electroquímico que permite la síntesis de ATP. Ese mismo gradiente es usado para dirigir el alza de Ca^{2+} a través de un uniportador que tiene baja sensibilidad al Ca^{2+} (activación máxima $\sim 15 \mu\text{M}$). Esta baja sensibilidad hace que la mitocondria acumule Ca^{2+} de manera más eficiente cuando está cerca de los canales de liberación de Ca^{2+} (Rizzuto R. y col., 1993). La mitocondria tiene una enorme capacidad para acumular Ca^{2+} y la matriz mitocondrial contiene buffers que evitan que la concentración se eleve muy alto. Una vez que el Ca^{2+} citosólico ha vuelto a su nivel de reposo, el intercambiador mitocondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ bombea la gran carga de Ca^{2+} de vuelta al citoplasma, ya sea de regreso al RE o retirado fuera de la célula (Leissring, M. y col., 2000; Bernardi P., 1999).

2.8 Calcio y apoptosis

Varios estímulos fisiológicos incrementan el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que inducen respuestas celulares. Sin embargo, en condiciones patológicas estos cambios suelen ser generalmente pronunciados y sostenidos que producen señales como la activación de enzimas hidrolíticas que provocan un gasto exagerado de energía, perjudicando la producción energética, degradación del citoesqueleto y culminando en la muerte celular. Alteraciones en vías de señalización de Ca^{2+} , por ejemplo la potenciación e inhibición de corrientes de este ion, pueden resultar en citotoxicidad (Nicotera P. y Orrenius S., 1998).

2.9 Regulación del calcio mitocondrial y de retículo endoplásmico en la muerte celular

La mitocondria y el RE no pueden considerarse estructuras estáticas, tienen una íntima comunicación entre ellas formando plataformas muy dinámicas llamadas Membranas Mitocondriales Asociadas (MAM's). Debido a esta estrecha relación el RE, a través del calcio, puede transmitir señales a la mitocondria, la cual las codifica y regula funciones esenciales: metabólicas, de producción de energía y apoptosis (Marchi S. y col., 2017).

La mitocondria no es solamente la fuente energética principal de la célula, si no como ya mencionamos, es un elemento esencial en señalizaciones de calcio intracelulares (Rizzuto R., y col, 2012; Giorgi C., y col, 2012). Actualmente se han identificado molecularmente los complejos mitocondriales uniportadores de calcio (MCU) los cuales permiten la entrada rápida de calcio a la mitocondria (Drago I. y col, 2011). Sin embargo, los MCU tienen una baja afinidad por el calcio debido a que no están expuestos a las concentraciones elevadas citosolicas de calcio directamente, si no a las concentraciones de los microdominios MAM's (Figura 5) (Giorgi C. y col., 2015).

Como ya se mencionaba anteriormente, el RE es considerado como el compartimento de almacenamiento de calcio más grande en la célula. La depleción de calcio de este compartimento provoca la rápida acumulación de este dentro de la matriz mitocondrial por el sistema uniportador. Aproximadamente un 20% de la superficie mitocondrial se encuentra en proximidad con el RE en una célula de mamífero (Rizzuto R. y col, 1998). Se ha propuesto recientemente que el RE liso se encuentra a aproximadamente 10 nm de la membrana mitocondrial, mientras que el RE rugoso a 50 nm (Wang P. y col, 2015; Giacomello M. y Pellegrini L., 2016).

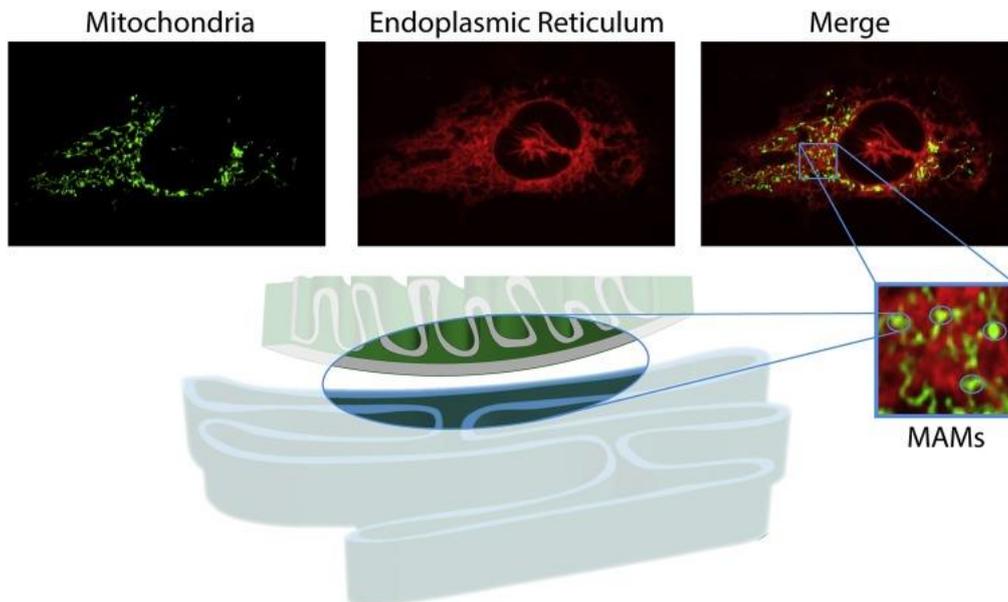


Figura 5. Análisis de inmunifluorescencia de compartimentos mitocondriales (verde) y Retículo Endoplásmico (rojo) en fibroblastos humanos. Los puntos de contacto entre los dos organelos se indican con círculos azules. MAM's:Membranas Mitocondriales Asociadas. Recuperada de Marchi y col., 2018.

Los principales efectores de la liberación de Ca^{2+} en el RE son los InsP_3R y RyR , los cuales son canales dependientes de ligando en respuesta a receptores de la superficie celular y a la producción de segundos mensajeros (InsP_3) (Marks A., 1997)

La cercanía de las conexiones de RE-Mitocondria es un factor relevante para la muerte celular, existe una dependencia de la función celular y de supervivencia en el mantenimiento del espacio entre estos dos organelos. Algunos hechos a cerca de estas interacciones han sido estudiados (Marchi S. y col., 2017):

- 1. El Ca^{2+} liberado del RE es transportado al espacio mitocondrial intermembranal por una clase de poros mitocondriales conocidos como canales de aniones dependientes de voltaje (VDAC's) (De Pinto V. y Palmieri F.,1992).
- 2. Una mala manipulación del Ca^{2+} puede conducir a una sobrecarga de éste en la matriz mitocondrial y a la activación del poro de alta conductancia llamado poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) (Baumgartner H. y col., 2009).

- 3. La sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial es un evento crítico en la bioenergética relacionada a la muerte celular o a cambios morfológicos en la mitocondria, resulta en alteraciones en las funciones mitocondriales como el decaimiento de producción de ATP y el aumento de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Green D. y Kroemer G., 2004; Wasilewski M. y Scorrano L., 2009).
- 4. El Ca^{2+} y las ROS son los más importantes desencadenantes de la apertura de los mPTP, induciendo a la hinchazón de la mitocondria y estas alteraciones a gran escala de la morfología del organelo permiten la liberación de cofactores de caspasas al citosol (Bonora M. y Pinton P., 2014).
- 5. La muerte celular a través de la producción de ROS está relacionada a la unión del Ca^{2+} mitocondrial con la cardiolipina, una lipoproteína abundante en la membrana interna de la mitocondria requerida para una normal actividad enzimática de la cadena respiratoria, desintegrando al complejo II de la cadena respiratoria y provocando estrés oxidativo (Hwang M. y col, 2014).
- 6. La interacción dinámica entre el Ca^{2+} y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) ocurre en los sitios de contacto de RE-Mitocondria. Por lo tanto, cuando ocurre la transferencia de Ca^{2+} RE-Mitocondria estimula la movilización de H_2O_2 desde las crestas mitocondriales a los MAM's, generando nanodominios específicos de H_2O_2 , que a su vez, sensibilizan la liberación de Ca^{2+} del RE para mantener oscilaciones de Ca^{2+} (Booth D. y col, 2016).
- 7. Durante procesos tempranos de estrés del RE, el número de conexiones RE-Mitocondria incrementan significativamente, asegurando una alza de Ca^{2+} mitocondrial y la producción de ATP, lo que representa las bases bioenergéticas para la adaptación a condiciones de estrés (Bravo R. y col, 2011).

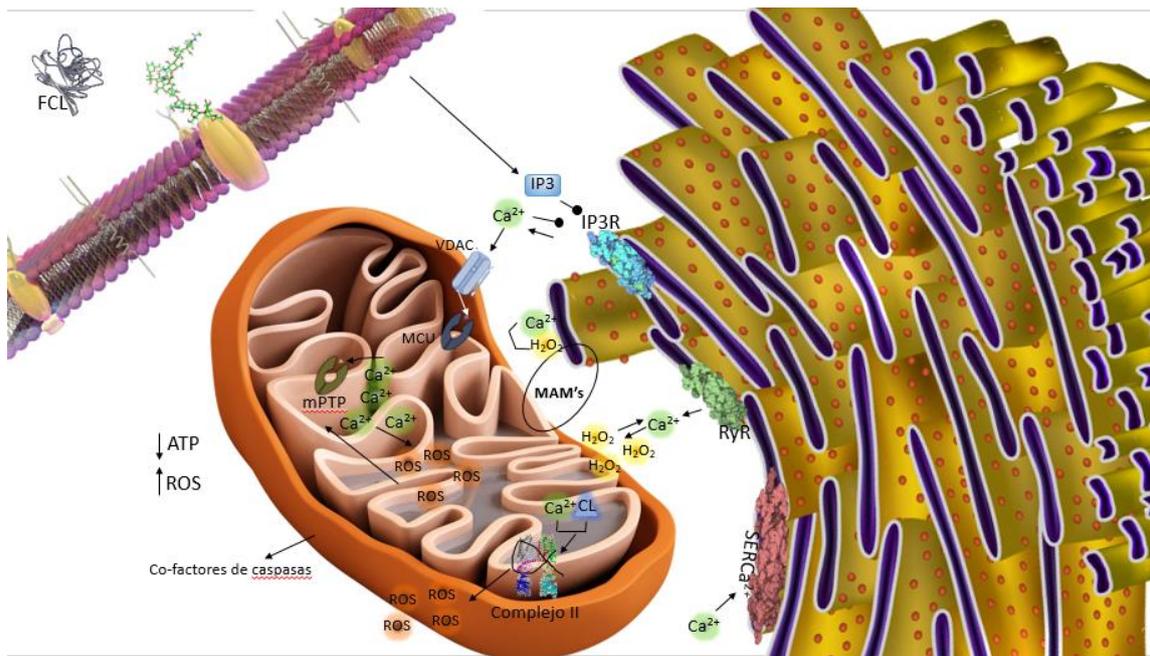


Figura 6. Mecanismos moleculares de muerte celular relacionados al aumento de $[Ca^{2+}]_i$. Esquema realizado para este proyecto de tesis a partir de Marchi S. y col., 2017 (Díaz-Betancourt A., 2018)

Desde principios de siglo fue confirmado el papel crucial de las señales de Ca^{2+} en la regulación de la muerte celular, cuando se demostró que la transferencia de Ca^{2+} desde el RE a la Mitocondria eran necesaria para dar inicio a la muerte celular programada y que la cantidad de Ca^{2+} contenida en el RE es una determinante clave de la sensibilidad al estrés apoptótico (Pinton P. y col, 2001). Además, las propiedades relacionadas con el cáncer de los miembros de la familia Bcl-2/Bax se asocian a la manipulación de la transferencia de Ca^{2+} desde el RE a la Mitocondria para regular la muerte celular (Nutt L. y col, 2002; Chami M. y col, 2004). Años después, se describió que una amplia gama de oncogenes y supresores de tumores requieren la transferencia de Ca^{2+} para ejercer su función pro o anti-apoptótica (Marchi S. y col., 2017). También se sabe que alteraciones en vías de señalización de Ca^{2+} , por ejemplo la potenciación e inhibición de corrientes de este ion, pueden resultar en citotoxicidad (Nicotera P. y Orrenius S., 1998).

2.10. Membranas celulares

Las membranas celulares o plasmáticas son las primeras barreras encontradas por las moléculas extracelulares, incluyendo señales de otras células. Desde que

las membranas celulares son las primeras estructuras de contacto, son filtros importantes que pueden filtrar selectivamente y transmitir señales y sustancias del exterior de la célula al interior para iniciar una respuesta. Las membranas están hechas de componentes moleculares anfipáticas que se auto-asocian para excluir interacciones con el agua en su superficie hidrofóbica (Nicolson G. L., 2016).

La lisis osmótica puede ser el resultado del incremento de la permeabilidad de la membrana por solutos no permeables. Las moléculas neutrales cruzan la membrana solo por mecanismos de difusión por solubilidad y por su alta solubilidad en fases hidrocarbonadas. Los iones tienen más probabilidades de penetrar a través de defectos transitorios de agua en membranas. Esto representa la penetración de moléculas de agua en el núcleo hidrofóbico de la membrana, que actúan como volúmenes móviles que pueden traer pequeñas moléculas e iones a través de la membrana, pudiendo llevar a la formación de poros discretos. La frecuencia de estos defectos transitorios se incrementa con la incorporación de perturbaciones externas y fluctuaciones térmicas de los lípidos de membrana (Gurtovenko A. y Vattulainen I., 2007). El incremento en la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ durante la apoptosis puede incrementar la actividad de enzimas, como la fosfolipasa A2, esfingomielinas y fosfolipasa C, las cuales generan metabolitos lipídicos que afectan la permeabilidad de la membrana (Johansson A. y cols., 2010).

2.11 Características de células de cáncer de mama MCF-7 y de células no transformadas MCF-12.

En la tabla 1 y 2 se describen algunas de las características principales de la población de nuestro interés para los estudios realizados en este trabajo.

Tabla 1. Descripción de población: Células MFC-7. ATCC®

Células transformadas de mama MCF-7	
Línea celular MCF-7	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Humano, <i>Homo sapiens</i> ➤ Tejido mamario; derivado de sitio metastásico: efusión pleural ➤ Adenocarcinoma ➤ Epitelial

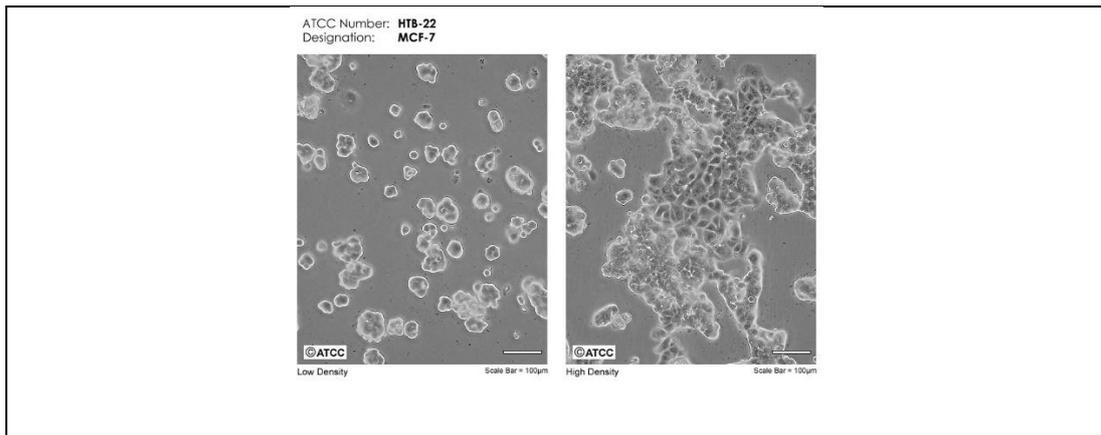
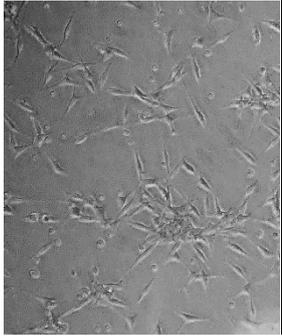
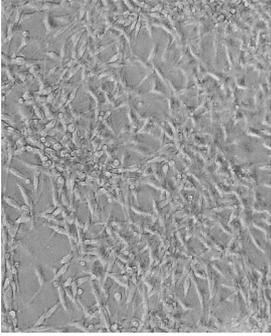


Tabla 2. Descripción de población: Células MFC-12. ATCC®

Células no transformadas de mama MCF-12	
Línea celular MCF12	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Humano, Homo sapiens ➤ Tejido mamario, pecho ➤ Epitelial
 <p>Baja confluencia</p>	 <p>Alta confluencia</p>

IV. JUSTIFICACIÓN

En la literatura se sugiere que la FCL de frijol Tépari tiene un efecto proapoptótico activando vías que concluyen en la muerte celular a las cuatro horas. Sin embargo, no se conocen los mecanismos moleculares que ocurren en etapas tempranas, antes de la activación de señales apoptóticas. Se cree que debido a la interacción de la FCL con moléculas estructurales de la membrana plasmática se dé un evento temprano de entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular y un desregulado aumento de la concentración de éste en el citoplasma, activando procesos de señalización que culminen en apoptosis.

El Ca^{2+} es transportado eficientemente a través de los compartimentos celulares como el citoplasma, depósitos intracelulares (mitocondria, núcleo y RE) y espacio extracelular. El $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en homeostasis fluctúa en el bajo rango de nM en las células, en contraste con los altos valores mM del espacio extracelular y reservorios internos. Por lo tanto, un alza descontrolada del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es asociada con eventos de muerte celular como apoptosis.

V. HIPÓTESIS

La FCL de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) provoca la movilización de calcio citoplasmático en células de mama MCF7 y MCF12

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Determinar el efecto en la movilización de calcio citoplasmático de la interacción entre la FCL del frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) y las células de mama MCF7 y MCF12.

6.2. Objetivos específicos

- 1 Medir por sondas fluorescentes cambios relativos de calcio en el citoplasma provocados por la FCL a corto plazo
- 2 Establecer tiempos y concentraciones a las cuales la FCL puede inducir movilización de calcio a través de las membranas
- 3 Determinar el efecto dosis respuesta de la FCL mediante la respuesta de Ca^{2+} citoplasmático a través del análisis de imágenes de microscopía.
- 4 Medir viabilidad celular a largo plazo con el tratamiento de la FCL

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Material vegetal

Las semillas de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) se obtuvieron comercialmente en Hermosillo, Sonora. La obtención de la fracción concentrada de Lectina (FCL) se realizó en la UAQ en el laboratorio de Biología Molecular a cargo de la Dra. Teresa García Gasca y en CINVESTAV Irapuato, en el laboratorio de Mecanismos de Defensa de Plantas a cargo del Dr. Alejandro Blanco Labra a partir de semillas limpias de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) de la línea PI-170.

7.2. Fracción concentrada de Lectina de Frijol Tépari (FCL)

Las semillas fueron molidas en un molino eléctrico modelo A-10 Analytical (Tekmar, Germany) hasta obtener harina que posteriormente se pasó por un tamiz fino (W.S. Tyler, OH, USA) para homogeneizarla. Lo obtenido fue desgrasado con una mezcla de cloroformo-metanol 2:1 en proporción 4:1 p/v en agitación por 15 min. Los solventes se retiraron por filtración con vacío y se repitió el proceso 5 veces. La harina desgrasada se secó a temperatura ambiente.

Se realizó la extracción de las lectinas a 4°C durante 12 h utilizando 100 g de harina de frijol Tépari desgrasada en 500 mL de buffer Tris-HCl (SIGMA, St. Louis, MO, USA) 50 mM pH 8, 1:6 (p/v), en agitación constante. Se recuperó el sobrenadante y se sometió a precipitación por sulfato de amonio primero a 40% en agitación a 4°C por 1 hora seguido de una precipitación a 70% de sulfato de amonio a 4°C por 1 hora. La proteína obtenida en un volumen mínimo se dializó contra agua desionizada utilizando membrana de diálisis de 30 kDa (Spectrum Laboratories, California, US) exhaustivamente durante toda la noche hasta obtener una conductividad de 1 $\mu\Omega$ (microhms). Se tomó una muestra de lectina dializada y se realizó una separación bajo el criterio de exclusión molecular (SEC) utilizando resina Sephadex G75 (Farmacia Biotech; Uppsala, Suiza) montada en una columna de vidrio de 180 X 2.1 cm. La columna fue equilibrada con bicarbonato de amonio 0.02 M pH 7.8 a 4°C. Se obtuvieron fracciones de 2 mL de volumen a una velocidad de elución de 0.125 ml/min.

A cada una de las fracciones obtenidas de la separación cromatográfica se determinó concentración de proteína a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman

DU-65. El contenido de proteína de cada fracción se cuantificó por el micro método de Bradford (Bradford M., 1976) y se determinó la actividad aglutinante específica en placas de 96 pozos. Brevemente, se agregaron 100 µL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) como control negativo, después en los pozos de cada línea (2A, 3A,..., 8A) se agregaron, por triplicado, 100 µL de la fracción a probar con concentración de proteína conocida. Posteriormente se agregaron 50 µL de PBS a toda la placa y se realizaron diluciones dobles seriadas comenzando en los primeros pozos y pasando a los siguientes (1A, 1B, 1C,...,1L). Finalmente, a cada pozo se le agregaron 50 µL de eritrocitos humanos tipo A+ al 1% previamente fijados con glutaraldehído (Turner R. y Liener I., 1975) y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. La placa se leyó en un microscopio invertido Axiovert A1 de Carl Zeiss a un aumento de 10x y la actividad aglutinante o actividad específica se cuantificó mediante la ecuación (Jaffé W., 1980):

$$AE = 2^n/mg$$

Donde AE: actividad específica, n: número del último pozo (o dilución) donde se observó aglutinación, mg: microgramos de proteína determinada por Bradford.

