

Caracterización de la dinámica de calcio inducida por una fracción
concentrada de lectinas (FCL) y lectina recombinante de *Phaseolus*
acutifolius sobre una línea celular de cáncer de mama

2020

María Elizabeth Galicia Castillo



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Caracterización de la dinámica de calcio inducida por una fracción
concentrada de lectinas (FCL) y lectina recombinante de *Phaseolus*
acutifolius sobre líneas celulares de mama.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta

María Elizabeth Galicia Castillo

Dirigido por

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Santiago de Querétaro, 16 de Mayo del 2021



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

Caracterización de la dinámica de calcio inducida por una fracción concentrada de lectinas (FCL) y lectina recombinante de *Phaseolus acutifolius* sobre una línea celulares de mama

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta:

L.N. María Elizabeth Galicia Castillo

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. Jorge Luis Chávez Servín
Suplente

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez
Suplente

Centro Universitario
Querétaro, Qro. México
Mayo 2021

RESUMEN

Se ha obtenido una fracción concentrada de lectinas (FCL) con efectos citotóxicos sobre células de cáncer de colon HT-29 (García-Gasca, García-Cruz, et al., 2012; Moreno-Celis et al., 2017). Actualmente, se produce una lectina recombinante (LR) con mayor rendimiento y que conserva su actividad citotóxica (Dena Beltran, 2020; Martínez-Alarcón, 2017). Se han descrito distintos mecanismos de acción por los cuales las lectinas ejercen su efecto activando respuestas celulares. El calcio es un segundo mensajero que controla varios procesos celulares entre los que se encuentran la muerte celular programada (Berridge et al., 2003). Las células transformadas realizan modificaciones en la dinámica de calcio y a las proteínas que regulan su concentración en el citosol para favorecer su proliferación e inhibir señales que derivan en apoptosis (Stewart et al., 2015). Estudios anteriores sobre dinámica de calcio en MCF-7 y MCF-12, sugieren que la FCL induce alteraciones en la homeostasis de calcio. Estas primeras evidencias demuestran que FCL es capaz de inducir cambios en la concentración de calcio citoplasmático, en células de cáncer de mama MCF-7 (**Michigan Cancer Foundation 7**); células epiteliales proveniente de glándula mamaria metastásica y MCF-12 (**Michigan Cancer Foundation 12**); células epiteliales proveniente de glándula mamaria normal (Díaz Betancourt, 2018). Se caracterizó la dinámica de calcio mediante la sonda comercial Fluo-4 AM para evaluar la concentración de Ca^{2+} en citosol, y Mitotracker Green FM™ para medir el potencial de membrana mitocondrial. Ambas sondas se observaron por microscopía de fluorescencia. Los estudios de viabilidad celular se midieron utilizando el protocolo de Alamar Blue®. Los resultados indican que LR también es capaz de inducir cambios en la concentración de Ca^{2+} en el citosol, de forma dosis-dependiente y diferencial, y similar a lo descrito para FCL. Ambas lectinas (FCL y LR) aumentan el potencial mitocondrial a dosis altas (1 mg/ml) en MCF-12. FCL disminuye la proliferación celular en MCF-12 y MCF-7.

Palabras Clave: calcio, dinámica de calcio, lectinas, lectinas vegetales, cáncer, cáncer de mama.

Summary

A concentrated fraction of lectins (FCL) with cytotoxic effects on HT-29 colon cancer cells has been obtained (García-Gasca, García-Cruz, et al., 2012; Moreno-Celis et al., 2017). Currently, a recombinant lectin (LR) is produced with higher yield and that retains its cytotoxic activity (Dena Beltran, 2020; Martínez-Alarcón, 2017). Different mechanisms of action have been described, whereby lectins exert their effect by activating cellular responses. Calcium is a second messenger that controls several cellular processes including programmed cell death (Berridge et al., 2003). Cancer cells make changes in calcium dynamics and on proteins that regulate their concentration in the cytosol to promote their proliferation and inhibit signals that result in apoptosis (Stewart et al., 2015). Previous studies on calcium dynamics in MCF-7 and MCF-12 suggest that FCL induces alterations in calcium homeostasis. These first evidence shown that FCL inducing changes in the concentration of cytoplasmic calcium in MCF-7 (**Michigan Cancer Foundation 7**); epithelial cells from metastatic mammary gland and MCF-12 (**Michigan Cancer Foundation 12**); epithelial cells from normal mammary gland as control cell line (Díaz Betancourt, 2018). Calcium dynamics were characterized using the commercial probe Fluo-4 AM to evaluate the Ca^{2+} concentration in cytosol, and Mitotracker Green FM TM to measure the mitochondrial membrane potential. Both probes were observed by fluorescence microscopy. Cell viability studies were measured using the Alamar Blue® protocol. The results indicate that LR is also capable of inducing changes in the concentration of Ca^{2+} in the cytosol, in a dose-dependent and differential manner, and the dynamics is like that described for FCL. Both lectins (FCL y LR) increase mitochondrial potential at high doses (1 mg / ml) in MCF-12. FCL decreases cell proliferation in MCF-12 and MCF-7.