7.3. Cultivo de celular

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

Las células fueron donadas por la Dra. Carmen Aceves y la Dra. Evangelina Delgado del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El cultivo de células a partir de una caja de 60 mm confluyente se realizó de la siguiente manera:

1. Se retiró y desechó el medio base de la caja de cultivo (primaria)
2. Se enjuagó la capa celular primeramente con 1 mL de solución de Verseno (contenido en mM: 136 NaCl, 2 KCl, 8 Na₂HPO₄, 1 KH₂PO₄, 0.6

EDTA) por un minuto y se aspiró. Posteriormente se agregó solución de tripsina (300 μ L) y se incubó por seis minutos a 37°C.

3. Se agregaron 2mL de medio DMEM y se resuspendieron las células
4. Se observaron las células bajo un microscopio invertido para asegurar la dispersión de la monocapa celular.
5. Se sembraron en otra caja de cultivo (secundaria) sobre vidrios de 12 mm marca WPI 200 μ L de medio con células.
6. A la caja de cultivo primaria se le añadieron los mL necesarios restantes de medio DMEM para completar un volumen total de 3 mL y seguir creciéndolas.
7. Se incubaron las células a 37°C con 5% de CO₂ por las horas requeridas según la confluencia final de la caja primaria y por 24 hrs en el caso de la caja secundaria

7.4. Movilización intracelular de Ca²⁺

Los cambios en la concentración intracelular de Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) fueron registrados después de 24 h de cultivo. Se cargaron las células MCF12 y MCF7 por 15 minutos a temperatura ambiente con 5 μ M de Fluo4-AM (Thermo Fisher, No. F14201) en solución Krebs (KS, contenido en mM): 150 NaCl, 1 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 4 Glucosa, 10 HEPES, pH ajustado a 7.4, suplementado con 0,5% de BSA y 0,01% de ácido plurónico. Las células se lavaron tres veces con KS para eliminar el Fluo4-AM extracelular. Las células cargadas en los vidrios se observaron y colocaron en un microscopio MVX 10 Olympus con una amplificación de 630 aumentos, y una cámara XM10 Olympus, con una velocidad de captura de una imagen por segundo. Se realizaron mediciones fluorescentes utilizando un cubo de fluorescencia de GFP.

La captura de imágenes (*frames*) en tiempo real de las células tratadas con la FCL, se obtuvieron con el programa Olympus Cell P. Las capturas de imágenes se salvaron en formato avi., y luego fueron transformados a formato de secuencia (seq) con el programa Image ProPlus versión 6.0. En el programa Image J se realizó el análisis de las regiones de interés (ROIs) del campo visual de las células para obtener los datos cuantitativos de los cambios de la intensidad de

la fluorescencia reportadas como Unidades de Fluorescencia Arbitraria (UFAs), para posteriormente analizar y graficar estos transitorios en el programa OriginPro 2017, en donde se reporta la media de las UFAs de los ROIs seleccionados a través del tiempo de las diferentes concentraciones de FCL utilizadas (Saldaña C. y col., 2009).

7.5 Viabilidad celular por AlamarBlue®

Para determinar viabilidad celular, se utilizó el protocolo de Alamar Blue (Thermo Fisher, No. DAL1025). Este protocolo se basa en la producción de ROS por las líneas celulares en presencia de diferentes concentraciones y tiempos de incubación de FCL.

La estabilidad celular se puede controlar por numerosos métodos. La integridad de la membrana plasmática, la síntesis de ADN, el contenido de ADN, la actividad enzimática, la presencia de ATP y las condiciones de oxidación y reducción celular son indicadores conocidos de la viabilidad celular y la muerte. El reactivo de viabilidad de células Alamar Blue es un reactivo no tóxico de color índigo que detecta células metabólicamente activas y se utiliza para el análisis cuantitativo de la viabilidad y proliferación celular. El reactivo alamarBlue tiene una amplia aplicabilidad y se puede usar con diversas líneas de células humanas y animales, bacterias, plantas y hongos (alamarBlue™ Cell Viability Reagent, ThermoFisher).

Alamar Blue monitorea el ambiente reductor de células vivas. El ingrediente activo es la rezasurina (nombre IUPAC: 7-hidroxy-10-oxidofenoxazin-10-ium-3-one), también conocido como diazo-resorcinol, azoresorcina, resazoina. Es soluble en agua, estable en medio de cultivo, no tóxico, es permeable a membranas celulares y permite el continuo monitoreo de las células en cultivo. Al ingresar a las células vivas, la resazurina se reduce a resorufina, la cual es altamente fluorescente y de color rosa (Figura 7). El colorante actúa como un aceptor de electrones en la cadena de transporte de electrones sin interferir en la transferencia normal de éstos. El potencial de óxido-reducción del Alamar Blue es +380mV a un pH 7 a 25°C. Sin embargo, puede ser reducido por NADPH, FADH, NADH, así como por citocromos. Debido a que el colorante acepta

electrones, éste cambia del estado oxidado, azul no fluorescente a un estado reducido, rosa fluorescente.

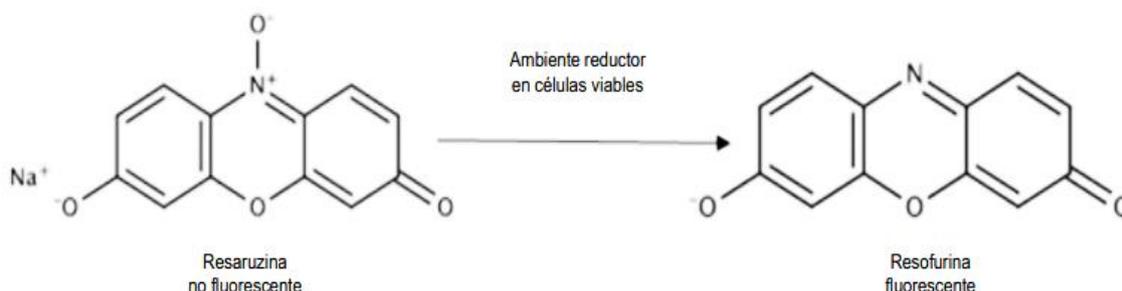


Figura 7. Principio básico de la oxidación de resaruzina a resofurina

Este cambio del estado oxidado al reducido da flexibilidad de detecciones cuantitativas como lecturas calorimétricas y/o fluorimétricas (siendo estas últimas más sensibles) o cualitativas como un cambio de color visible que indica la presencia o ausencia de células viables (Rampersad, S., 2012).

Para realizar el ensayo se utilizó una caja de cultivo de 96 pozos en donde sembraron 5,000 células en cada uno, dividiendo la caja a la mitad para las células MCF7 y la otra mitad para MCF12. Las células se contaron en una cámara de Neubauer y se extrapolo al volumen total. Cada pozo contuvo 5,000 células en 1 mL de medio de cultivo DMEM, 20 μ L de tratamiento con FCL a las concentraciones de 0.108, 0.217, 0.435, 0.87, 1.74, 3.48, 6.96, 13.92, 27.85 y 55.7 μ g/mL y el 10% de Alamar Blue, dejando controles negativos y controles positivos con KS.

Las mediciones se realizaron a los 10 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 9h, 10h, 11h, 12h, 24h, 30h, 36, 48h, 54h y 72h de incubación a 37°C. Las señales de fluorescencia se leyeron en un espectrofotómetro Varioskan (Thermo Fisher Scientific, LUX multimode reader) 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 versus la concentración del tratamiento con la FCL (AlamarBlue® Cell Viability Assay Protocol, ThermoFisher). En la figura 8 se muestra un esquema simplificado de los pasos seguidos.

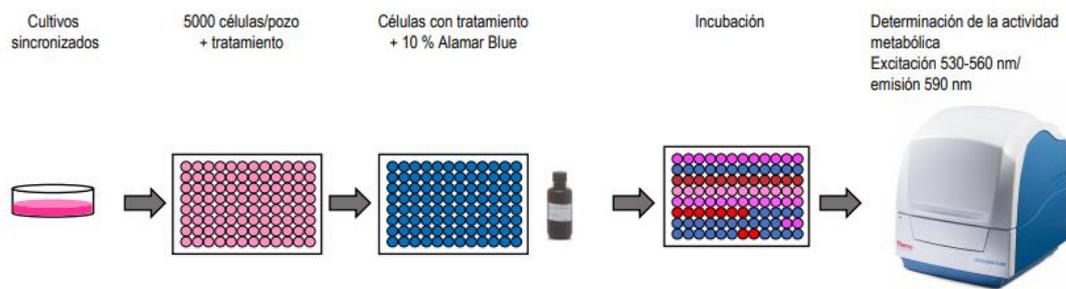


Figura 8. Metodología para la cuantificación de fluorescencia de los cultivos de MCF7 y MCF12 ante tratamiento con la FCL

Los valores de fluorescencia y su desviación estándar se transformaron en % de inhibición a través de la fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - (\text{Fluo.}(t) / \text{Fluo.}(c) \times 100)$$

Donde:

- Fluo (t) es la fluorescencia del cultivo después de la exposición a una concentración de la FCL.
- Fluo (c) es la fluorescencia del cultivo control

7.6 Morfología celular

La morfología nos da información acerca de la salud celular. Las células MCF-7 y MCF-12 son adherentes con una morfología alargada y triangular. La circularidad celular es un indicador de muerte celular, por lo que es posible medir de forma cualitativa y cuantitativa la salud celular a través de imágenes de microscopía. La primera captura de imágenes de ambas células fue las 0 horas ante de añadir los tratamientos, tomándolo como control negativo; la segunda captura de imágenes fue a las 72 horas de incubación con los tratamientos, con el fin de comparar la morfología del antes y después de los tratamientos. Las imágenes se capturaron con el microscopio invertido Leica DMI1 con el objetivo a 40X. Se contaron las células con morfología circular y normal del campo de visión y se calculó el porcentaje de circularidad. En el caso del control negativo, este porcentaje se tomó como el 100% de viabilidad celular y con base a éste, normalizar los porcentajes de viabilidad de todos los tratamientos.

7.7. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se realizaron pruebas de ANOVA de una vía, y comparaciones *Post hoc* con un intervalo de confianza del 99% ($p < 0.001$)

utilizando el paquete estadístico SPSS versión 23. El análisis de imágenes se realizó con el paquete estadístico Origin Lab 2017, donde se realizaron los análisis gráficos.

VIII. RESULTADOS

8.1 Determinación de proteína por Bradford

Después de la extracción de la FCL que nos da un rendimiento aproximado de 300 mg de FCL/Kg de frijol Tépari molido, se determinó la concentración de proteína total por el método de Bradford, la cual fue de 557 µg/mL con una curva estándar de $R^2 = 0.997$.

$$\text{Concentración} = (\text{Abs} - 0.434) / 0.00557$$

8.2 Pruebas de aglutinación celular con eritrocitos

En la figura 9 se muestra el resume de los resultados de la placa para el ensayo de aglutinación con eritrocitos. En el panel A, tomado como control negativo, se observa que no existe aglutinación; el panel B son los eritrocitos aglutinados del primer pozo, donde se encuentra concentrada la mayor cantidad de FCL; el panel C es el pozo 9, último pozo donde aglutinó eritrocitos la FCL.

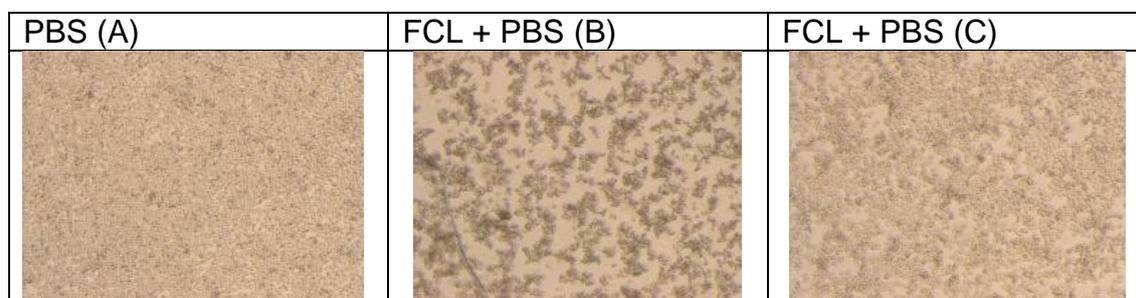


Figura 9. Ensayo de aglutinación de eritrocitos. (A) Pozo de control negativo; (B) Pozo 1 con la mayor aglutinación; (C) Pozo 9, último pozo con aglutinación

Las unidades aglutinantes (UA) fueron las siguientes:

$$AE = 2^n / \text{mg} = 2^9 / 0.557 \text{ mg} = 919.21 \text{ UA}$$

8.3 Movilización de $[Ca^{2+}]_i$

8.3.1 MCF12 Transitorios de Calcio citoplasmático

Todas las concentraciones probadas para la línea celular MCF12 se encuentran la sección de anexo, excepto las aquí presentadas.

En la figura 10 se representan los transitorios de calcio de tres concentraciones de diferente orden de magnitud a las cuales se tuvo un efecto diferencial marcado, 0.108 $\mu\text{g/mL}$, 1.74 $\mu\text{g/mL}$ y 27.85 $\mu\text{g/mL}$ de FCL. Se observa un efecto dosis dependiente en donde existe una correlación positiva del aumento de la fluorescencia con respecto a la concentración de la FCL.

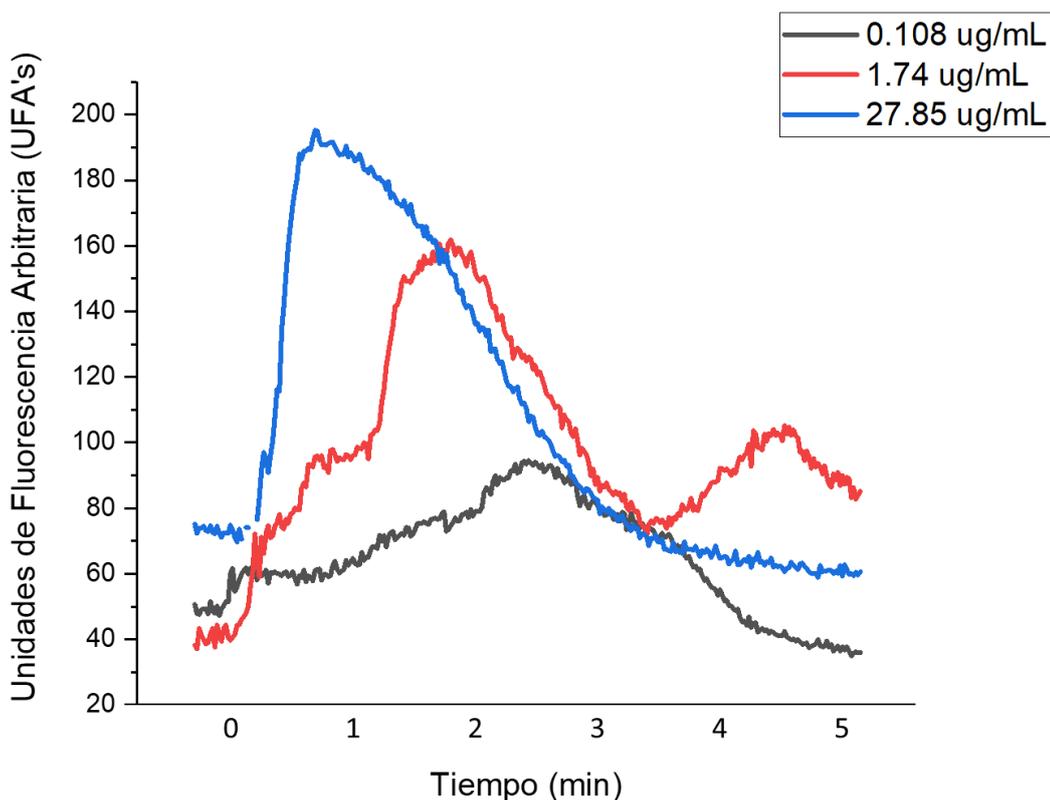
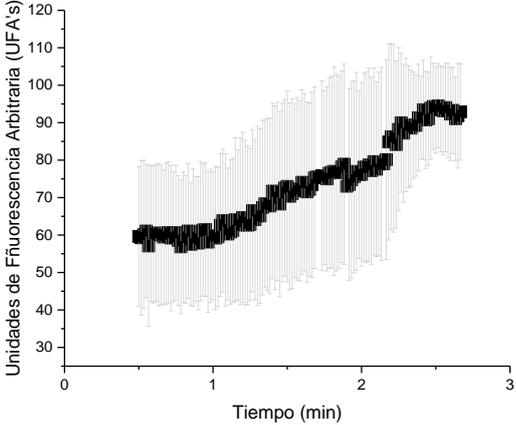
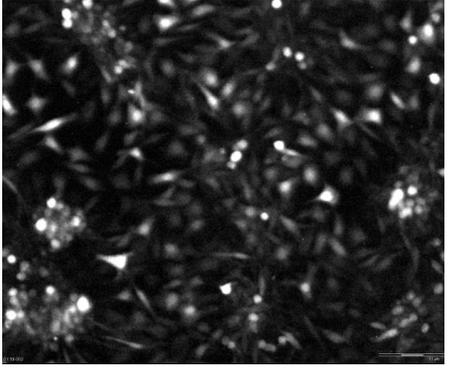
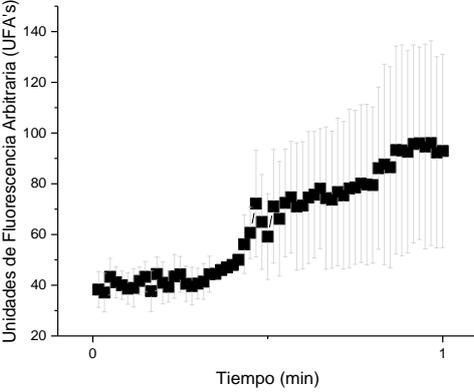
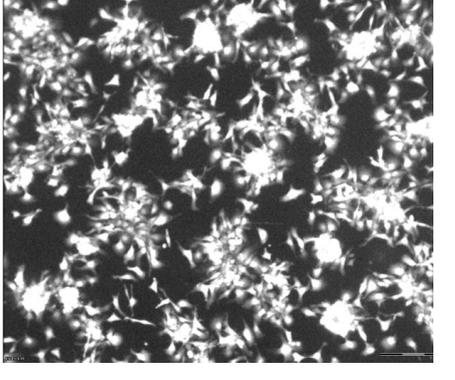
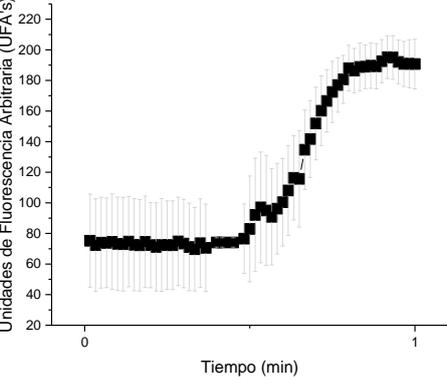


Figura 10. Determinación de transitorios de calcio inducidos por diferentes concentraciones de FCL en Células MCF-12. Las células fueron cargadas con el indicador Fluo 4- AM.

Esta diferencia antes mencionada se puede observar en las imágenes de la tabla 3, en donde se muestra también el comportamiento del aumento de la fluorescencia desde etapas basales de calcio hasta alcanzar el pico máximo de la respuesta (mecanismos ON).

Se calculó el tiempo medio de activación a la respuesta máxima (τ ON) del mecanismo ON de las tres concentraciones. Estos tiempos resultaron inversamente proporcionales a la respuesta, ya que entre mayor era ésta, menor el tiempo medio de activación.

Tabla 3. (A) Fluorescencia al pico máximo, (B) mecanismo ON y tiempo medio de activación (τ ON) de la respuesta de calcio intracelular ante el tratamiento con la FCL en células MCF12.

Concentración (A)	Mecanismo y τ ON
<p data-bbox="237 378 691 409">0.108 $\mu\text{g/mL}$ FCL</p> 	<p data-bbox="938 378 1126 409">1.25 minutos</p> 
<p data-bbox="237 987 691 1019">1.74 $\mu\text{g/mL}$ FCL</p> 	<p data-bbox="954 987 1110 1019">1.0 minuto</p> 
<p data-bbox="237 1525 691 1556">27.85 $\mu\text{g/mL}$ FCL</p> 	<p data-bbox="946 1525 1114 1556">0.8 minutos</p> 

En la figura 11 se graficó el cambio de la respuesta basal al pico máximo de fluorescencia con respecto al Logaritmo en base 10 (log) de las diferentes concentraciones de FCL probadas en las células MCF12; se ajustó con el modelo logaritmico de Boltzmann, arrojando una concentración media a la respuesta (EC₅₀) de 4.54 µg/mL de la FCL.