Keywords: calcium, calcium dynamics, lectins, plant lectins, cancer, cancer, breast cancer.

DEDICATORIAS

Dedicado a las personas más importantes, que siempre están a mí lado y me aman incondicionalmente.

Beatriz Castillo Hernández

Isaías Galicia Olivares

Dedicado también a los que ya no están, pero me dejaron tanto...

María Hernández Bello

Lehi Galicia Olivares

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por su apoyo con una beca de manutención. No de becario: 927732.

Al Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER-UAQ) 2019. Folio: 2019-00662.

A CONACYT por su apoyo a través al proyecto A1-S-26966 / SEP-CONACYT.

Al Fondo para el Desarrollo del Conocimiento (FONDEC-UAQ-2019).

Al Dr. Carlos Saldaña (FCN-UAQ) por aceptar dirigir mi trabajo de tesis, gracias por su paciencia, apoyo, por compartir su vocación y sus enseñanzas. Ha sido una gran experiencia formar parte de su equipo de trabajo.

Al Dr. Jorge Chávez Servín (FCN-UAQ) por su apoyo en todo el trayecto de la maestría, por compartir sus conocimientos, por sus ánimos y consejos.

Al Dr. Alejandro Blanco (CINVESTAV, IRA.) por aceptar compartir su experiencia, su apoyo y amabilidad para este proyecto.

A la Dra. Teresa García (FCN-UAQ) por su conocimiento, interés y por permitirme formar parte del equipo del proyecto que desarrolla en el Laboratorio de Biología Molecular.

Al Dr. Roberto Ferriz (FCN-UAQ) por su actitud, por sus críticas constructivas y conocimiento.

A Josué López (FCN-UAQ) por su actitud positiva, por compartir conmigo su experiencia, por su ayuda en todo momento y por su amistad.

A la Dra. Verónica Morales Tlalpan (FCN-UAQ) por todas sus enseñanzas y por su apoyo en los experimentos.

A mis compañeros (FCN-UAQ) Verónica, Lupita, Viridiana, Zury, Caro, Ángel, Aleyda, Jaqueline y Roberto por su amistad, compañerismo, alegría y los momentos compartidos.

Al Laboratorio de Biología Molecular de la FCN-UAQ

Al Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada (LAVIS)

A la Unidad de Proteogenómica de la UNAM

M. en C. Adriana González Gallardo

Al Laboratorio de Biofísica de membranas de CA-UAQ

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

ÍNDICE

Resumen	i
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Índice	vi
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	ix
I. INTRODUCCIÓN	11
II. ANTECEDENTES	13
2.1. Cáncer de mama	13
2.1.1. Epidemiología	13
2.1.2. Anatomía de la mama.	13
2.1.3. Líneas celulares MCF-7 y MCF-12.	15
2.2. Lectinas.....	15
2.2.1. Frijol Tépari	17
2.2.1.1. Fracción Concentrada de Lectinas (FCL)	18
2.2.1.2. Lectina Recombinante.....	20
2.2.2. Actividad biológica tipo lectina	20
2.3. Calcio.....	21
2.3.1. Mecanismos “OFF” y “ON”	21
2.1.3. Alteraciones de la dinámica de calcio en células de cáncer	23
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
IV. JUSTIFICACION	25
V. HIPÓTESIS	26
VI. OBJETIVOS	27
6.1. OBJETIVO GENERAL	27
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	28
7.1. Reactivos	28
7.2. Pruebas de aglutinación y cuantificación de proteína.....	28
7.3. Cultivo celular	28
7.4. Movilización de calcio.....	31