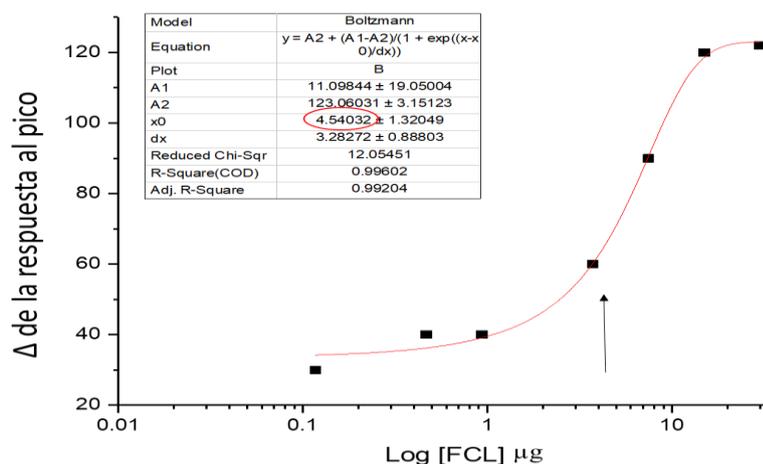


Figura 11. Cambio de la respuesta al pico máximo de fluorescencia con respecto al Log de las concentraciones probadas con FCL

El incremento relativo de la fluorescencia determinado en UFA's (Unidades de Fluorescencia Arbitarias) es una respuesta ante el aumento del calcio citoplasmático, pero no distingue entre el posible calcio proveniente del medio extracelular a través de la membrana plasmática o del posible calcio liberado por los recerborios intracelulares, principalmente del RE. Para responder a esto, se realizaron unos experimentos pero esta vez en condiciones de cero calcio extracelular para de esta manera, descartar la participación del calcio extracelular y así tener un panorama más claro de la principal fuente responsable de los aumentos de calcio citoplasmático.

Para ello, se repitieron los experimentos de las concentraciones de 1.74 y 27.85 µg/mL en dos condiciones, con y sin calcio extracelular durante los mismos cinco minutos.

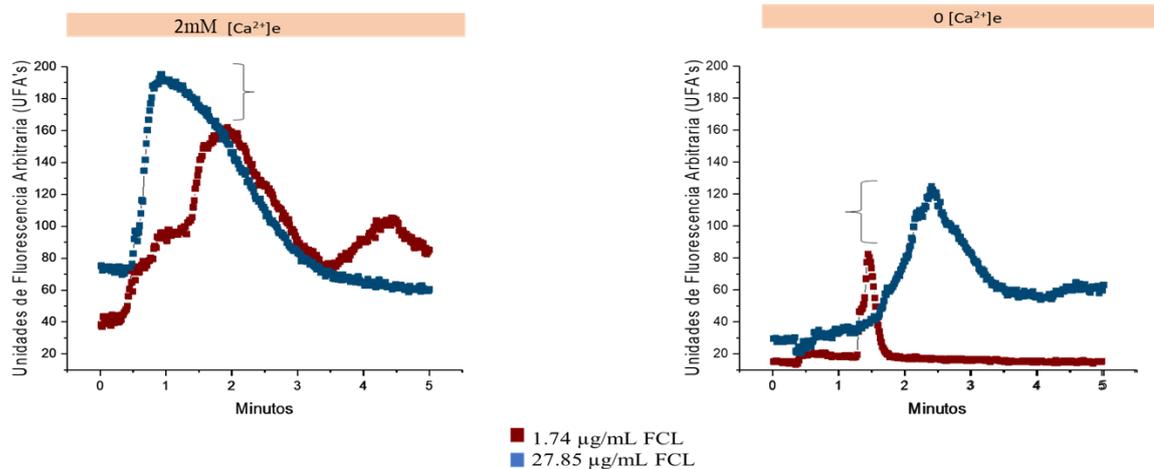


Figura 12. Cambio de la fluorescencia con respecto al tiempo en condiciones de calcio extracelular y cero calcio extracelular con las concentraciones de 1.74 y 27.85 $\mu\text{g/mL}$ en células MCF12

El resultado se muestra en la figura 12; en donde se observa un mayor aumento de la fluorescencia con la concentración de 27.85 $\mu\text{g/mL}$ con respecto a 1.75 $\mu\text{g/mL}$ en ambas condiciones, sin embargo, las UFA's en ambas concentraciones fueron menor en la condición de cero calcio extracelular con respecto a la condición con 2 mM de calcio extracelular, lo cual sugiere que la liberación de reservorios intracelulares fue en menor proporción en presencia de calcio extracelular. También se observa que los mecanismos OFF son más rápidos en condiciones de cero calcio extracelular, lo que sugiere que el calcio

excedente es recuperando a través de SERCa^{2+} hacia los reservorios intracelulares de manera más rápida.

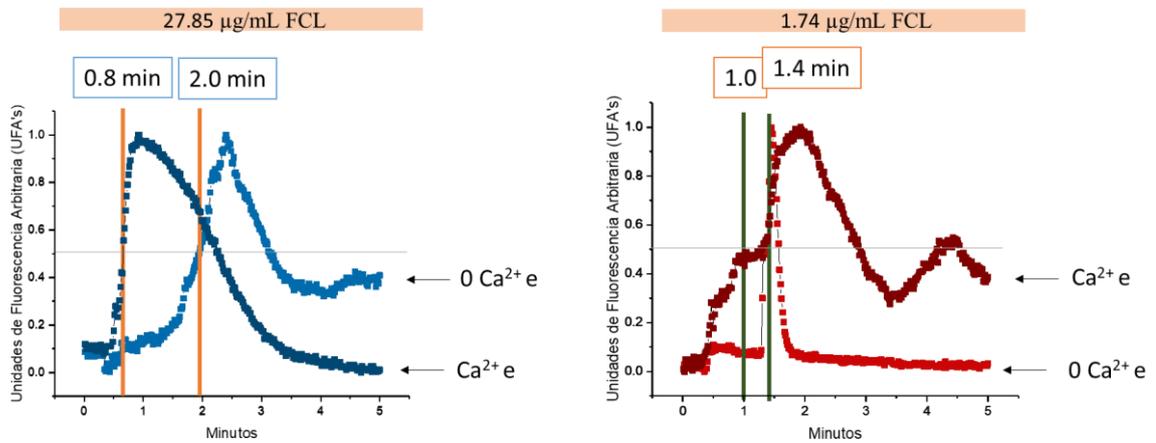


Figura 13. Comparación de la τ ON en condiciones de cero calcio extracelular y con la concentración de 2 mM de calcio extracelular

Al comparar por concentraciones, las condiciones con calcio y cero calcio extracelular se encontró que en esta última la τ ON en ambas concentraciones es mayor, lo que indica que hubo un retraso en la respuesta con respecto a la condición con calcio extracelular.

En la condición de cero calcio extracelular, por lo tanto, se observó un retraso en la respuesta en la alza de las UFA's (mecanismos ON) y una recaptura más rápida del calcio o disminución en las UFA's (mecanismos OFF), por lo que el intervalo de tiempo en el que la célula tiene el calcio citoplasmático más elevado a sus niveles de homeostasis es menor que en condiciones con calcio extracelular, en donde la ventana de tiempo aumenta debido a los mecanismo ON y OFF.

8.3.2 MCF-7 Transitorios de Calcio citoplasmático

Las concentraciones probadas para la línea celular MCF-7 se basaron en los experimentos con la línea celular MCF-12 y fueron las siguientes: 0.108, 1.74 y 27.85 de FCL. En la figura 14 se muestran los efectos transitorios de calcio de estas concentraciones.

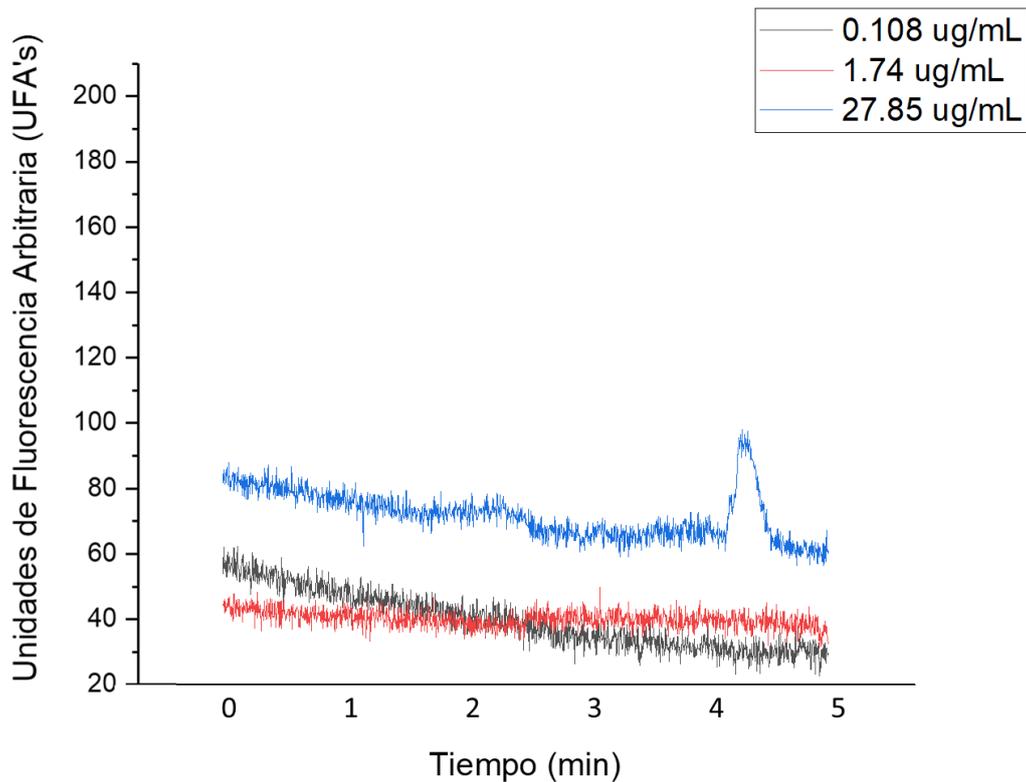
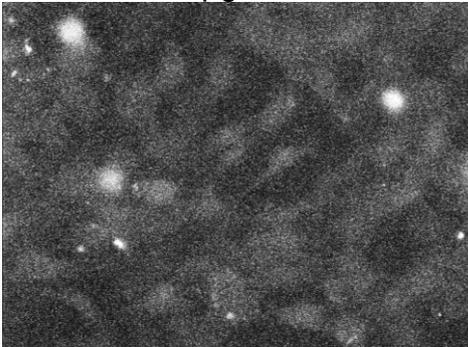
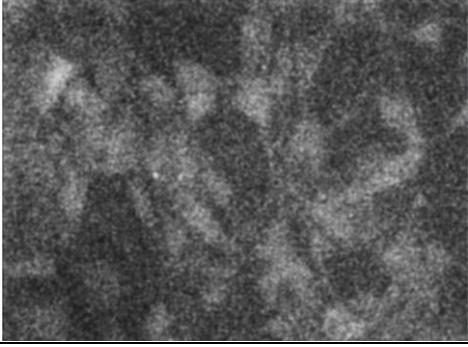
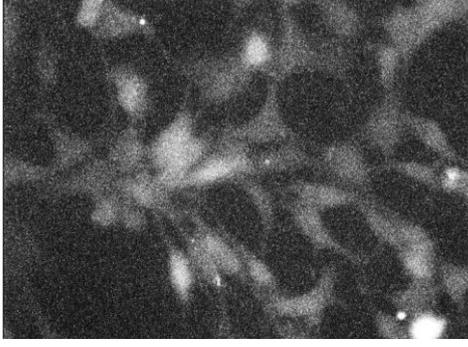
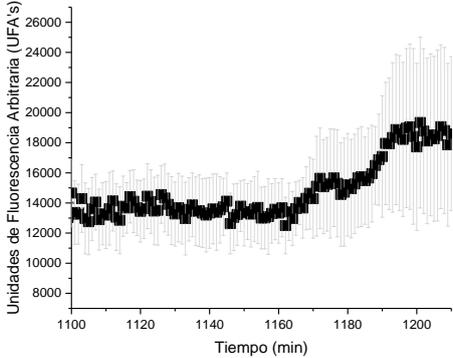


Figura 14. Determinación de transitorios de calcio inducidos por diferentes concentraciones de FCL en Células MCF-7. Las células fueron cargadas con el indicador Fluo 4- AM.

Para las concentraciones de 0.108 y 1.74 $\mu\text{g/mL}$ no existió respuesta, sino hasta la concentración de 27.85 $\mu\text{g/mL}$, en donde se generó el incremento de fluorescencia hasta el minuto cinco. Las MCF-7 no respondieron en el mismo rango de concentración que las MCF-12, lo cual sugiere que existe una menor sensibilidad a las FCL y que los mecanismos de liberación como de recaptura de Ca^{2+} son significativamente diferentes en ambas líneas celulares.

Debido a que en el caso de las células MCF-7 la única concentración que tuvo una respuesta ante el tratamiento con la FCL fue la de 27.85 $\mu\text{g/mL}$, fue la concentración a la cual en la tabla 4 se representa el mecanismo ON y el cálculo de la τ ON.

Tabla 4. (A) Fluorescencia al pico máximo, (B) mecanismo ON y tiempo medio de activación (τ ON) de la respuesta de calcio intracelular ante el tratamiento con la FCL en células MCF7

Concentraciones (A)	Mecanismo y τ ON (B)
0.108 $\mu\text{g/mL}$ FCL 	
1.74 $\mu\text{g/mL}$ FCL 	
27.85 $\mu\text{g/mL}$ FCL 	5.25 minutos 

El tiempo de respuesta de activación, el cuál fue de 5.25 minutos, a diferencia de las células MCF-12 las cuales tuvieron una respuesta a los 0.8 minutos.

8.4 Viabilidad celular

La viabilidad de las células MCF-12 y MCF-7 se ve afectada en presencia de FCL. En ensayo de viabilidad celular, se analizó de forma cualitativa por el

cambio en la morfología celular y de manera cuantitativa por detección de la resorufina fluorescente.

8.4.1 Cambio visual de color

La aplicación de los tratamientos fue en el orden en que muestra la figura 15, cada tratamiento y control se aplicó por triplicado.

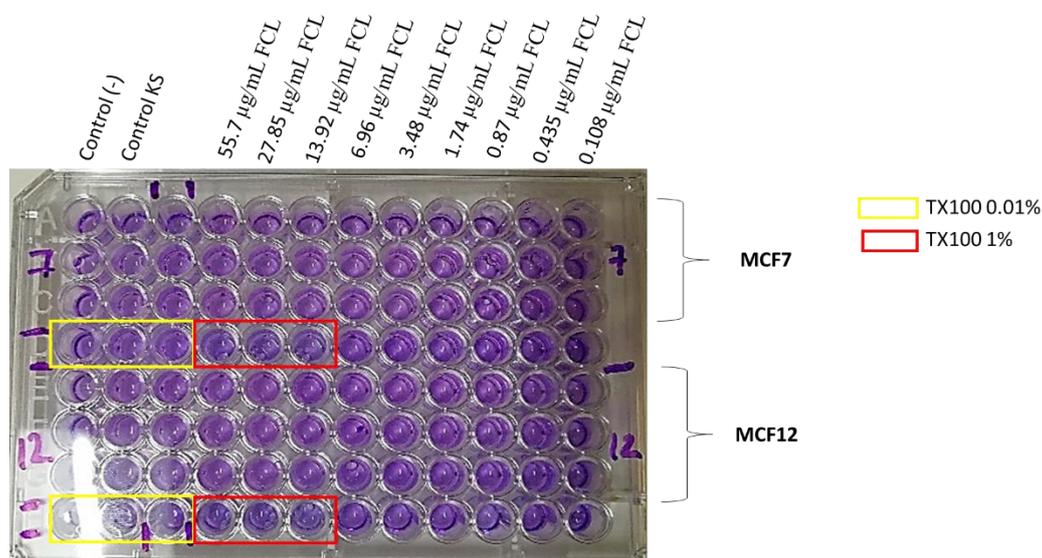
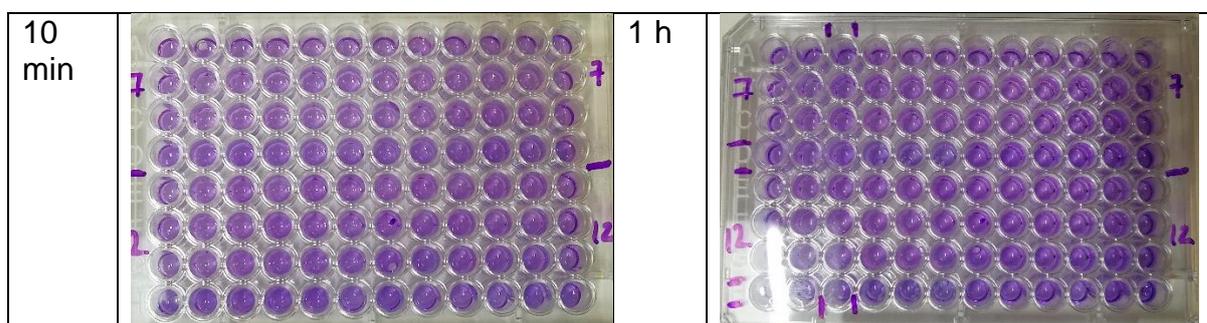
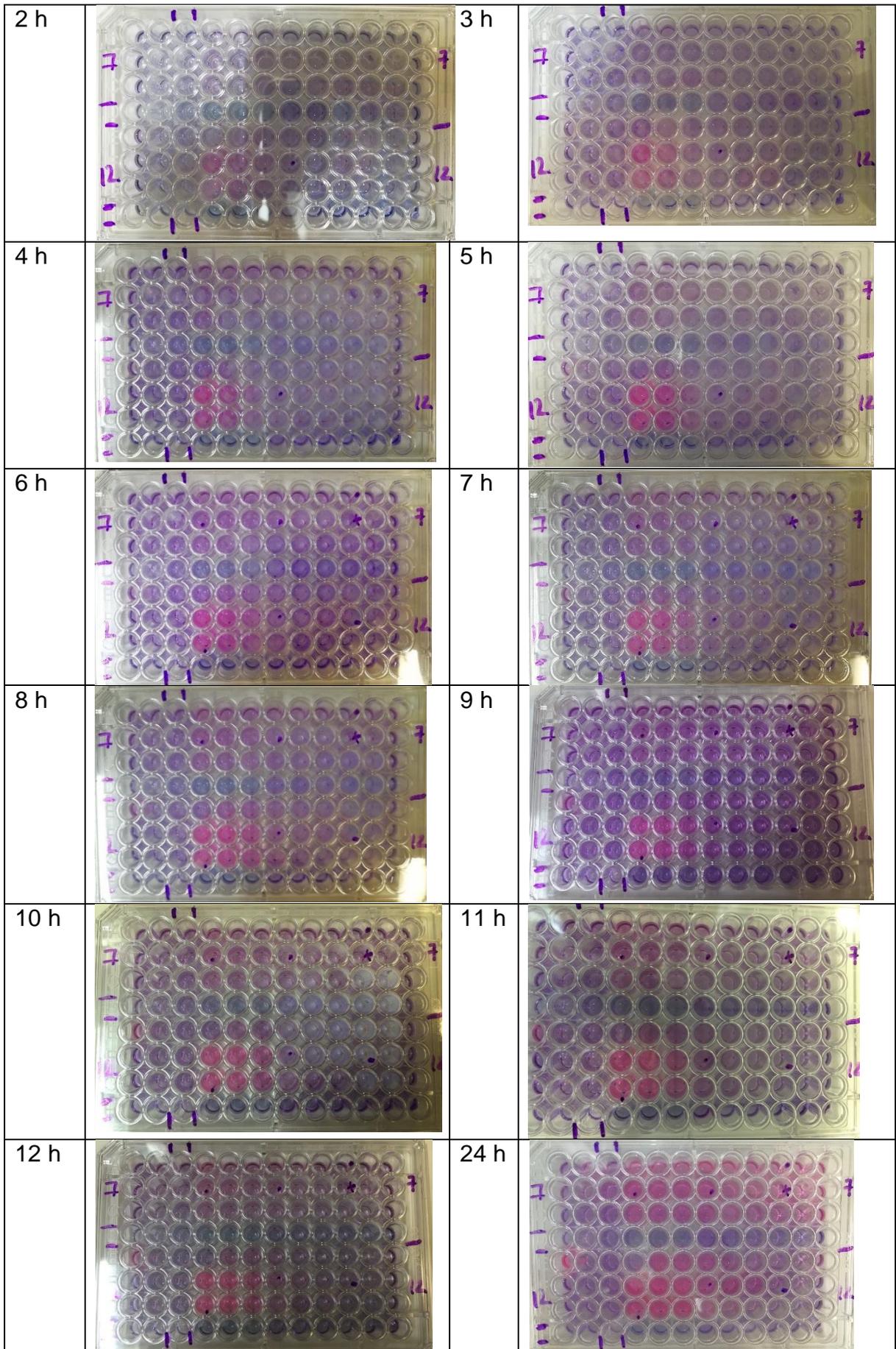


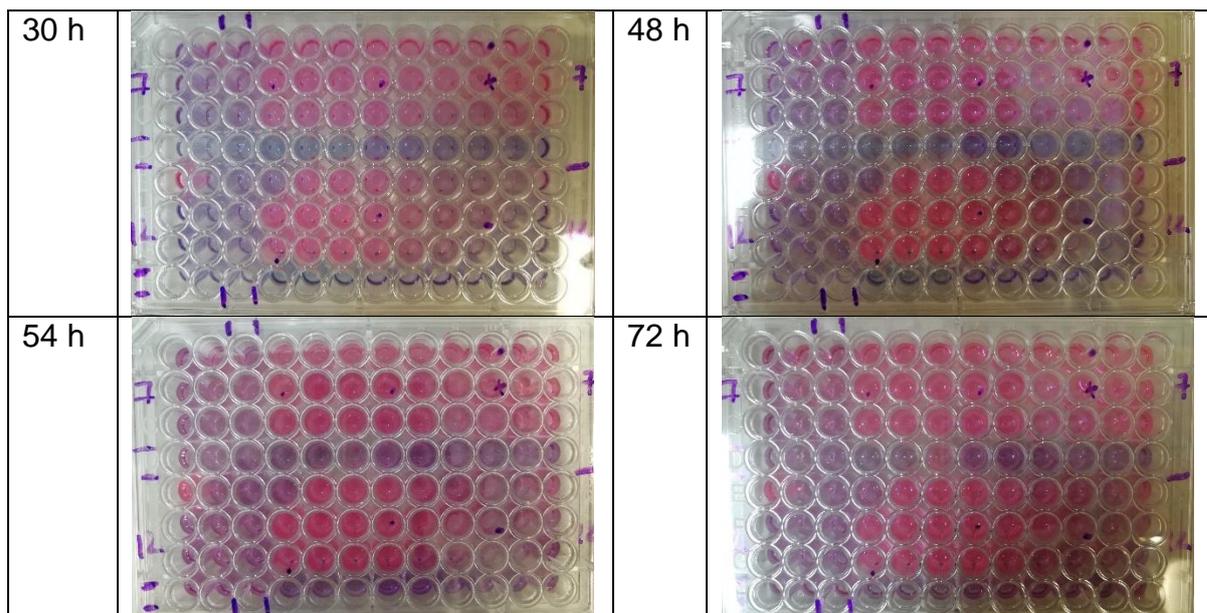
Figura 15. Distribución de los tratamientos y controles para el ensayo de viabilidad celular.