7.5. Actividad mitocondrial	33
7.6. Viabilidad celular	34
7.7. Análisis estadístico	35
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
8.1. Cuantificación de proteína por Bradford	36
8.2. Pruebas de eritroaglutinación	37
8.3. Determinación de transitorios de calcio basales	38
8.4. Determinación de transitorios de calcio en MCF-12 con FCL y LR.....	39
8.5. Determinación de transitorios de calcio en MCF-7 con FCL y LR.....	43
8.6. Actividad mitocondrial	48
8.7. Viabilidad celular	50
IX. CONCLUSIONES	57
X. REFERENCIAS	58
XI. ANEXOS.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de la población: MCF-7 ATTC® HTB-22.	29
Tabla 2. Descripción de la población MCF-12F ATTC® CRL-10783.....	30
Tabla 3. Componentes del verseno.....	31
Tabla 4. Componentes de la solución Krebs.	33
Tabla 5. Tiempo medio de activación de la respuesta.....	42

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de las lectinas de leguminosas.	17
Figura 2. Planta, hoja y semilla del Frijol Tépari.	18
Figura 3. Perfil electroforético de la FCL.	19
Figura 4. Localización de la zona expuesta en el modelaje del monómero de la lectina de frijol Tépari.	19
Figura 5. Dinámica de calcio y homeostasis.	22
Figura 6. Ejemplos de remodelación hipotética de la señalización de Ca^{2+} , de células tumorogénicas y no tumorogénicas.	23
Figura 7. Movilización de calcio intracelular.	32
Figura 8. Protocolo Alamar Blue.	35
Figura 9. Curva de cuantificación de proteína en FCL y LR.	36
Figura 10. Prueba de eritroaglutinación.	37
Figura 11. Determinación de transitorios de calcio basales en células MCF-12.	38
Figura 12. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL y LR en células MCF-12, utilizando una concentración de 100 ng/ml.	39
Figura 13. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL y LR en células MCF-12, utilizando una concentración de 10 μ g/ml.	40
Figura 14. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL y LR en células MCF-12, utilizando una concentración de 1 mg/ml.	41
Figura 15. Determinación de la respuesta al pico, representación gráfica del Mecanismo t_{ON} y tiempo de activación de la respuesta.	42
Figura 16. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL y LR en células MCF-7, utilizando una concentración de 10 μ g/ml.	43
Figura 17. Ejemplos específicos de bombas, canales e intercambiadores de calcio que contribuyen a la señalización del calcio en las células del cáncer de mama.	44
Figura 18. Determinación de transitorios de calcio inducidos por diferentes concentraciones de FCL en células MCF-12 y MCF-7.	45
Figura 19. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL y LR en células MCF-7, utilizando una concentración de 100 μ g/ml.	46

Figura 20. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL y LR en células MCF-7 a una concentración de 1 mg/ml.	48
Figura 21. Imagen representativa del en la actividad mitocondrial después de aplicar los tratamientos con lectinas por media hora.	48
Figura 22. Activación de la apoptosis en la mitoncondria.	50
Figura 23. Ensayo de Alamar Blue y tratamientos aplicados de diferentes concentraciones de lectinas.	50
Figura 24. Ensayo de Alamar Blue en MCF-7 y MCF-12 a las 2 y 48 horas.	51
Figura 25. Porcentaje de viabilidad celular al 10 min de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con FCL.....	52
Figura 26. Porcentaje de viabilidad celular a las 6 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con FCL.....	52
Figura 27. Porcentaje de viabilidad celular a las 12 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con FCL.....	53
Figura 28. Porcentaje de viabilidad celular a las 24 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con FCL.....	54
Figura 29. Porcentaje de viabilidad celular a las 48 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con FCL.....	54
Figura 30. Porcentaje de viabilidad celular a las 72 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con FCL.....	55
Figura 31. Actividad mitocondrial en células MCF-12.....	71
Figura 32. Efecto de FCL sobre la actividad mitocondrial en MCF-12	71
Figura 33. Efecto de LR sobre la actividad mitocondrial en MCF-12.	71
Figura 34. Porcentaje de viabilidad celular a los 30 minutos de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con FCL.	72
Figura 35. Porcentaje de viabilidad celular a las 2 horas de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con FCL.....	72
Figura 36. Porcentaje de viabilidad celular a las 8 horas de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con FCL.....	73