En la tabla 5 se representa la viabilidad celular representada como un cambio de color del medio de morado a rosa fluorescente en los tiempos a los cuales se realizaron las mediciones de fluorescencia.

Tabla 5. Evolución de la transformación del compuesto activo resaruzina a resorufina con respecto al tiempo y tratamientos de la FCL.







Como se puede apreciar en las imágenes, el cambio de color del medio de azul a rosa fluorescente, que indica el cambio de oxido-reducción, es directamente proporcional al tiempo de incubación. También se observa que las células MCF-12 demuestran una mayor sensibilidad a los tratamientos debido al cambio de color desde la hora 2; sin embargo, para las 48 h las células MCF-7 ya habían alcanzado el color rosa en la totalidad de los pozos, a diferencia de las células MCF-12. Este cambio en la velocidad del proceso de reducción celular tuvo la pauta a las 24 h, en donde las células MCF-7 comenzaron a reducirse de manera más rápida, lo que no se observó en el intervalo de los 10 minutos a las 12 h.

En la tabla 6 se representa el estado oxidado o reducido (según sea el caso) para cada línea celular a diferentes tiempos y a dos concentraciones, la más alta provada de 27.85 $\mu\text{g/mL}$ (\uparrow) y la más baja provada de 0.108 $\mu\text{g/mL}$ (\downarrow)

Tabla 6. Estado óxido-reducido por cambio de color de las células MCF-7 y MCF-12 a diferentes tiempos y concentraciones

MCF-7	10 min		2 h		12 h		24 h		48 h		72 h	
	\uparrow	\downarrow										
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MCF-12	10 min		1 h		12 h		24 h		48 h		72 h	
	\uparrow	\downarrow										
	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
Oxidado/reducido	+/-											

8.4.2 Medición cuantitativa – cambio de la intensidad de fluorescencia

Los resultados obtenidos de los diferentes tiempos y concentraciones se muestran en las siguientes gráficas.

La primera medición de la intensidad de fluorescencia se realizó a los 10 minutos después de añadir los tratamientos. En la línea celular MCF-7 presentaron diferencias significativas con respecto al control ambos tratamientos con TX100, al 0.1 y 1%; a su vez entre el TX100 al 0.1% con la concentración más alta de FCL de 55.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el caso de las células MCF-12, tanto el tratamiento con TX100 al 1% como el de 0.1% resultaron diferentemente significativos a las dos tratamientos más concentrados con la FCL, el de 55.7 y 27.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

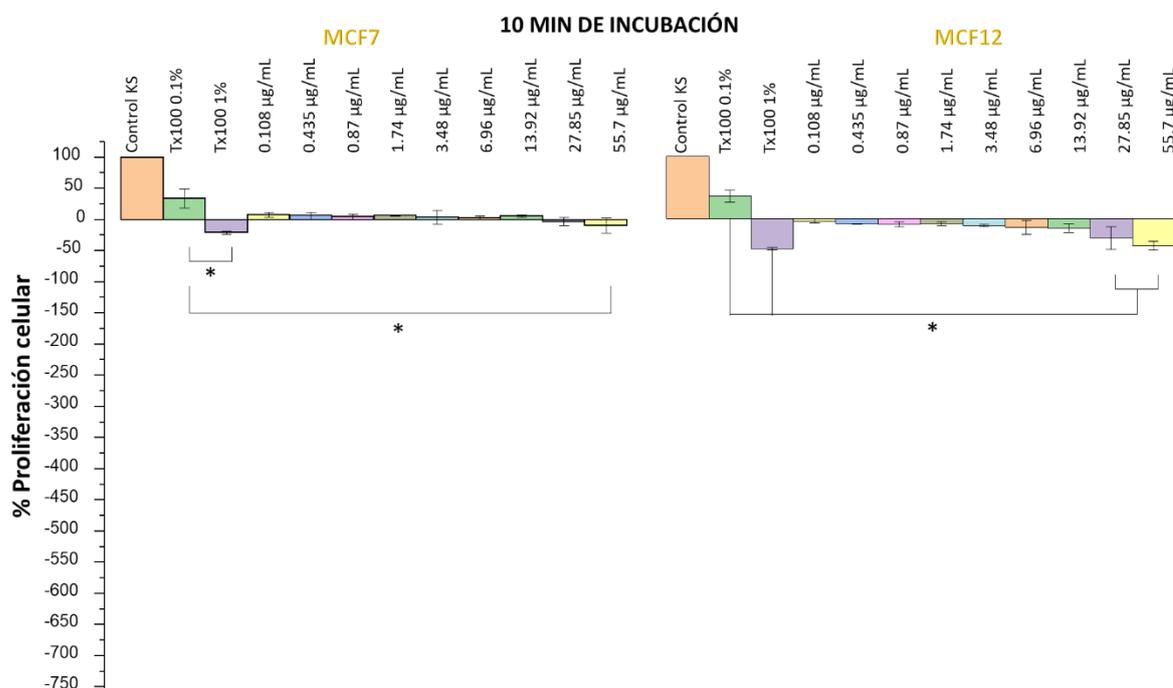


Figura 16. Porcentaje de proliferación celular a los 10 minutos de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL.

* diferencia de medias es significativa al nivel $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

En la primera hora, los tratamientos muestran una gran diferencia entre ambas líneas celulares. Se observa que el tratamiento con TX100 al 1% en las MCF-7 cambió de inhibir a las células a proliferar, por lo que afectó a las células en los primeros minutos solamente. Hubo una diferencia significativa entre éste y la concentración de 55.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$; entre el tratamiento de TX100 al 0.01% con respecto las tres concentraciones mayores de FCL, 55.7, 27.85 y 13.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$; y entre la concentración más alta de FCL 55.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con respecto a las cinco

concentraciones más bajas (3,48, 1.74, 0.87, 0.435 y 0.108 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Es interesante también que las cinco concentraciones antes mencionadas aumentaron su porcentaje de proliferación, mientras que el resto de los tratamientos de FCL aumentaron su porcentaje de inhibición celular.

Las células MCF-12 resultaron más afectadas por el TX100 al 1%, ya que mientras que las MCF-7 lograron proliferar a la hora de incubación, éstas seguían inhibiéndose. En el caso de las MCF-12, todas las concentraciones del tratamiento con FCL, excepto las de 0.108 y 0.435 $\mu\text{g}/\text{mL}$, inhibieron su proliferación celular. Resultaron significativamente diferentes el tratamiento con TX100 al 0.1% con la concentración de 55.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FCL.

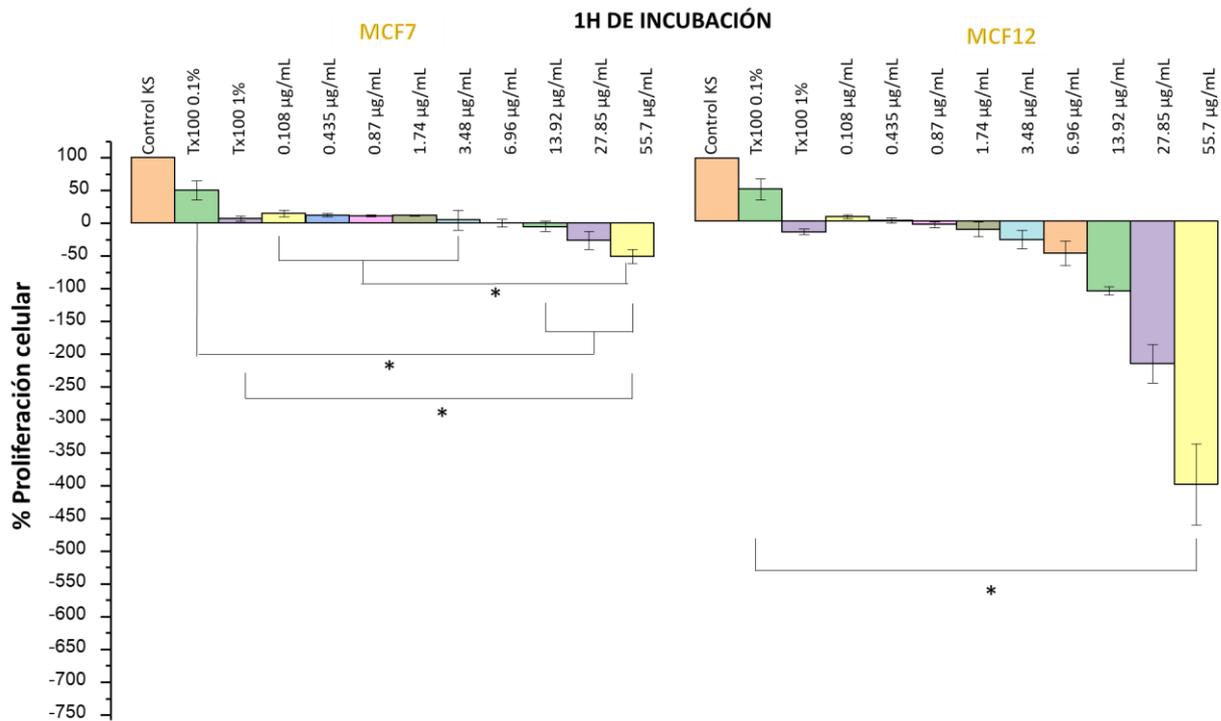


Figura 17. Porcentaje de proliferación celular a la hora de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL.

* diferencia de medias es significativa al nivel $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

A las 6 horas de incubación hay una notable diferencia en el porcentaje de inhibición entre ambas líneas celulares. En el caso de las MCF-7 los tratamientos de Tx100 siguen siendo significativamente diferentes con los tratamientos de FCL; el caso de TX100 al 0.01% con las concentraciones de 1.74 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a la de 55.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$; el TX100 1% con las concentraciones de 6.96 a 55.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En cuanto a la concentración mayor de 55.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue significativamente diferente

a las más bajas, desde 0.108 a 1.74 $\mu\text{g/mL}$. En ambos casos, tanto en los tratamientos que tendían a la proliferación como a la inhibición, los porcentajes aumentaron.

Para la línea celular MCF-12 los valores de porcentaje de inhibición fueron notablemente mayor. El tratamiento de TX100 al 1% pasó de inhibir a las células a proliferar. La concentración de 55.7 $\mu\text{g/mL}$ fue significativamente diferente a los dos tratamientos de TX100 y a la concentración de 0.108 $\mu\text{g/mL}$ de FCL, que son los tratamientos con más porcentaje de proliferación celular. Desde la concentración de 0.87 $\mu\text{g/mL}$ las células están inhibiendo la proliferación, mientras que en las células MCF-7, se observa este efecto hasta la concentración de 3.48 $\mu\text{g/mL}$.

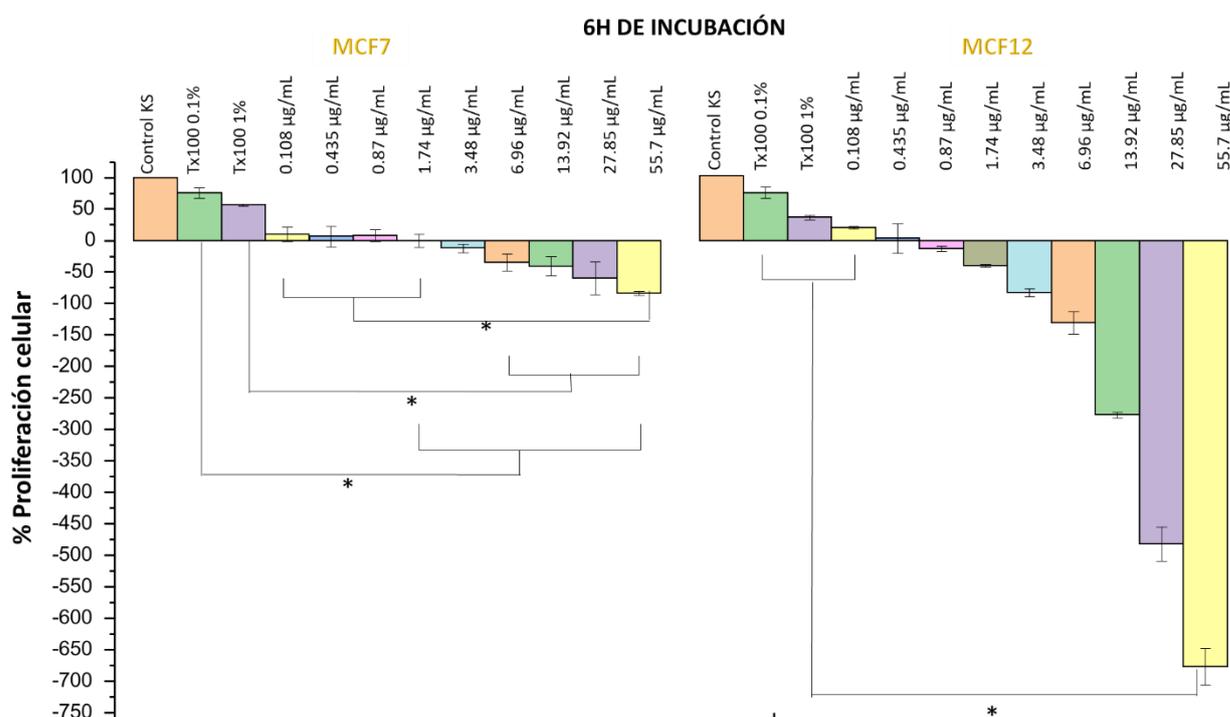


Figura 18. Porcentaje de proliferación celular a las 6 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL

* diferencia de medias es significativa al nivel $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

De las 6 a las 12 horas de incubación con los tratamientos las MCF-7 no muestran un gran cambio. El tratamiento de TX100 al 0.1%, con el porcentaje de proliferación más alto, mostró diferencias significativas con respecto a todos las concentraciones del tratamiento con FCL; el TX100 al 1% mostró diferencia con las cinco concentraciones más altas de FCL (55.7, 27.85, 13.92, 6.96 y 3.48

$\mu\text{g/mL}$); y la concentración de $55.7 \mu\text{g/mL}$ resultó con diferencia significativa ante las tres concentraciones más bajas de FCL (0.108 , 0.435 y $0.87 \mu\text{g/mL}$)

En las MCF-12 ya todas las concentraciones del tratamiento con FCL muestran una inhibición celular. También se comienza a observar una reducción en el porcentaje de inhibición a partir de la concentración de $3.48 \mu\text{g/mL}$ hasta la de $55.7 \mu\text{g/mL}$ con respecto a las 6 horas. Tanto la concentración de $55.7 \mu\text{g/mL}$ como la de $27.85 \mu\text{g/mL}$ resultaron ser significativamente diferentes a los dos tratamientos con TX100 y a las tres concentraciones más bajas con FCL (0.108 , 0.435 y $0.87 \mu\text{g/mL}$).

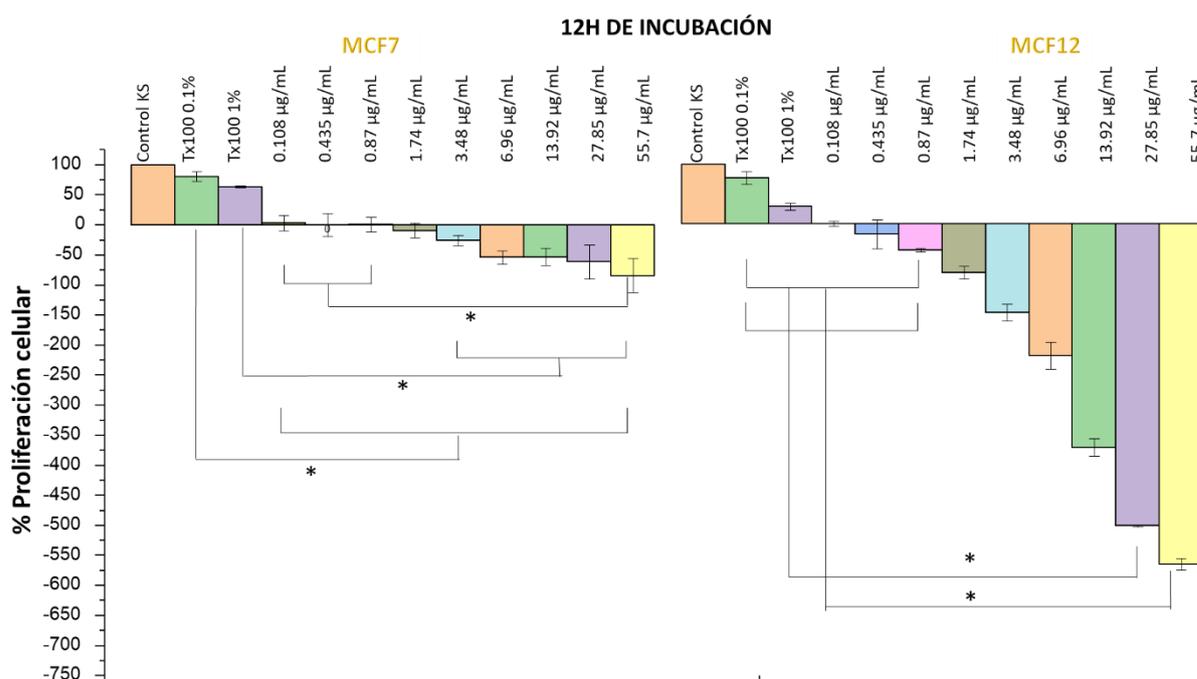


Figura 19. Porcentaje de proliferación celular a las 12 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL

* diferencia de medias es significativa al nivel $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

A las 24 h de incubación las células MCF-7 de las concentraciones del tratamiento con FCL están inhibiendo la proliferación, a este punto, las concentraciones bajas con mayor rapidez que las concentraciones altas. Ambos tratamientos con TX100 fueron significativamente diferentes a los tratamientos con la FCL.

En el caso de las MCF-12 igualmente se observa un aumento del porcentaje de inhibición desde la concentración de $0.108 \mu\text{g/mL}$ a la $13.92 \mu\text{g/mL}$, sin embargo,

el caso contrario ocurrió en las concentraciones de 27.85 y 55.7 $\mu\text{g/mL}$ con una reducción del porcentaje de inhibición. Los tratamientos con TX100 tuvieron una diferencia significativa con las concentraciones de 3.48, 6.96, 13.92, 27.85 y 55.7 $\mu\text{g/mL}$; las dos concentraciones más elevadas, 55.7 y 27.85 $\mu\text{g/mL}$, fueron significativamente diferente a las cinco concentraciones más bajas (0.108, 0.435, 0.87, 1.47 y 3.48 $\mu\text{g/mL}$); La concentración 6.96 $\mu\text{g/mL}$ fue diferente significativamente con las tres concentraciones más bajas (0.108, 0.87 y 0.435 $\mu\text{g/mL}$) y la concentración 3.48 con las cuatro más bajas (0.108, 0.435, 0.87 y 1.74 $\mu\text{g/mL}$).

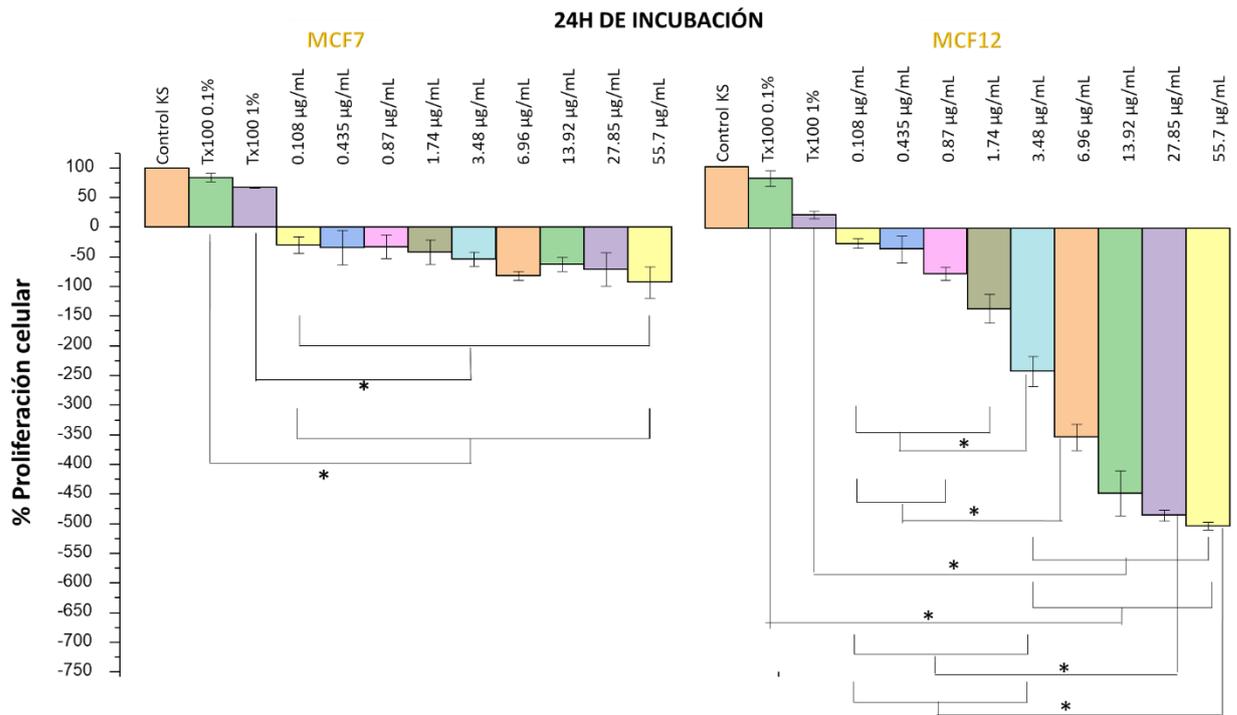


Figura 20. Porcentaje de proliferación celular a las 12 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL

* diferencia de medias es significativa al nivel $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

Después de 48 horas de incubación con los tratamientos, en la línea MCF-7 los porcentajes de inhibición de los tratamientos con FCL continúan aumentando, aunque las concentraciones bajas con más rapidez. El TX100 al 0.1% resultó significativamente diferente a todas las concentraciones del tratamiento con FCL; el TX100 al 1% a todas excepto la concentración más baja de 0.108 $\mu\text{g/mL}$.

Para las MCF-12 no es tanto el aumento del porcentaje de inhibición en las bajas concentraciones, sino la disminución del porcentaje de las concentraciones de

6.96, 13.92, 27.85 y 55.7 $\mu\text{g/mL}$. Estas cuatro concentraciones más altas fueron significativamente diferentes a las cuatro concentraciones más bajas de 0.108, 0.435, 0.87 y 1.74 $\mu\text{g/mL}$; el tratamiento de TX100 al 0.1% a las seis concentraciones más altas desde 1.74 $\mu\text{g/mL}$ a 55.7 $\mu\text{g/mL}$; el TX100 al 1% con las cinco concentraciones más altas desde 3.48 $\mu\text{g/mL}$ a 55.7 $\mu\text{g/mL}$; la concentración de 3.48 $\mu\text{g/mL}$ a las tres concentraciones más bajas de 0.108 $\mu\text{g/mL}$ a 0.87 $\mu\text{g/mL}$; y la concentración de 1.74 $\mu\text{g/mL}$ diferente significativamente a 0.108 $\mu\text{g/mL}$.

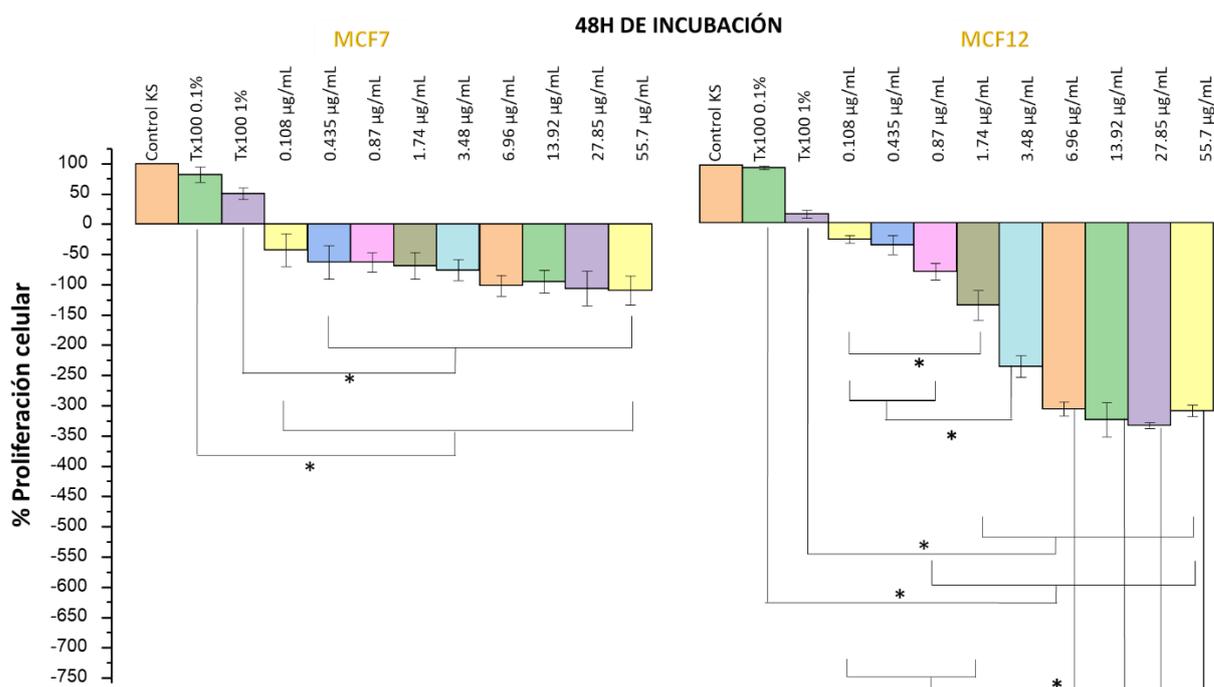


Figura 21. Porcentaje de proliferación celular a las 48 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL

* diferencia de medias es significativa al nivel $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

Finalmente la última medición, a las 72 horas en ambas líneas celulares los tratamientos con TX100 llegaron a su punto más bajo de proliferación, el cual comenzó su descenso a partir de las 12 h. Por el contrario, a partir de las 12 h los tratamientos con la FCL disminuyeron su porcentaje de inhibición, proponiendo una resistencia al tratamiento y una recuperación de la proliferación celular.

En las células MCF-7 hubo una diferencia significativa entre el tratamiento con TX100 al 0.1% con respecto a todas las concentraciones del tratamiento con FCL; mientras que el TX100 al 1% con las cuatro concentraciones más altas

(6.96, 13.92, 27.85 y 55.7 $\mu\text{g/mL}$). Igualmente en las células MCF-12 el tratamiento TX100 al 0.1% fue diferente significativamente con el tratamiento de la FCL; el TX100 al 1% con todas las concentraciones excepto las dos más bajas de 0.108 y 0.435 $\mu\text{g/mL}$; las cinco concentraciones más altas de la FCL (3.48 a 55.7 $\mu\text{g/mL}$) con las cuatro más bajas (0.108 a 1.74 $\mu\text{g/mL}$); y la concentración de 1.74 $\mu\text{g/mL}$ fue significativamente diferente a la concentración 0.108 $\mu\text{g/mL}$. En ambas líneas, las concentraciones del tratamiento con FCL tienden a igualar los porcentajes de inhibición.

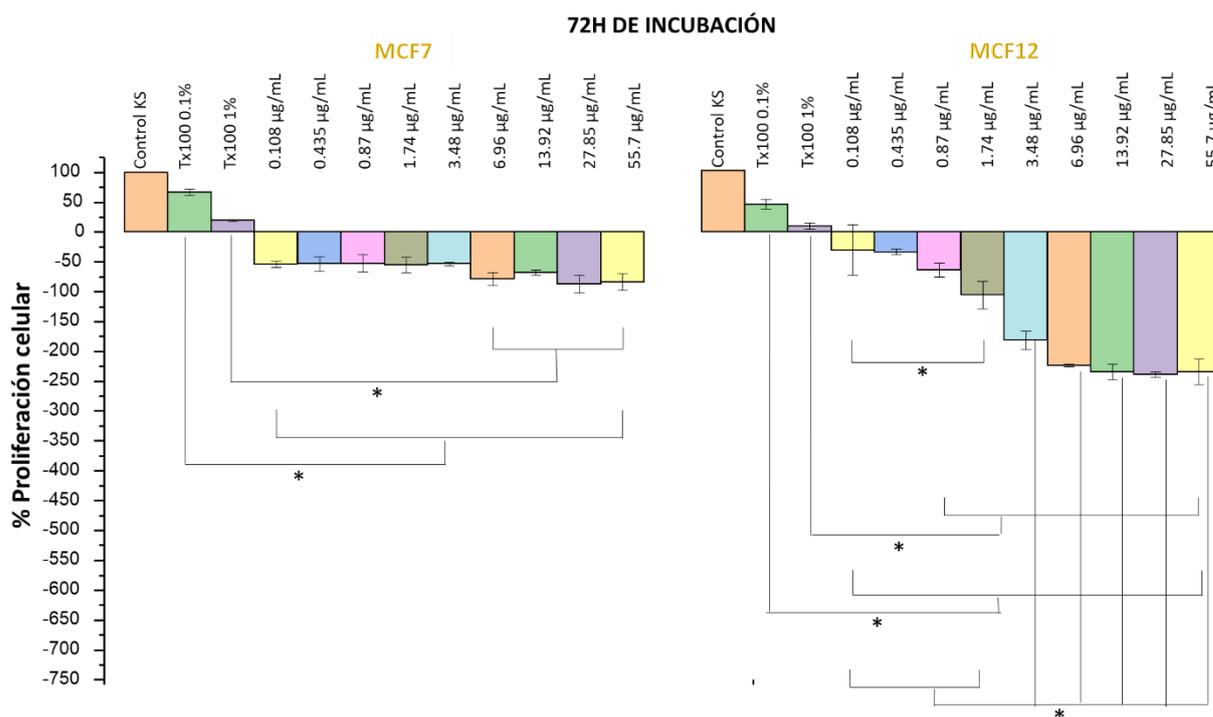


Figura 22. Porcentaje de proliferación celular a las 72 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL

* diferencia de medias es significativa al nivel $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

8.4.3 Medición cualitativa - Morfología celular

La morfología celular de las nueve concentraciones del tratamiento con la FCL se clasificó y simplificó en concentración baja, media y alta. Se puede observar de manera general en ambas líneas celulares que las células de las concentraciones bajas tienen más conservada la morfología de una célula viva, aunque no tan bien definida como las células control negativo; en la concentración media, algunas células se ven más alargadas que otras, sin embargo, ya no conservan morfología normal; en el caso de la concentración alta se observa una mayoría de células redondeadas.

En la tabla 7 se clasifican los tratamientos con su determinado porcentaje de circularidad y el porcentaje de viabilidad celular en base al porcentaje de viabilidad del control negativo a las 0 h en células MCF-7

Tabla 7. Morfología de células cancerosas de mama MCF7: su porcentaje de circularidad y porcentaje de viabilidad celular con respecto al control negativo.

MCF7		
Tratamiento	% Circularidad	%Viabilidad celular
Control (-) 0 h	6	100
Control (-) 72 h	49	54
Control KS 72	96	4
Tx100 0.1% 72 h	58	44
Tx100 1% 72 h	96	4
Concentración baja FCL 72 h	58	44
Concentración media FCL 72 h	97	3
Concentración alta FCL 72 h	98	2

Los resultados obtenidos nos indican un 54% de viabilidad celular, lo que significa que sólo por la variable tiempo, la viabilidad se redujo en un 46% aproximadamente. Esta variable estuvo presente en todos los tratamientos, y como es de esperarse, este porcentaje fue el mayor con respecto a todos los tratamientos. Sorprendentemente, el control KS tuvo un 4% de viabilidad celular, comparándose con el porcentaje de las concentraciones medias. Para el tratamiento con TX100 al 0.1% el porcentaje de viabilidad fue de 44%, casi igualándose con el control negativo a las 72 h, lo que significa que a esta concentración el TX100 no provocó gran daño. No sucedió lo mismo con la concentración de TX100 al 1%, ya que tuvo un 4% de viabilidad celular. En cuanto a las concentraciones de los tratamientos con FCL, la concentración baja tuvo un 44% de viabilidad celular, y a partir de la concentración media el porcentaje tuvo un importante decremento, llegando a 3% y 2% para la concentración más alta.

Podemos decir que para las células MCF-7, el daño fue similar para la concentración al 0.1% de TX100 y de la concentración baja con FCL. A su vez, para la concentración de 1% de TX100 con respecto a las concentraciones media y alta de FCL.

En la tabla 8 se resumen los resultados obtenidos para el caso de las células no transformadas.

Tabla 8. Morfología de células no transformadas de mama MCF12: su porcentaje de circularidad y porcentaje de viabilidad celular con respecto al control negativo.

MCF12		
Tratamiento	% Circularidad	% Viabilidad celular
Control (-) 0 h	26	100
Control (-) 72 h	83	22
Control KS 72	45	74
Tx100 0.1% 72 h	85	20
Tx100 1% 72 h	90	13
Concentración baja FCL 72 h	73	36
Concentración media FCL 72 h	86	18
Concentración alta FCL 72 h	90	13

En este caso, el porcentaje de viabilidad para el control negativo a las 72 h fue de solamente el 22%, sin embargo, para el control KS fue de 74%. En cuanto a los tratamientos con TX100, la diferencia de porcentajes no fue tan marcada como con en las células MCF-7, ya que el porcentaje de viabilidad celular con el TX100 al 0.1% fue de 20%, mientras que para el TX100 al 1% fue de 13%. En cuanto a los tratamientos con la FCL igualmente las diferencias no fueron tan marcadas; para la concentración más baja de FCL fue de 36% el porcentaje de viabilidad celular, para la concentración media fue de 18% y para la concentración alta de 13%.

Para las células MCF-12 resultó una situación opuesta en cuanto al control negativo y el control KS. También podemos relacionar el daño celular de los tratamientos con TX100 y las concentraciones media y alta con la FCL.

DISCUSIÓN

Existe un creciente entendimiento de la importancia de la naturaleza de la señalización de calcio en la determinación del destino de células cancerosas durante la progresión tumoral y tratamientos, convirtiéndolo en un blanco para estudiar múltiples procesos celulares. El cambio en la concentración de calcio citoplasmático durante proliferación, migración, estímulos de muerte, entre otros procesos provee de nuevas oportunidades para entender la señalización del calcio en modelos *in vitro* (Bassett, J. y cols, 2018).

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, son las primeras evidencias que la Fracción Concentrada de Lectina (FCL), son capaces de movilizar calcio en el citoplasma de células en cultivo. En los resultados que a continuación discutiremos, muestran de manera secuencial, como fueron generándose las evidencias que nos llevan a proponer un probable mecanismo de acción de la FCL, alternativo a los ya estudiados y que a su vez, soportan las evidencias previamente obtenidas que conllevan a la activación de la muerte celular programada.

En la figura 9, mostramos que la FCL que utilizamos en nuestro estudio, tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos del tipo A, por lo que fue posible reproducir los experimentos realizados por otros integrantes del Laboratorio de Biología Celular de la FCN. En dicha figura, evidenciamos control sin FCL, la concentración mínima y máxima con poder aglutinante.

Para este estudio era importante determinar los rangos de concentración en los cuales la FCL tiene actividad biológica como la antes reportada, y poder establecer el rango de concentraciones en las cuales trabajaríamos el resto de los experimentos. Para la actividad biológica de FCL, decidimos que era necesario evidenciar si la FCL, era capaz de movilizar calcio en el citoplasma celular. Para ello hicimos uso de dos líneas celulares: MCF-12 y MCF-7, las cuales son de epitelio de mama, la primera ha sido considerada por varios estudios como una línea control y la segunda, como una línea transformada a cancerígena (ATCC).

Dinámica de calcio

Se ha podido estandarizar una técnica en donde medimos el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ ante el tratamiento con la FCL utilizar sondas fluorescentes que pudieran indicar cambios cualitativos en la concentración de calcio citoplasmático. En la Figura 10, mostramos el cambio relativo de la fluorescencia en función del tiempo determinado en la línea celular MCF-12. En esta figura vemos que existe un efecto dosis dependiente de FCL en la movilización de calcio en el citoplasma. Cabe resaltar, que las concentraciones que utilizamos se encuentran por debajo de las ya reportadas (García-Gasca. y cols., 2012; Ferriz-Martínez, 2014). Asimismo, podemos apreciar que el incremento de calcio como su decremento, bajo el efecto de la dosis de FCL, tiene diferentes tiempos de activación y de decaimiento, lo cual puede sugerir que el calcio movilizado pudiera provenir tanto del espacio extracelular como del intracelular, mezclándose los mecanismos de la probable entrada capacitativa, como los mecanismos de liberación (tabla 3). Se sabe que la FCL reconoce carbohidratos a través del único sitio de reconocimiento a oligosacáridos (Cruz, P. y col., 2005), uniéndose a carbohidratos de membrana plasmática (Castillo-Villanueva A. y Abdullaev F., 2005) pero también es posible que a proteínas, canales o a los propios fosfolípidos, provocando una desestabilización e iniciando procesos de señalización como la apoptosis (Ferriz-Martínez y col., 2015; Moreno, U., 2017; Deepa, M. y col., 2012). Este efecto dosis-dependiente del aumento de la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ sugiere que la constante de disociación (K_d) de la FCL hacia el sitio de unión de ésta con algún componente de la membrana celular igualmente es dosis-dependiente.

En diferentes estudios se han medido marcadores de muerte celular en distintas líneas celulares ante el tratamiento con FCL, a las de 4 h de la muerte celular se detectó la sobreexpresión de caspasa 3 y 9, Bax, inhibición de Bcl-2, entre otros, lo cual sugiere una muerte por la vía apoptótica (Ferriz-Martínez y col., 2015; Moreno, U., 2017). La mitocondria y el retículo endoplásmico, que es el mayor reservorio de calcio celular, tienen una íntima comunicación en cuanto a señales por calcio, como por ejemplo señales de muerte celular relacionadas a un mal manejo del calcio mitocondrial, generándose co-factores de caspasas y pérdida

de la permeabilidad (Giorgi C. y col., 2015). Las ceramidas producidas por la lisis de esfingolípidos de membrana plasmática también pueden inducir daño en la mitocondria, provocando una sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y subsecuentemente la activación de vías cascada debajo de muerte celular mitocondrial mediadas por caspasas, activación de calpains y/o liberación de citocromo C. Se ha reportado que la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial inducida por ceramidas en células HeLa y PC12 resulta de la transferencia directa de Ca^{2+} desde el RE hacia la mitocondria vía microdominios MAM's (Bassett J. y col, 2018). Por lo tanto, una muerte celular relacionada con una sobrecarga de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial ocasionada por la FCL en los primeros minutos de tratamiento pudiera culminar en la muerte por la vía apoptótica a las 4 horas.

Sugerimos que el incremento de la fluorescencia en el citoplasma es en respuesta a diferentes concentraciones de FCL (Figura 11), determinando su constante media de activación de la señal; valor de τ ON, en un rango de 4.5 $\mu\text{g/ml}$, siendo este un valor muy por debajo a los 0.402 mg/mL reportados por Ferriz en células HT-29 (Ferriz-Martínez, 2014).

Por su parte, los mecanismo de apagamiento de la señal (mecanismo τ OFF), que señalan el inicio de la homeostásis de calcio, podemos apreciar que a bajas concentraciones, presentan varios componentes y que pudieran estar involucrados con dos mecanismos: 1) que permitan la salida del calcio al medio extracelular a través de las membranas plasmáticas y 2) la entrada de calcio a reservorios intracelulares como el RE (Berridge M. y col., 2003).

Al tener estas evidencia, era necesario determinar la fuente principal del calcio en el citoplasma, para ello fue necesario preparar experimentos en los cuales pudiéramos eliminar el calcio extracelular; agregando un quelante (atrapadores) de calcio como el EGTA, y así determinar si la FCL era capaz de movilizar calcio de reservorios intracelulares. En la figura 12, mostramos la dinámica de calcio en ambas condiciones, 2mM y cero Ca^{2+} . Las células MCF-12 pueden movilizar calcio en el citoplasma con cinéticas diferentes en presencia de dos concentraciones de FCL. Con calcio extracelular, se observa que las células tienen mayor cantidad de calcio en citoplasma y al momento que lo movilizan, lo hacen en un lapso de tiempo más corto que sin calcio extracelular. Estos

resultados son a su vez, la primera evidencia de que FCL puede movilizar calcio de reservorios intracelulares y abre una nueva posibilidad de estudiar a la FCL como un péptido con la capacidad de interactuar con glicoproteínas y/o glicolípidos desestabilizando las membranas o a través de la producción de segundos mensajeros como InsP_3 o el mismo Ca^{2+} (Berridge M. y col., 2003); produciendo la salida de éste de reservorios intracelulares, siendo el RE el más propicio a liberar calcio debido a que es el organelo con mayor reservorio de Ca^{2+} y por la cercanía que tiene con la membrana plasmática.

Si analizamos el tiempo del incremento de calcio citoplasmático (figura 13) indicado por diferentes concentraciones de FCL en células MCF-12, vemos que al normalizar la respuesta, a 27.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FCL vemos que el tiempo medio de activación (τ_{ON}) con y sin calcio extracelular es de 0.8 y 2.0 minutos respectivamente y para 1.74 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FCL es de 1.0 y 1.4 minutos respectivamente. Este dato es contundente en la demostración de que FCL es capaz de movilizar calcio de reservorios intracelulares aún en ausencia de calcio extracelular y lo hace de manera dosis dependiente.

Hasta aquí, hemos mostrado que dosis crecientes de FCL, son capaz de inducir movilización de calcio en el citoplasma de células MCF-12. Por lo que es necesario analizar el efecto que pudiera tener en las MCF-7. Datos preliminares, indican que la FCL (Figura 14) también es capaz de inducir movilización de calcio en células transformadas y que estas son menos sensibles a la FCL con respecto a las MCF-12. Los tiempos medios de activación de la respuesta (τ_{ON}) son menores para MCF-7 que para las MCF-12 (tabla 4). Lo cual sugiere que las células transformadas son menos sensibles a la FCL. Es claro que es necesario explorar a profundidad los mecanismos que las hacen diferentes entre sí.