I. INTRODUCCIÓN

En el año 2018 se reportaron 190 667 casos nuevos de cáncer en México, siendo el cáncer de mama el tipo de neoplasia más frecuente en mujeres (Lam F, Ervik M, Ferlay J, Soerjomataram I, Mery L, 2018). Por ello es necesario el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para su prevención y/o tratamiento. La investigación encaminada a los compuestos bioactivos presentes en fuentes vegetales naturales, como el frijol, reporta que éstos pueden modular una o más vías de transducción de señales involucradas en la supervivencia de las células cancerosas para inhibir la viabilidad celular y la metástasis e inducir apoptosis (Chino et al., 2017; Feregrino-Perez et al., 2014). Entre los estudios que exploran posibles agentes terapéuticos, están los que se refieren al frijol Tépari. El nombre científico del frijol Tépari es *Phaseolus acutifolius* A. Gray, pertenece a la familia Fabaceae. A partir del frijol Tépari se han obtenido una serie de compuestos con actividad biológica, entre los que se encuentran las lectinas (García-Gasca, García-Cruz, et al., 2012; Moreno-Celis et al., 2017). Son aglutinadoras celulares y debido a su capacidad de formar enlaces específicos funcionan como mediadores del reconocimiento en varios procesos de la célula (Chrispeels & Raikhel, 1991; Nasi et al., 2009).

Las lectinas del frijol Tépari, tienen diversas funciones quimiopreventivas, incluidos los efectos inhibitorios sobre el crecimiento y la inducción de la muerte celular ((Ferríz-Martínez, 2014; García-Gasca, García-Cruz, et al., 2012; Moreno-Celis et al., 2017). García-Gasca y colaboradores han obtenido una fracción concentrada de lectinas (FCL), a partir de técnicas cromatográficas, del frijol Tépari. FCL contiene múltiples proteínas, sin embargo, se sabe que la actividad biológica se debe a dos proteínas que resultan positivas para la tinción de glucosilaciones, denominadas LN1 (con actividad citotóxica y aglutinante sobre eritrocitos A+) y LN2 con actividad citotóxica sobre células de cáncer de colon HT-29 (Ferríz-Martínez, 2014; García-Gasca, García-Cruz, et al., 2012; Moreno-Celis et al., 2017). Se ha obtenido una proteína de interés farmacológico, por lo que actualmente se utiliza un sistema heterólogo (*Pichia pastoris*), para la producción continua de lectina, que ofrece mayores rendimientos y con la misma actividad biológica que LN2, conservando su efecto citotóxico sobre células de cáncer (Dena Beltran, 2020; Martínez-Alarcón, 2017). Muchas de las respuestas celulares inducidas por proteínas se producen mediante la activación de

segundos mensajeros. El calcio es un segundo mensajero que regula múltiples funciones celulares, los organismos multicelulares requieren un estricto control de calcio intracelular para permitir una homeostasis tisular adecuada; la pérdida de este control da como resultado el desarrollo de tumores (Danese et al., 2017).

Díaz-Betancourt A y Saldaña C., reportan por primera vez, que FCL moviliza Ca^{2+} hacia el medio intracelular, en líneas celulares MCF-7 y MCF-12. La concentración de calcio se eleva de manera dosis dependiente, haciéndolo de manera diferencial en células de cáncer de mama MCF-7, con respecto a células inmortalizadas no transformadas a cáncer, MCF-12. Además, mostraron que existe alteración en la viabilidad celular al ser expuestas a FCL (Díaz Betancourt, 2018). Nuestro estudio pretende ser el primero en informar sobre los efectos de lectina recombinante en la dinámica de Ca^{2+} , en células de cáncer de mama MCF-7 y MCF-12, y hacer una comparación sobre los efectos en la señalización de calcio con respecto a FCL.

Los experimentos de actividad mitocondrial demuestran que a dosis alta de LR y FCL (1 mg/ml), el potencial mitocondrial aumenta, probablemente por una activación de la síntesis de ATP, que podría estar relacionada con una activación del mecanismo de muerte celular. En los ensayos de viabilidad celular se registró una disminución de la proliferación celular tras los tratamientos con FCL, esta disminución fue consistente durante tiempos prolongados y hubo una menor respuesta en MCF-7, en comparación con MCF-12. Esto concuerda con experimentos realizados anteriormente ((Díaz Betancourt, 2018).

II. ANTECEDENTES

2.1. Cáncer de mama

2.1.1. Epidemiología

El cáncer se caracteriza por un conjunto de propiedades evolutivas ventajosas adquiridas, que promueven la transformación de células fenotípicamente normales en células malignas, que crecen y se divide más rápido y no mueren a la velocidad usual; al mismo tiempo, promueven la progresión de éstas, mientras se sacrifica/explota el tejido del huésped (Fouad & Aanei, 2017; Lodish et al., 2013). En todo el mundo, anualmente entre 100 y 350 personas por cada 100 000 mueren a causa de del cáncer (Lam F, Ervik M, Ferlay J, Soerjomataram I, Mery L, 2018).

El cáncer de mama es el segundo tipo de neoplasia más frecuente después del cáncer de pulmón a nivel mundial. En 2018, de acuerdo con GLOBOCAN, se diagnosticaron 2 088 849 casos nuevos y 626 679 personas murieron por esta causa (Lam F, Ervik M, Ferlay J, Soerjomataram I, Mery L, 2018). En el 2010 más de dos tercios de los casos de cáncer de seno se diagnostican en mujeres de 50 años o más; la mayoría de estos casos están en países desarrollados. En México el cáncer de mama es el tipo de neoplasia más frecuente, en el año 2018 se diagnosticaron 27 283 casos nuevos, con una prevalencia de 83 387 casos en los últimos 5 años y se registraron de 6 884 decesos a causa de esta enfermedad (Lam F, Ervik M, Ferlay J, Soerjomataram I, Mery L, 2018). El 60% de las muertes tiene entre 30 y 59 años, afectando a todos los grupos poblacionales, sin importar el nivel socioeconómico (Knaul et al., 2009). En los países donde la mamografía está disponible, el cribado de rutina se asocia con una reducción de la mortalidad por cáncer de mama.

2.1.2. Anatomía de la mama.

Las mamas están presentes en hombres y mujeres y están se desarrollan a partir del ectodermo durante la cuarta semana de vida embrionaria (Sadler, 2009; Torre et al., 2016). Después del nacimiento la glándula mamaria se vuelve inactiva hasta el inicio de la pubertad. En el periodo peripuberal se presenta una involución y atrofia del tejido mamario debido a efectos antagonistas androgénicos sobre el crecimiento ductal y estromal. En las niñas hay un

aumento de estrógeno circulante que corresponde con un aumento de grasa y tejido conectivo peri ductal con alargamiento y engrosamiento del sistema ductal (Jesinger, 2014). El desarrollo de la mama se completa durante el embarazo. Las hormonas que influyen en el crecimiento son: la progesterona, hormona del crecimiento, prolactina y hormonas de la placenta. Inmediatamente después del parto, el estrógeno y los niveles de progesterona disminuyen para dar pie a la lactancia. La prolactina, la hormona del crecimiento, y la insulina inducen la producción de leche. La oxitocina regula la secreción de leche, que se libera en respuesta a los reflejos neurales activados por succión (Pandya & Moore, 2011). Durante la menopausia, los elementos ductal y glandular involucionan dando como resultado que la mama contenga predominantemente grasa y estroma y una reducción general de conductos y lóbulos (Pandya & Moore, 2011).

Los componentes de la mama incluyen piel, fascia superficial, fascia profunda, parénquima mamario y el complejo pezón-areola. El parénquima mamario se compone de un epitelio glandular, estroma fibroso y grasa. La glándula mamaria está compuesta de 15 a 20 lóbulos, que a su vez están compuestos de lobulillos con alveolos que desembocan en los ductos terminales que al final se ensancha en los senos lactíferos y desembocan el pezón (Martaindale, 2018). El parénquima mamario está encerrado por la fascia superficial, que se encuentra justo debajo de la piel, y la fascia profunda, que envuelve el músculo pectoral mayor. La fascia superficial se ancla a la fascia profunda del tórax en el perímetro del seno por el ligamento circunmamario, que actúa como el paso por el que las arterias y los nervios llegan hacia el parénquima mamario y pezón-areola. El estroma, comúnmente conocido como ligamentos de Cooper, consiste en bandas verticales de tejido conectivo que atraviesan el seno y se insertan en la dermis viajan desde la lámina posterior de la fascia, a través de la glándula mamaria y la lámina anterior, para anclar en la piel (Martaindale, 2018; Rehnke et al., 2018). El pezón y la areola son áreas pigmentadas de piel modificada que se conecta con la glándula mamaria a través de conductos (Stone & Wheeler, 2015). La areola contiene numerosas glándulas sudoríparas, apocrinas, sebáceas glándulas y folículos pilosos de la capa dérmica de la piel. Las glándulas de Montgomery están asociadas con un conducto lactífero y proveen lubricación durante la lactancia y son más evidentes durante el embarazo (Kopans, 2007; Stone & Wheeler, 2015).