La ATPasa SERCa^{2+} juega un papel muy importante en los mecanismos OFF y homeostasis del $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Se sabe que las células MCF-12 tienen SERCa^{2+1} y SERCa^{2+2} , y que esta última se encuentra de forma trunca, por lo que no es tan eficiente en la recaptura del calcio. Las células MCF-7 tienen solamente la ATPasa de recaptura de calcio SERCa^{2+2} trunca, lo que provoca una reducción en la eficiencia para mantener la homeostasis celular de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Morales-Tlalpan,

datos no publicados). Es por esto que sería interesante reproducir los experimentos con FCL, medir la expresión de estas ATPasas en las células de mama y así poder relacionarlo a los mecanismos OFF diferenciales entre ambas líneas celulares.

En los experimentos de dinámica de calcio de la línea celular MCF-12, los mecanismos ON y OFF estaban bien definidos por la alza de fluorescencia desde concentraciones de 0.108 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo, en las MCF-7 a esta concentración no hubo ninguna respuesta, sino hasta la concentración de 27.8 $\mu\text{g/mL}$. Una explicación a estas variaciones tan heterogéneas en el tiempo de incremento de la concentración del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ entre ambas líneas celulares puede ser la diferencia en los niveles de ATP mitocondrial (Bassett J. y cols, 2018), la activación de diferentes vías o a una resistencia al tratamiento mayor de las células MCF-7 ante la FCL.

Viabilidad celular

Para fines de este trabajo decidimos realizar estudios cuantitativos de proliferación celular, usando la técnica de Alamar Blue (AB). Básicamente, este ensayo consiste en la oxidación de resaruzina un compuesto que atraviesa la membrana plasmática y que no es toxico en las células. La resaruzina es de color azul en su estado oxidado y no fluorescente, en el citoplasma es convertida a resofurina de color rosa porque se reduce, y emite fluorescencia. El ambiente reductor de las células vivas es monitoreado debido a que el indicador acepta electrones. El cambio en la coloración se debe a los electrones provenientes de NADPH, FADH, FMNH, NADH, citocromos, reductasas mitocondriales, diaforasas, y otras enzimas mitocondriales. La reducción de alamar blue indica el deterioro del metabolismo, la interrupción de la cadena de transporte de e^- , y a la disfunción mitocondrial (Rampersad, S., 2012) (tabla 5).

En este ensayo, realizamos una curva dosis respuesta para determinar la viabilidad celular, usando diferentes dosis de FCL en ambos tipos celulares (Figura 16-22). Como control negativo de proliferación utilizamos Tritón X-100 (TX-100) a dos concentraciones (0.1 y 1 %), éste, es un agente capaz de desestabilizar la membrana disminuyendo la viabilidad celular. Como es de

esperarse, TX-100 en ambos tipos celulares provocó la disminución de la actividad metabólica desde el $t= 10$ min, mismo que se mantuvo durante todo el seguimiento de la proliferación celular determinado a diferentes tiempos. Sin embargo, las respuestas en ambos tipos celulares fueron diferenciales. Con respecto a la evolución de la dosis-respuesta a la FCL en ambos tipos celulares, las MCF-12 presentaron una disminución en la actividad metabólica más prominente para todas las concentraciones de FCL analizadas, misma que se mantuvo durante todos los experimentos. En contraste, las MCF-7 disminuyeron lentamente la actividad metabólica, sin embargo, todas las concentraciones probadas lograron disminuir esta actividad al mismo nivel. Este comportamiento de las células transformadas podría estar ligado a un alza moderada y sostenida de calcio intracelular, lo que provocaría la activación de señales de proliferación celular y hasta la muerte celular (Berridge M. y col., 2003).

Se sabe que el tiempo de incubación es un determinante para el cambio o intensidad de color, ya que en tiempos muy largos el cambio de color a rosa fluorescente puede deberse a una alta tasa de proliferación y no al proceso óxido-reducción celular. Un indicador de que el tiempo de incubación fue muy prolongado es el blanqueo del color rosa del estado reducido del alamar blue (Rampersad S., 2012), sin embargo, dicho fenómeno no ocurrió en este ensayo, por lo que los resultados obtenidos fueron de tiempos a los cuales el reactivo seguía funcionando.

Estos resultados difieren con los obtenidos por López en el 2007, quien demostró que la FCL reconoce células cancerosas de colon CaCo-2, provocando su muerte e inhibiendo su proliferación en función de la concentración, y que las células de colon no transformadas IEC-18 fueron menos sensibles necesitando el triple de la concentración para provocar el mismo efecto que en las CaCo-2 (López M., 2007).

Morfología celular

Las ceramidas son molécula base de los esfingolípidos, muy abundantes en la bicapa lipídica de las membranas celulares, y que hoy en día se conocen no solamente por su función estructural sino por ser moléculas de reconocimiento o

señalización celular como regulación de la diferenciación celular, proliferación celular y de la apoptosis. Es un participante importante en la programación de la muerte celular inducido por el factor de necrosis tumoral (TNF)- α y el ligando Fas (Cuvillier, O. y cols, 1996). Bassett y colaboradores en su estudio con células cancerosas de mama MDA-MB-231 encontraron que al tratarlas con ceramida (100 μ M) se inducen un cambio rápido en la morfología celular, de su forma típica a una morfología celular más redondeada. Este cambio en la morfología ocurrió dentro de los primeros 5 minutos; a las 2 h las células sufrieron hinchazón seguida de la ruptura de la membrana plasmática; a las 48 h todas las células sugerían una morfología de muerte por la formación de invaginaciones celulares y/o pérdida de la integridad de la membrana plasmática. Por lo tanto, no se asoció el cambio de la morfología celular con incrementos prolongados de $[Ca^{2+}]_i$. (Bassett J. y cols, 2018)

En nuestro modelo experimental el registro de imágenes se realizó solamente a la hora 0 antes de los tratamientos con la FCL y a las 72 h de incubación con los tratamientos, por lo que no fue posible observar un cambio progresivo como lo hizo Bassett y colaboradores, sin embargo, los resultados obtenidos fueron interesantes. Como era de esperarse, a las 72 h al menos más de la mitad de las células sugerían una morfología de muerte en ambas líneas celulares, y mostraron un porcentaje de viabilidad celular diferencial. La línea MCF-7 resultó con porcentajes de viabilidad celular más bajos con respecto a las MCF-12. Por lo tanto, se sugiere que las MCF-7 hayan sufrido un mayor daño celular a tiempos largos, aunque no sean tan sensibles a tiempos cortos como las MCF-12.

CONCLUSIONES

Se logró establecer un método reproducible para medir la dinámica de calcio en células de mama MCF-7 y MCF-12 en tratamiento con la FCL. La FCL libera Ca^{2+} hacia el medio intracelular aumentando su concentración de manera dosis dependiente. Las células MCF-12 resultaron más sensibles a la FCL en una ventana de tiempo de 6 minutos con respecto a las MCF-7. La τ ON fue igualmente dosis dependiente y en condiciones de 0 Ca^{2+} extracelular, resultó en un retardo de su activación.

Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos de la viabilidad celular, siendo las células MCF-12 más sensibles a la FCL a través de la producción de ROS en los primeros minutos y horas de tratamiento. Las células MCF-7 tuvieron una respuesta menor y más lenta, pero similar en todas las concentraciones de FCL y sostenida a tiempos prolongados.

Los resultados obtenidos sugieren que la FCL provoca la movilización de calcio y la producción de ROS de forma diferencial en células transformadas MCF-7 con respecto a células no transformadas MCF-12 a través de la activación de mecanismos moleculares diferenciales no descritos hasta ahora.

LITERATURA CITADA

AlamarBlue™ Cell Viability Reagent, ThermoFisher

AlamarBlue® Cell Viability Assay Protocol, ThermoFisher

Ángeles-Zaragoza M. 2010. Caracterización del efecto citotóxico de un concentrado de lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre células de cáncer de colon (HT-29). Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma de Querétaro.

Ashkenazi, A., & Salvesen, G. (2014). Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 337-356.

Barondes S H (1981) Lectins: Their multiple endogenous cellular functions. *Ann. Rev Biochem* 50: 207-231.

Bassett, J. J., Bong, A. H., Janke, E. K., Robitaille, M., Roberts-Thomson, S. J., Peters, A. A., & Monteith, G. R. (2018). Assessment of cytosolic free calcium changes during ceramide-induced cell death in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the calcium sensor GCaMP6m. *Cell calcium*, 72, 39-50.

Baumgartner, H. K., Gerasimenko, J. V., Thorne, C., Ferdek, P., Pozzan, T., Tepikin, A. V., ... & Gerasimenko, O. V. (2009). Calcium elevation in mitochondria is the main Ca²⁺ requirement for mPTP opening. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M109.

Bernardi, P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiological reviews*, 79(4), 1127-1155.

Berridge, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361(6410), 315.

Berridge, M. J. (1995). Capacitative calcium entry. *Biochemical Journal*, 312(Pt 1), 1.

Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 1(1), 11.

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

Blaustein, M. P., & Lederer, W. J. (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiological reviews*, 79(3), 763-854.

Bonora, M., & Pinton, P. (2014). The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death. *Frontiers in oncology*, 4, 302.

Booth, D. M., Enyedi, B., Geiszt, M., Várnai, P., & Hajnóczky, G. (2016). Redox nanodomains are induced by and control calcium signaling at the ER-mitochondrial interface. *Molecular cell*, 63(2), 240-248.

Bootman, M. D., & Lipp, P. (1999). Calcium signalling: Ringing changes to the 'bell-shaped curve'. *Current biology*, 9(23), R876-R878.

Boyd, W. C. (1954). Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, 119, 419.

Bradford, M. M. (1976). Método rápido y sensible para la cuantificación de cantidades de microgramos de proteína utilizando el principio de la proteína de unión a colorante. 248-254.

Bravo, R., Vicencio, J. M., Parra, V., Troncoso, R., Munoz, J. P., Bui, M., ... & Iglewski, M. (2011). Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *Journal of cell science*, jcs-080762.

Buonanno, A., & Fields, R. D. (1999). Gene regulation by patterned electrical activity during neural and skeletal muscle development. *Current opinion in neurobiology*, 9(1), 110-120.

Castillo-Villanueva, A., & Abdullaev, F. (2005). Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Revista de investigación clínica*, 57(1), 55-64.

Chami, M., Prandini, A., Campanella, M., Pinton, P., Szabadkai, G., Reed, J. C., & Rizzuto, R. (2004). Bcl-2 and Bax exert opposing effects on Ca²⁺ signaling, which do not depend on their putative pore-forming region. *Journal of Biological Chemistry*, 279(52), 54581-54589.

Clapham, D. E. (1995). Calcium signaling. *Cell*, 80(2), 259-268.

Collins, T. J., Peter, L. I. P. P., Berridge, M. J., Wenhong, L. I., & Bootman, M. D. (2000). Inositol 1, 4, 5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release is inhibited by mitochondrial depolarization. *Biochemical Journal*, 347(2), 593-600.

Cruz, P. H., Campos, E. P., Martínez, L. M., Ortiz, B., & Martínez, G. (2005). Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *Revista de Educación Bioquímica*, 24(1), 21-27.

Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, J. S., & Spiegel, S. (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 381(6585), 800-803. doi:10.1038/381800a0

Danese, A., Patergnani, S., Bonora, M., Wieckowski, M. R., Previati, M., Giorgi, C., & Pinton, P. (2017). Calcium regulates cell death in cancer: roles of the mitochondria and mitochondria-associated membranes (MAMs). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*.

De Pinto, V., & Palmieri, F. (1992). Transmembrane arrangement of mitochondrial porin or voltage-dependent anion channel (VDAC). *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 24(1), 21-26.

Debouck DG. 1994. *Phaseolus acutifolius*. Plant production and protection series. 26: 47-62. <http://www.hort.purdue.edu/newcorp/1492/beans.html>

Deepa, M., Sureshkumar, T., Satheeshkumar, P. K., & Priya, S. (2012). Purified mulberry leaf lectin (MLL) induces apoptosis and cell cycle arrest in human breast cancer and colon cancer cells. *Chemico-biological interactions*, 200(1), 38-44

Dolmetsch, R. E., Xu, K., & Lewis, R. S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*, 392(6679), 933.

Drago, I., Pizzo, P., & Pozzan, T. (2011). After half a century mitochondrial calcium in- and efflux machineries reveal themselves. *The EMBO Journal*, 30(20), 4119-4125.

Ellis HM, Horvitz HR. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44(6):817–29

Ferrari, M. B., Ribbeck, K., Hagler, D. J., & Spitzer, N. C. (1998). A calcium signaling cascade essential for myosin thick filament assembly in *Xenopus* myocytes. *The Journal of cell biology*, 141(6), 1349-1356.

Ferriz-Martínez R. 2014. Caracterización del efecto citotóxico de un concentrado de lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre cáncer de colon. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónomas de Querétaro.

Ferriz-Martinez R, Garcia-Garcia K, Torres-Arteaga I, Rodriguez-Mendez AJ, Guerrero-Carrillo MJ, Moreno-Celis U, Angeles-Zaragoza MV, Blanco-Labra A, Gallegos-Corona MA, Robles-Alvarez JP, Mendiola-Olaya E, Andrade-Montemayor HM, Garcia OP, Garcia-Gasca T. 2015. Tolerability assessment of a lectin fraction from Tepary bean seeds (*Phaseolus acutifolius*) orally administered to rats. *Toxicology Reports*. 2:63-69.

Fleckenstein, A., Janke, J., Döring, H. J., & Leder, O. (1974). Myocardial fiber necrosis due to intracellular Ca overload—a new principle in cardiac pathophysiology. *Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism*, 4, 563-580.

Fu, L. L., Zhou, C. C., Yao, S., Yu, J. Y., Liu, B., & Bao, J. K. (2011). Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(10), 1442-1449.

Gallily R, Vray B, Stain Y y N Sharon. (1984). Wheat germ agglutinin potentiate uptake of bacteria by murine peritoneal macrophages. *Immunology* 52: 679-686

García-Gasca, T., García-Cruz, M., Hernandez-Rivera, E., López-Matínez, J., Castaneda-Cuevas, A. L., Yllescas-Gasca, L., & Blanco-Labra, A. (2012). Effects of Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) protease inhibitor and semipure lectin fractions on cancer cells. *Nutrition and cancer*, 64(8), 1269-1278.

Giacomello, M., & Pellegrini, L. (2016). The coming of age of the mitochondria–ER contact: a matter of thickness. *Cell death and differentiation*, 23(9), 1417.

Giorgi, C., Baldassari, F., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Marchi, S., ... & Wieckowski, M. R. (2012). Mitochondrial Ca²⁺ and apoptosis. *Cell calcium*, 52(1), 36-43.

Giorgi, C., Baldassari, F., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Marchi, S., ... & Wieckowski, M. R. (2012). Mitochondrial Ca²⁺ and apoptosis. *Cell calcium*, 52(1), 36-43.

Giorgi, C., Missiroli, S., Patergnani, S., Duszyński, J., Wieckowski, M. R., & Pinton, P. (2015). Mitochondria-associated membranes: composition, molecular mechanisms, and physiopathological implications. *Antioxidants & redox signaling*, 22(12), 995-1019.

Green, D. R., & Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305(5684), 626-629.

Gurtovenko, A. A., & Vattulainen, I. (2007). Ion leakage through transient water pores in protein-free lipid membranes driven by transmembrane ionic charge imbalance. *Biophysical journal*, 92(6), 1878-1890

Hajnóczky, G., Robb-Gaspers, L. D., Seitz, M. B., & Thomas, A. P. (1995). Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell*, 82(3), 415-424.

Harr, M. W., Rong, Y., Bootman, M. D., Roderick, H. L., & Distelhorst, C. W. (2009). Glucocorticoid-mediated inhibition of Lck modulates the pattern of T cell receptor-induced calcium signals by down-regulating inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 284(46), 31860-31871.

Haupt, S., Raghu, D., & Haupt, Y. (2015). p53 calls upon CIA (calcium induced apoptosis) to counter stress. *Frontiers in oncology*, 5, 57.

Hwang, M. S., Schwall, C. T., Pazarentzos, E., Datler, C., Alder, N. N., & Grimm, S. (2014). Mitochondrial Ca²⁺ influx targets cardiolipin to disintegrate respiratory chain complex II for cell death induction. *Cell death and differentiation*, 21(11), 1733.

Jaffé W. (1980). Hemagglutinins (lectins). In: Toxic constituents of plant foodstuffs. Academic Press. New York, N. Y. 73-102 pp.

Johansson, A. C., Appelqvist, H., Nilsson, C., Kågedal, K., Roberg, K., & Öllinger, K. (2010). Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis*, 15(5), 527-540.

Jouaville, L. S., Ichas, F., Holmuhamedov, E. L., Camacho, P., & Lechleiter, J. D. (1995). Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature*, 377(6548), 438-441.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26(4):239–57

Komuro, H., & Rakic, P. (1996). Intracellular Ca²⁺ fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron*, 17(2), 275-285.

Lajolo F, Genovese M. (2002). Nutricional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 50:6592-6598.

Leissring, M. A., Akbari, Y., Fanger, C. M., Cahalan, M. D., Mattson, M. P., & LaFerla, F. M. (2000). Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice. *The Journal of cell biology*, 149(4), 793-798.

López Martínez FJ. (2007). Efecto de la lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre la proliferación y sobrevivencia de células cancerígenas de colon. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Biología. Universidad Autónoma de Querétaro.

López-Sánchez, C., López-Martínez, F., Castañeda-Cuevas, A., Yllescas-Gasca, L., Ferriz-Martínez, R., Torres-Arteaga, I., & García-Gasca, T. (2009). Evaluación de la toxicidad in vitro e in vivo de lectinas de frijol Tépari. *CIENCIA@ UAQ*, 3(1), 3-13.

Mákela O (1957) Studies on hemmagglutinins of leguminoseae seeds. *Ann. Med. Exp Fenn Supl* 11: 1-156.

Marchi, S., & Pinton, P. (2014). The mitochondrial calcium uniporter complex: molecular components, structure and physiopathological implications. *The Journal of physiology*, 592(5), 829-839.

Marchi, S., & Pinton, P. (2016). Alterations of calcium homeostasis in cancer cells. *Current opinion in pharmacology*, 29, 1-6.

Marchi, S., Patergnani, S., Missiroli, S., Morciano, G., Rimessi, A., Wieckowski, M. R., & Pinton, P. (2017). Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell calcium*.

Marks A.R. (1997). Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death, *The American journal of physiology*, 272. H597-605.

Merrit E A, Sarfaty S, Vander Akker F, L'Hoir C, Martial J A y Hol W G J (1994) Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide. *Protein Science* 3: 166-175.

Mignen, O., & Shuttleworth, T. J. (2000). I ARC, a novel arachidonate-regulated, noncapacitative Ca²⁺ entry channel. *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), 9114-9119.

Mirkov, T. E., Wahlstrom, J. M., Hagiwara, K., Finardi-Filho, F., Kjemtrup, S., & Chrispeels, M. J. (1994). Evolutionary relationships among proteins in the phytohemagglutinin-arcelin- α -amylase inhibitor family of the common bean and its relatives. *Plant molecular biology*, 26(4), 1103-1113.

Nicolson, G. L. (2016). fluid-mosaic cell membrane structure: from cellular control and domains to extracellular vesicles.

Nicotera, P., & Orrenius, S. (1998). The role of calcium in apoptosis. *Cell calcium*, 23(2-3), 173-180.

Niggli, E. (1999). Localized intracellular calcium signaling in muscle: calcium sparks and calcium quarks. *Annual Review of Physiology*, 61(1), 311-335.

Nutt, L. K., Pataer, A., Pahler, J., Fang, B., Roth, J., McConkey, D. J., & Swisher, S. G. (2002). Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca²⁺ stores. *Journal of Biological Chemistry*, 277(11), 9219-9225.

Orrenius, S., Zhivotovsky, B., & Nicotera, P. (2003). Calcium: Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(7), 552.

Orrenius, S., Gogvadze, V., & Zhivotovsky, B. (2015). Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 460(1), 72-81.

Ozil, J. P., & Swann, K. (1995). Stimulation of repetitive calcium transients in mouse eggs. *The Journal of physiology*, 483(2), 331-346.

Pinton, P., Ferrari, D., Rapizzi, E., Di Virgilio, F., Pozzan, T., & Rizzuto, R. (2001). The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *The EMBO journal*, 20(11), 2690-2701.

Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., & Meldolesi, J. (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiological reviews*, 74(3), 595-636.

Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*, 12(9), 12347-12360.

Repnik, U., Česen, M. H., & Turk, B. (2014). Lysosomal membrane permeabilization in cell death: concepts and challenges. *Mitochondrion*, 19, 49-57.

Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., & Pozzan, T. (1993). Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*, 262(5134), 744-747.

Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F. S., Fogarty, K. E., Lifshitz, L. M., & Pozzan, T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science*, 280(5370), 1763-1766.

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.

Rudiger H y Rouge P (1998) Structure and Function of plant Lectin. *Carbohydr Eur* 23: 16-22.

Saldaña, C., Díaz-Muñoz, M., Antaramián, A., González-Gallardo, A., García-Solís, P., & Morales-Tlalpan, V. (2009). MCF-7 breast carcinoma cells express ryanodine receptor type 1: functional characterization and subcellular localization. *Molecular and cellular biochemistry*, 323(1-2), 39.

Sharon N (1984) Surface carbohydrates and surface lectins are recognition determinants in phagocytosis. *Immunol Today* 5: 1-5.

Sharon, N. (2008) Lectins: past, present and future, *Biochem. Soc. Trans.* 36 1457–1460.

Tang, F., Dent, E. W., & Kalil, K. (2003). Spontaneous calcium transients in developing cortical neurons regulate axon outgrowth. *Journal of Neuroscience*, 23(3), 927-936.

Thomas, D., Lipp, P., Tovey, S. C., Berridge, M. J., Li, W., Tsien, R. Y., & Bootman, M. D. (2000). Microscopic properties of elementary Ca²⁺ release sites in non-excitabile cells. *Current Biology*, 10(1), 8-15.

Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281(5381):1312–16

Torres-Arteaga I. (2010). Purificación y caracterización parcial de una lectina de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) con actividad citotóxica sobre células cancerígenas. Tesis para obtener el grado de Maestría en Nutrición Humana. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.

Tse, A., Tse, F. W., Almers, W., & Hille, B. (1993). Rhythmic exocytosis stimulated by GnRH-induced calcium oscillations in rat gonadotropes. *Science*, 260(5104), 82-84.

Turner RH, Liener IE. (1975). The use of glutaraldehyde-treated erythrocytes for assaying the agglutinating activity of lectins. *Analytical Biochemistry*. 68:651-653

Uhlén, P., Laestadius, Å., Jahnukainen, T., Söderblom, T., Bäckhed, F., Celsi, G., ... & Richter-Dahlfors, A. (2000). α -Haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces Ca^{2+} oscillations in renal epithelial cells. *Nature*, 405(6787), 694.

Wang P.T., Garcin P.O., Fu M., Masoudi M., St-Pierre P., Pante N., Nabi I.R. (2015). Distinct mechanisms controlling rough and smooth endoplasmic reticulum contacts with mitochondria, *J Cell Sci*, 128 (2015) 2759-2765.

Wasilewski, M., & Scorrano, L. (2009). The changing shape of mitochondrial apoptosis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(6), 287-294.

ANEXOS: FIGURAS SUPLEMENTARIAS

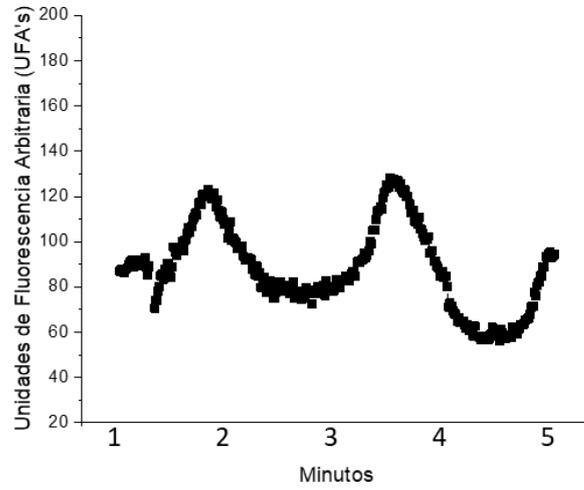


Figura suplementaria 1. Cambio de la fluorescencia con respecto al tiempo en células MCF12 tratadas con 0.217 µg/mL de FCL.

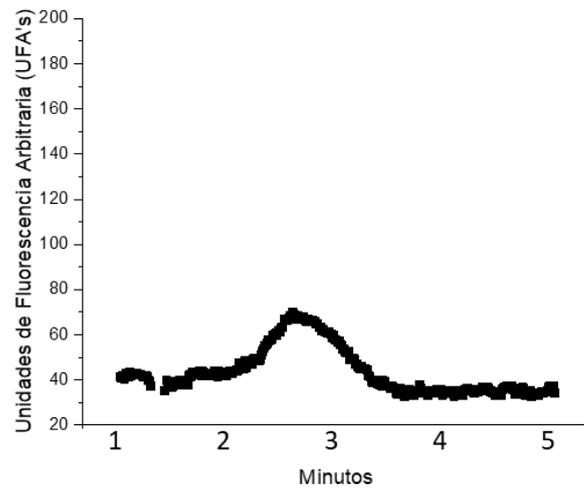


Figura suplementaria 2. Cambio de la fluorescencia con respecto al tiempo en células MCF12 tratadas con 0.435 µg/mL de FCL.

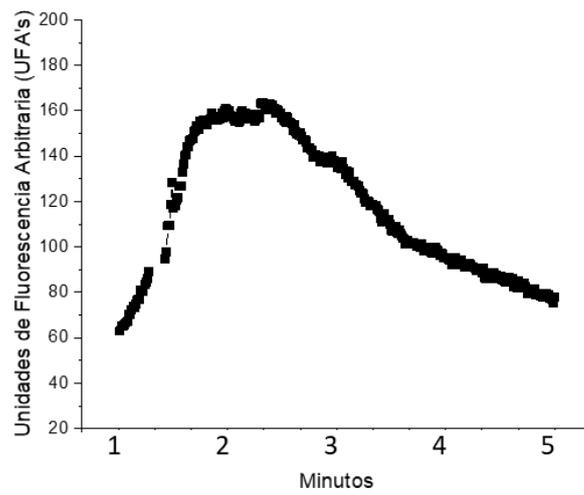


Figura suplementaria 3. Cambio de la fluorescencia con respecto al tiempo en células MCF12 tratadas con 0.87 µg/mL de FCL.

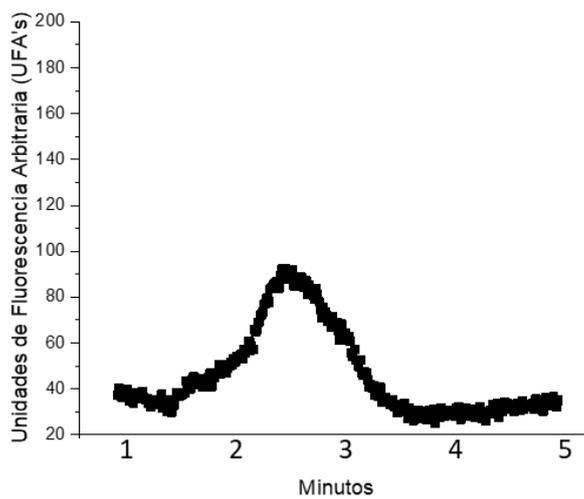


Figura suplementaria 4. Cambio de la fluorescencia con respecto al tiempo en células MCF12 tratadas con 3.48 µg/mL de FCL.

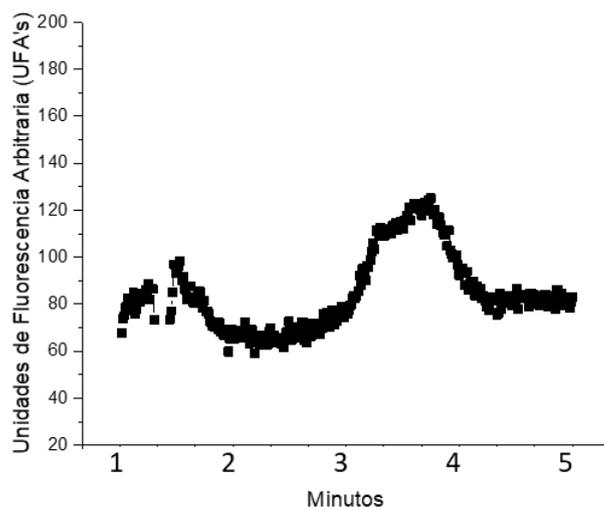


Figura suplementaria 5. Cambio de la fluorescencia con respecto al tiempo en células MCF12 tratadas con 6.96 µg/mL de FCL.

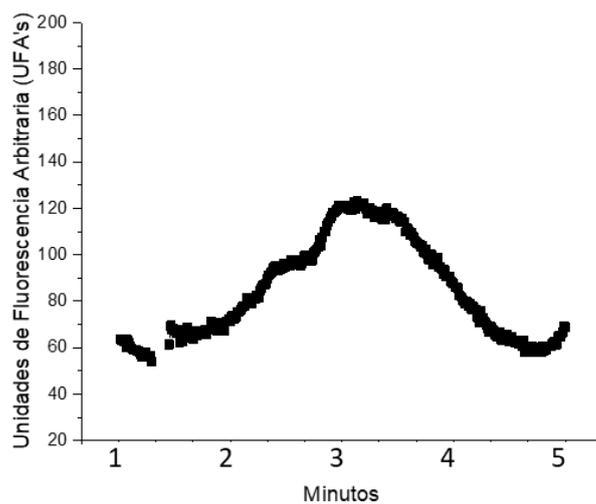


Figura suplementaria 6. Cambio de la fluorescencia con respecto al tiempo en células MCF12 tratadas con 13.92 µg/mL de FCL.

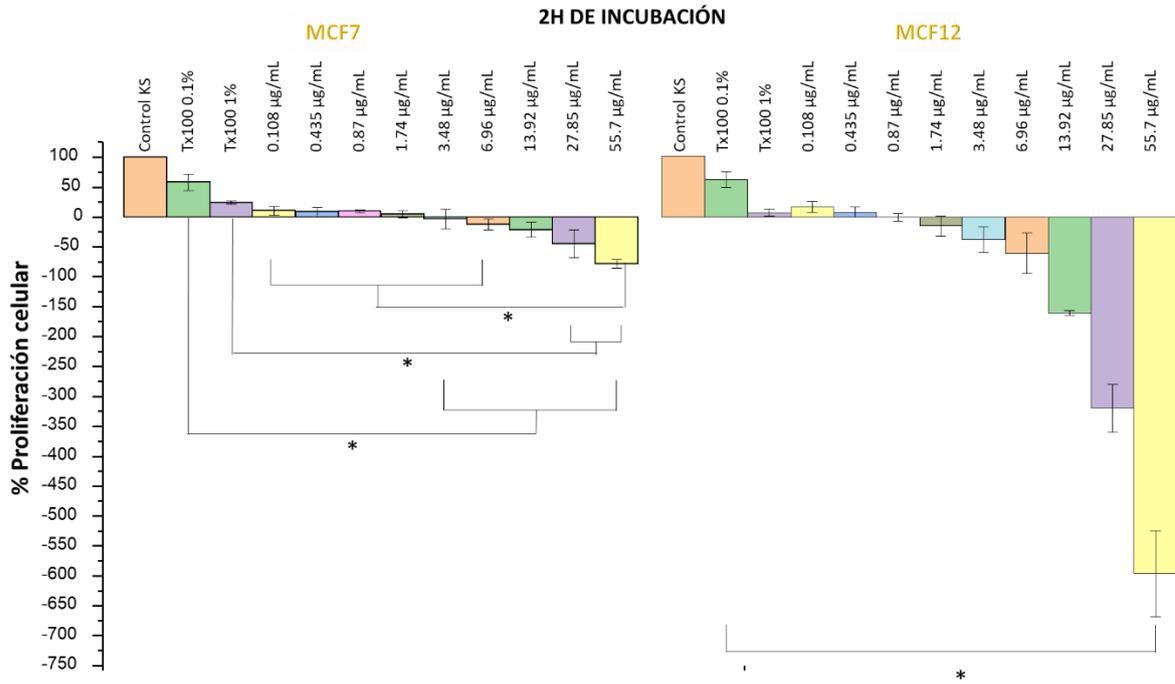


Figura suplementaria 7. Porcentaje de proliferación celular a las 2 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL
 * diferencia de medias es significativa al nivel $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

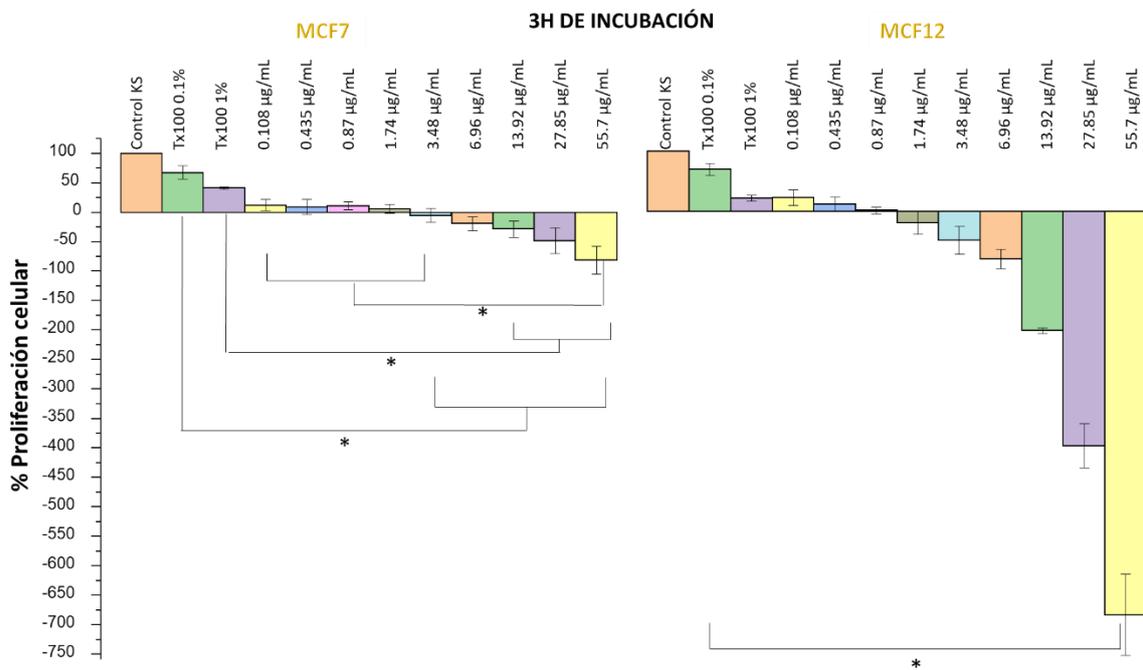


Figura suplementaria 8. Porcentaje de proliferación celular a las 3 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL
 * diferencia de medias es significativa al nivel $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

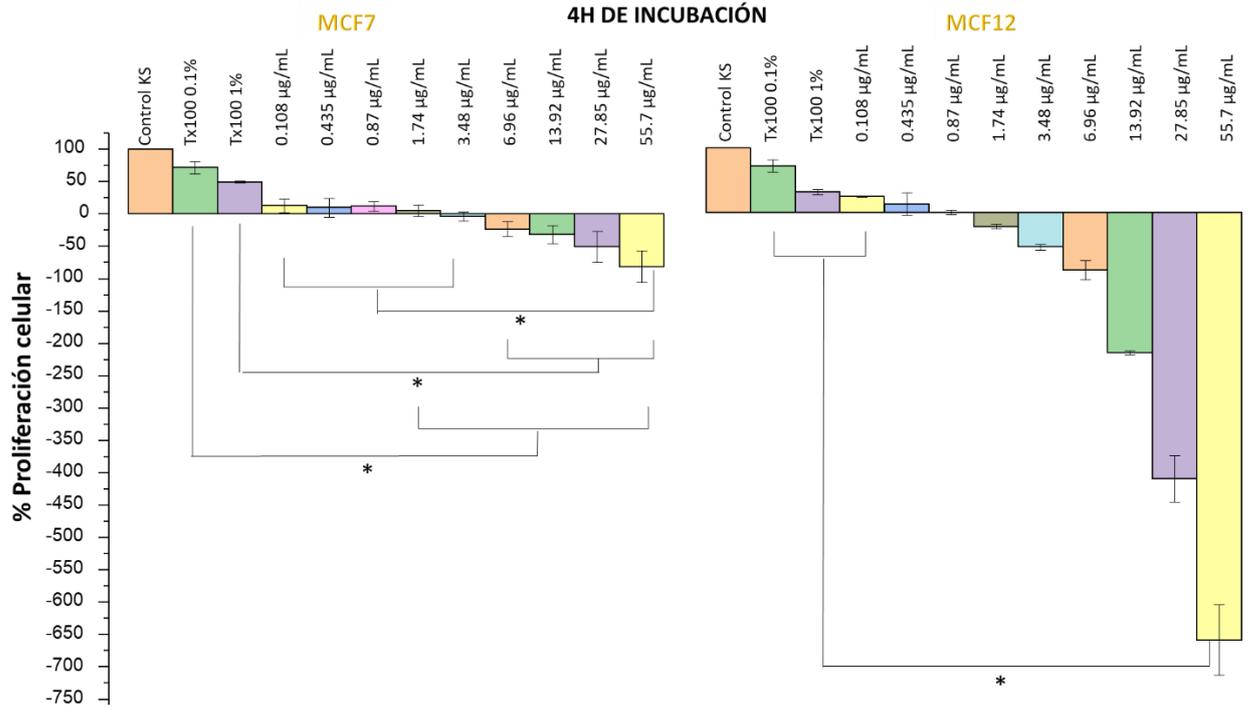


Figura suplementaria 9. Porcentaje de proliferación celular a las 4 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL

* diferencia de medias es significativa al nivel $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

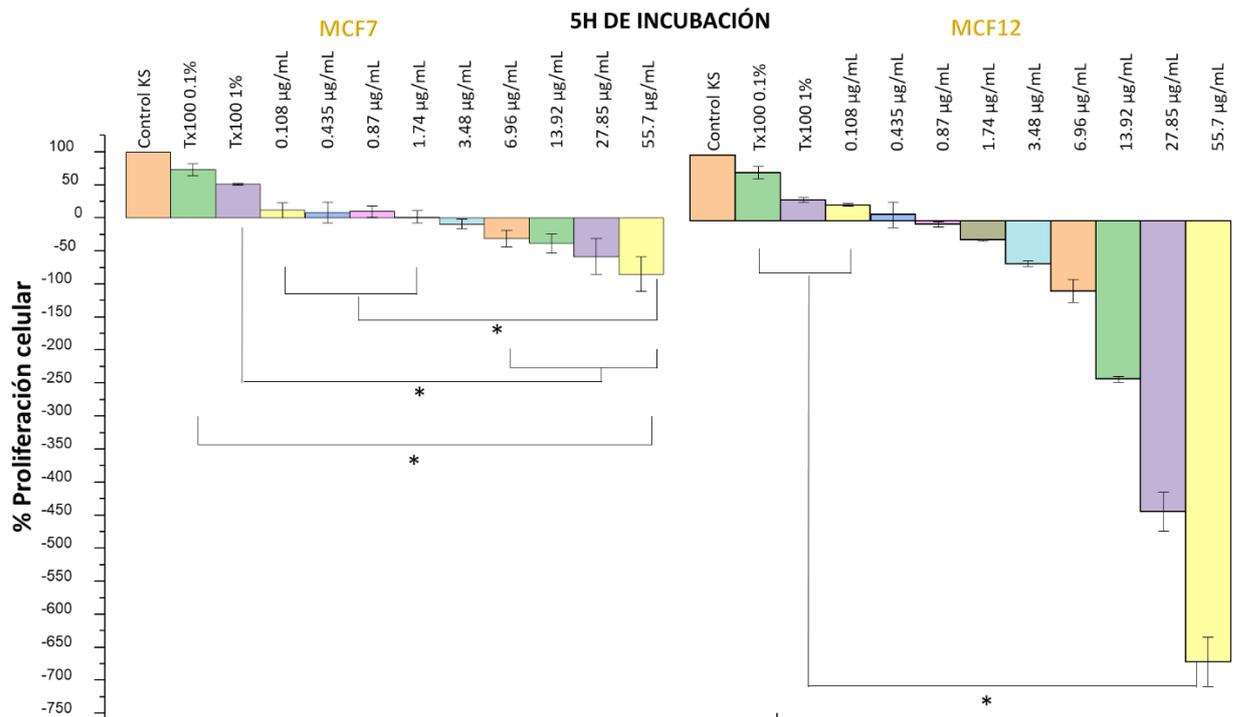


Figura suplementaria 10. Porcentaje de proliferación celular a las 5 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL

* diferencia de medias es significativa al nivel $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

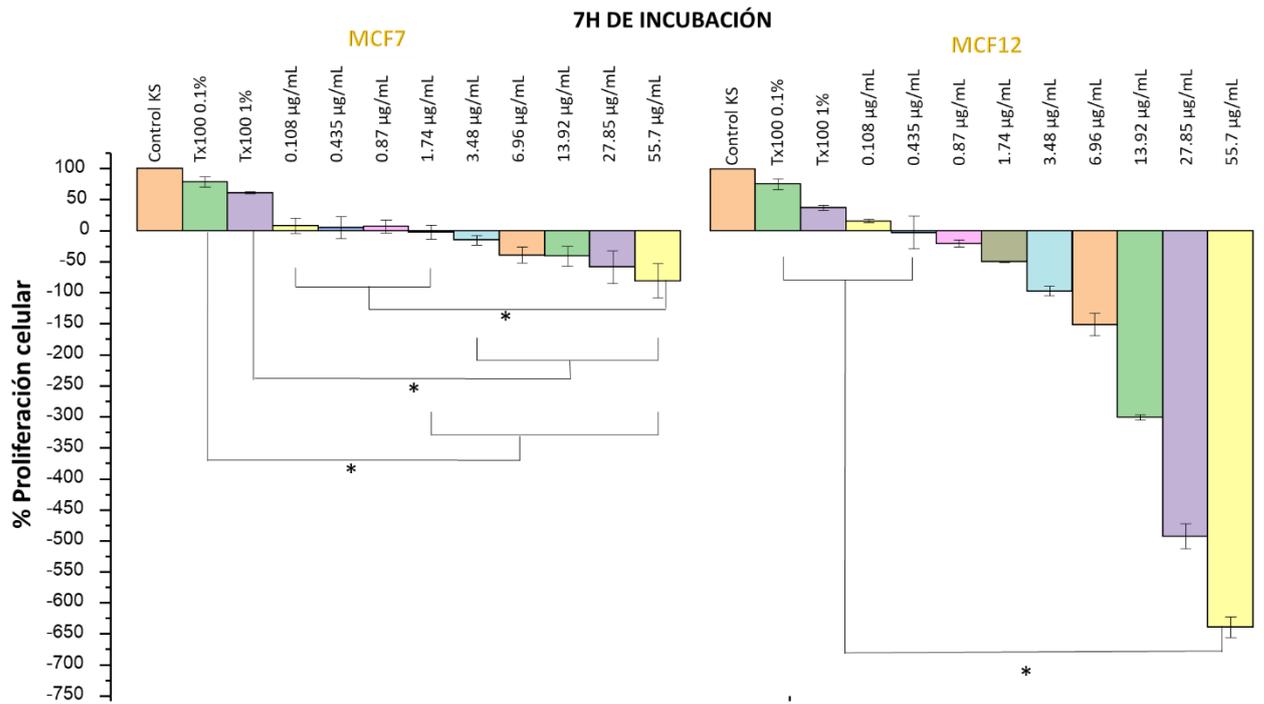


Figura suplementaria 11. Porcentaje de proliferación celular a las 7 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL

* diferencia de medias es significativa al nivel $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

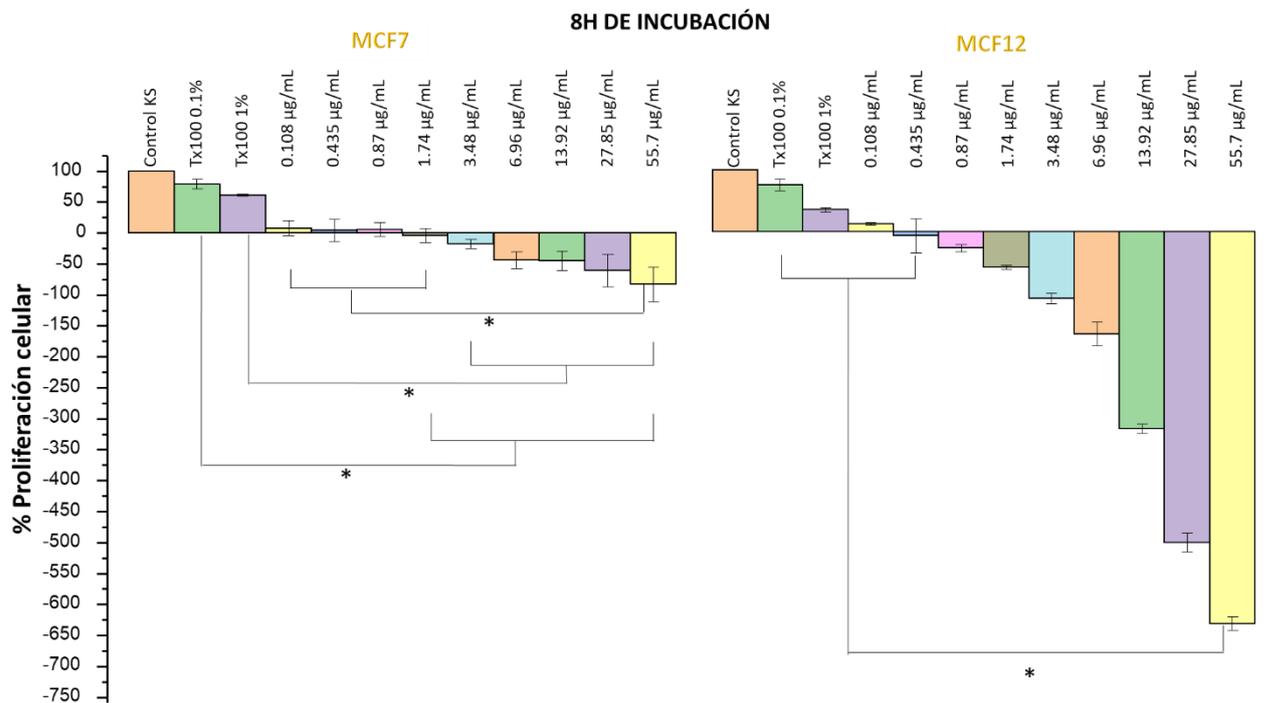


Figura suplementaria 12. Porcentaje de proliferación celular a las 8 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL

* diferencia de medias es significativa al nivel $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

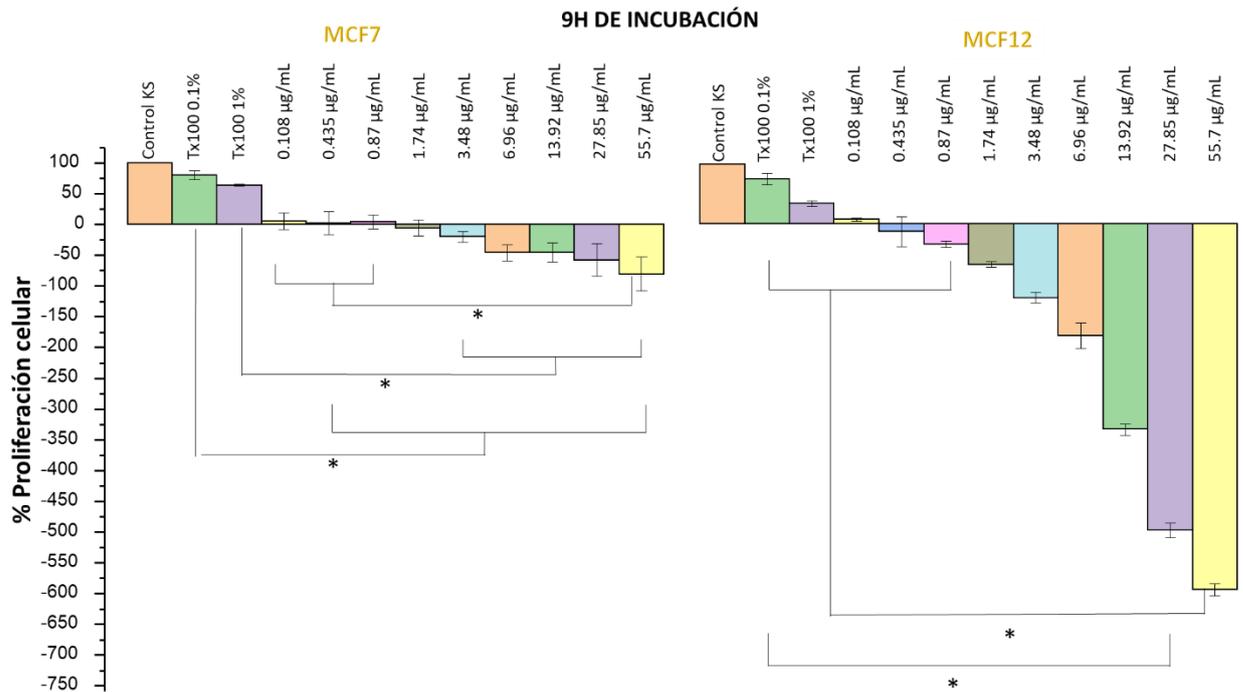


Figura suplementaria 13. Porcentaje de proliferación celular a las 9 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL

* diferencia de medias es significativa al nivel $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

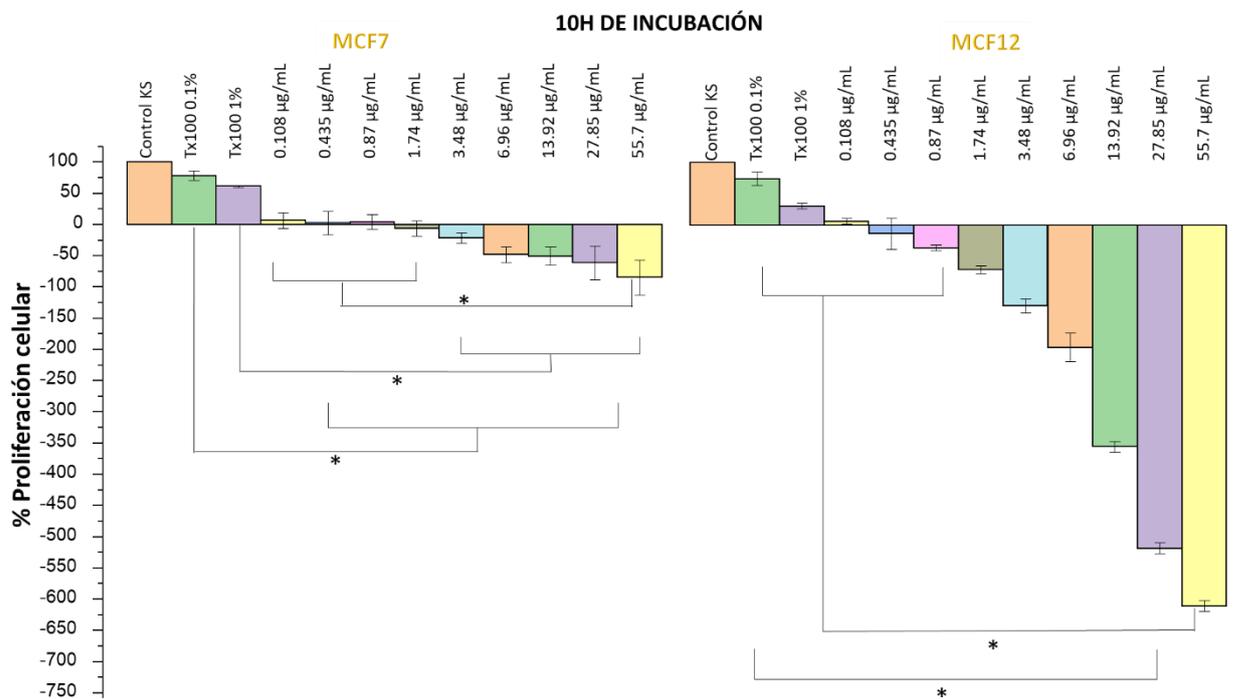


Figura suplementaria 14. Porcentaje de proliferación celular a las 10 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL

* diferencia de medias es significativa al nivel $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

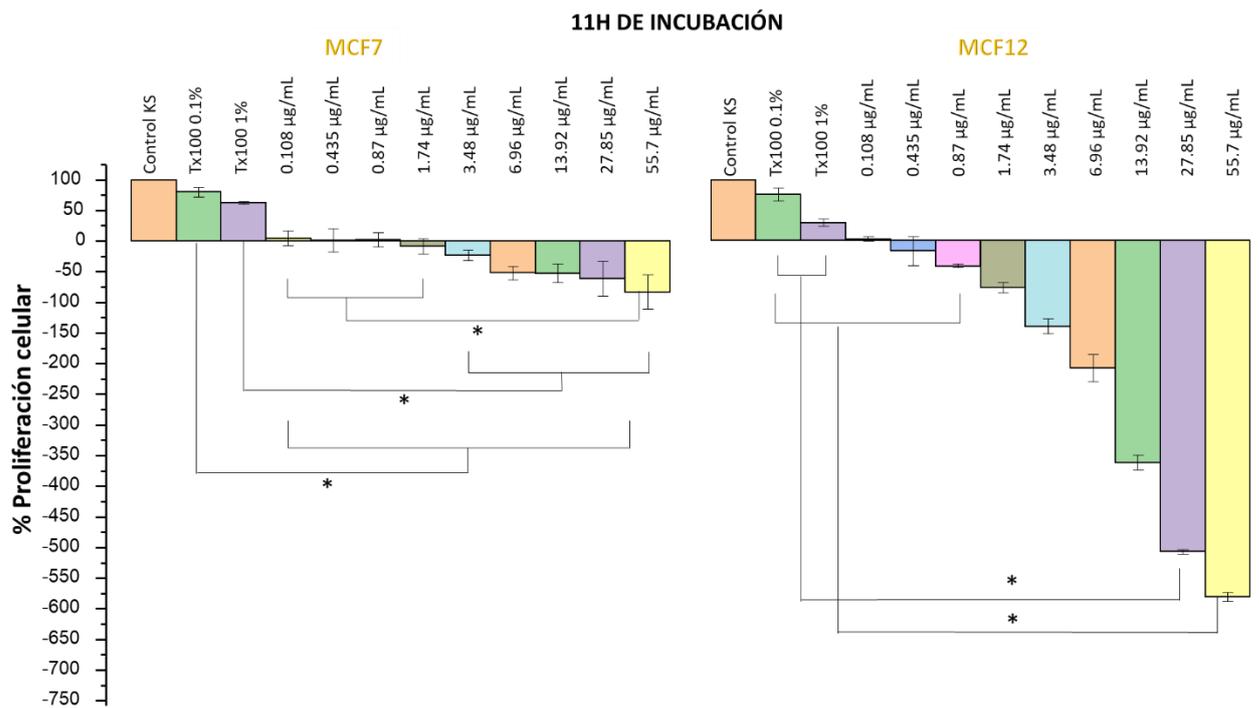


Figura suplementaria 15. Porcentaje de proliferación celular a las 11 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL

* diferencia de medias es significativa al nivel $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

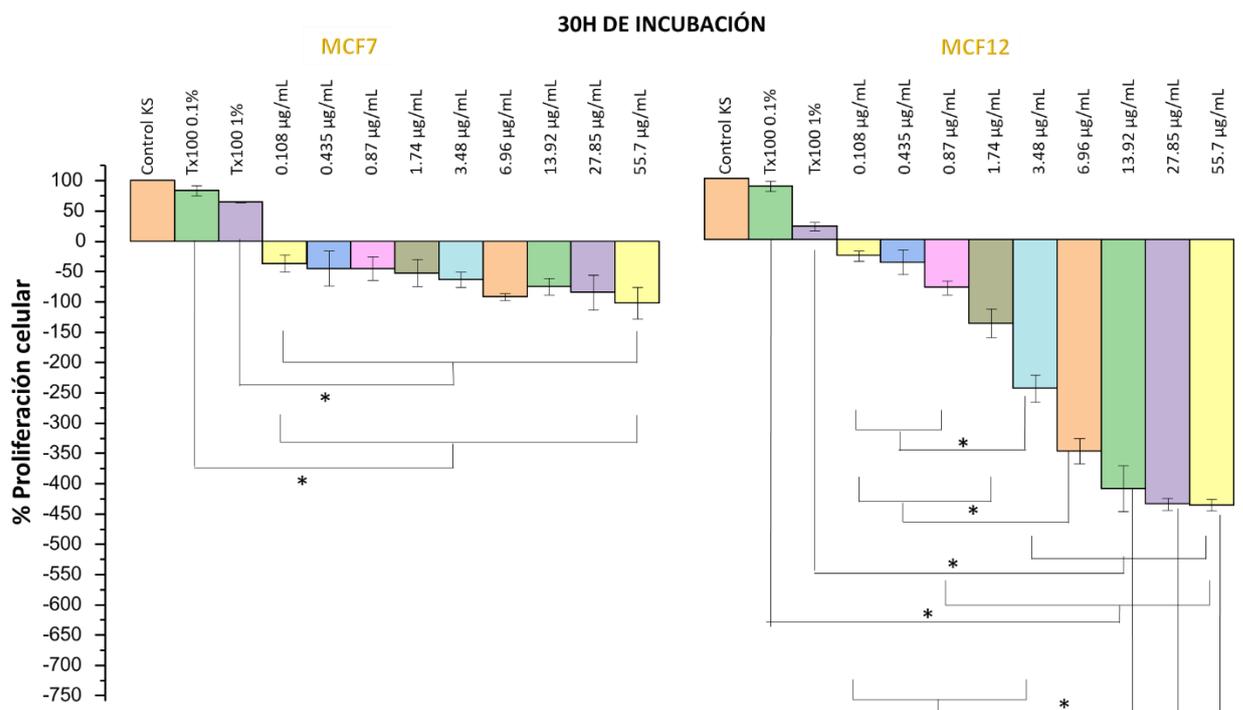


Figura suplementaria 16. Porcentaje de proliferación celular a las 30 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL

* diferencia de medias es significativa al nivel $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

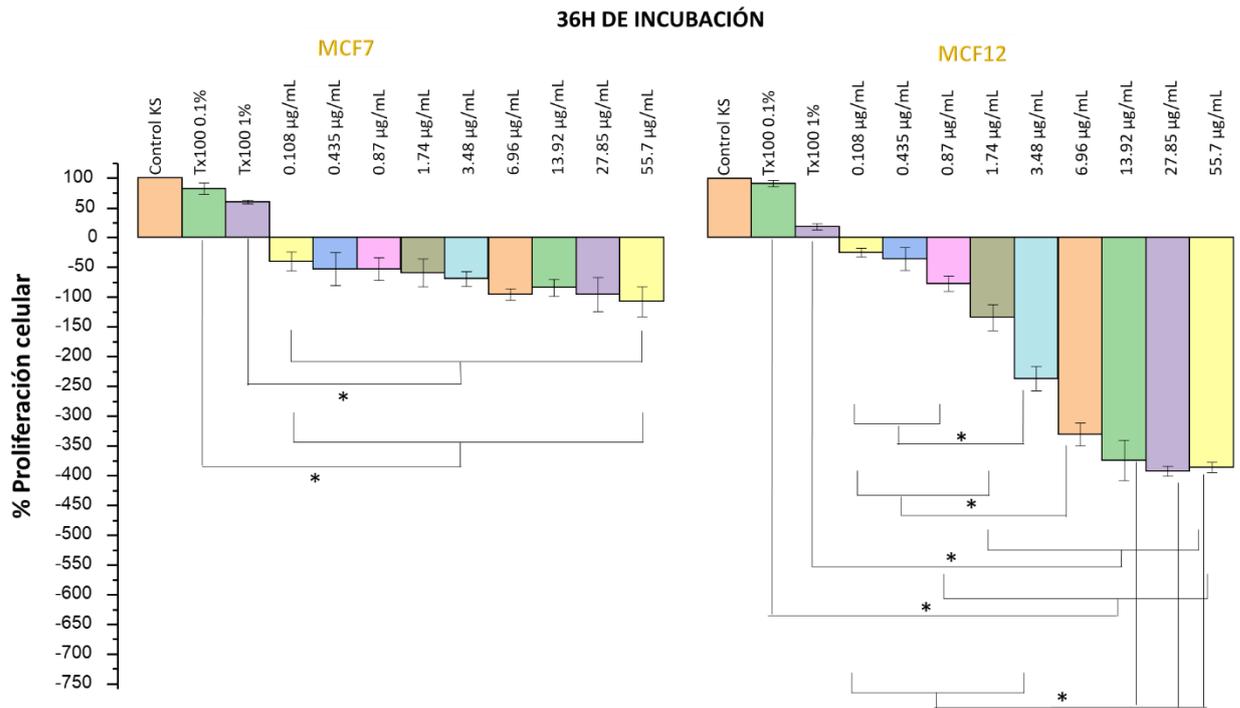


Figura suplementaria 17. Porcentaje de proliferación celular a las 36 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL

* diferencia de medias es significativa al nivel $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

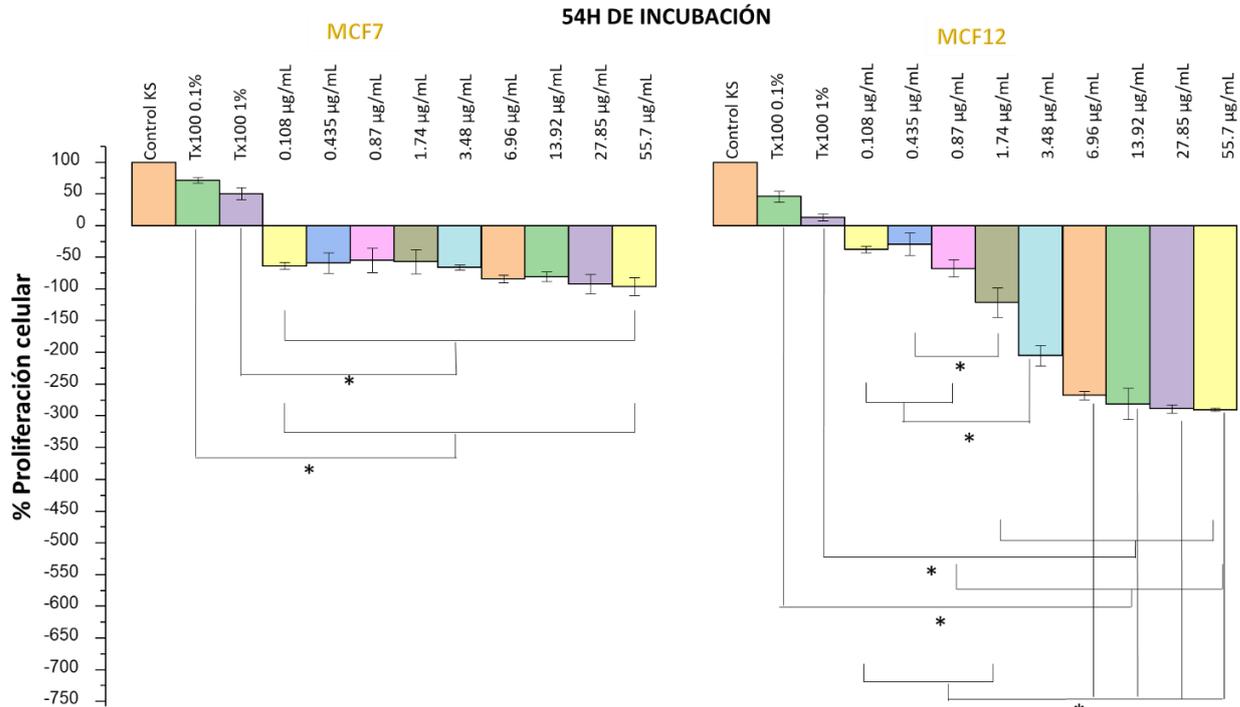


Figura suplementaria 18. Porcentaje de proliferación celular a las 54 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con la FCL

* diferencia de medias es significativa al nivel $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.