2.1.3. Líneas celulares MCF-7 y MCF-12.

Las células **MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7)** (ATCC® HTB22™) provienen de la especie *Homo sapiens*, se obtuvo de glándula mamaria a través de un derrame pleural. Son producto de un adenocarcinoma y tumor primario (carcinoma ductal de mama invasivo), el tipo celular es epitelial, crece de forma adherente. Pertenece a una humana hembra adulta de 69 años. La línea MCF7 conserva varias características del epitelio mamario diferenciado a cáncer, tiene la capacidad de procesar el estradiol a través de los receptores de estrógeno citoplásmicos y la capacidad de formar cúpulas. Las células expresan el oncogén WNT7B. El crecimiento de las células MCF7 es inhibido por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa). La secreción de IGF1P puede ser modulada por el tratamiento con anti-estrógenos (Brandes & Hermonat, 1983; Huguet et al., 1994; Paine et al., 1992; Pratt & Pollak, 1993; Soule et al., 1973)

Las células **MCF-12 (Michigan Cancer Foundation-12A)** (ATCC® CRL-10782™) provienen de *Homo sapiens*, mujer caucásica de 60 años, de glándula mamaria son células epiteliales inmortalizadas espontáneamente, adherentes. Es una línea celular no tumorigénica establecida a partir de tejido tomado de mamoplastia de reducción de una mujer nulípara con enfermedad mamaria fibroquística que contenía áreas focales de hiperplasia intraductal. La línea se produjo a partir del cultivo a largo plazo de medio sin suero con baja concentración de Ca^{2+} . Fue derivada de las células adherentes en la población (Paine et al., 1992)

2.2. Lectinas

Las lectinas se definen como como proteínas que pueden reconocer y unir hidratos de carbono libres o conjugados (glicoproteínas, glucolípidos o polisacáridos), de una manera reversible, altamente específica y sin modificar su estructura (Lagarda-Díaz et al., 2017; Moreira et al., 1991). Están distribuidas en una amplia variedad de organismos vivos y son particularmente abundantes en plantas. Durante mucho tiempo, estas proteínas se denominaron hemaglutininas debido a su capacidad para aglutinar glóbulos rojos (Lagarda-Díaz et al., 2017).

Han sido clasificadas en base a varios criterios, como el origen taxonómico, localización celular, la especificidad del reconocimiento de hidratos de carbono, funciones y estructura.

Entre las lectinas estudiadas hasta ahora, las lectinas de leguminosas son la familia más grande, pues están presentes en cantidades altas dependiendo de la genética y de factores ambientales, y se acumulan principalmente en las semillas (Nasi et al., 2009). Son aglutinadoras celulares y debido a su capacidad de formar enlaces específicos funcionan como mediadores del reconocimiento en varios procesos de la célula, entre las que se encuentra, la simbiosis entre las bacterias fijadoras de nitrógeno y leguminosas y defensa de las plantas (Chrispeels & Raikhel, 1991; Nasi et al., 2009).

Las lectinas de leguminosas son una familia de proteínas que se caracterizan por poseer dos o cuatro subunidades (o protómeros) ya sean idénticas o ligeramente diferentes, cada una con un único sitio de combinación a hidratos de carbono pequeños y con la misma especificidad (Fig. 1). También contienen por subunidad un ion de calcio, manganeso y magnesio fuertemente unidos, que son necesarios para la unión a hidratos de carbono. Las subunidades son de 25-30 kDa, y comúnmente están compuestas por una sola unidad polipeptídica de ~250 aminoácidos (Loris et al., 1998; Sharon & Lis, 2002). La mayoría, pero no todas, están glicosiladas y llevan hasta tres oligosacáridos unidos a asparagina por subunidad (Imberty et al., 2000). Son homologas en su estructura primaria, los aminoácidos conservados están presentes en puentes de hidrogeno, interacciones hidrofóbicas con el monosacárido y los residuos que coordinan los enlaces iónicos, cada monómero está compuesto de doce hojas β plegadas antiparalelas conectadas mediante alfa hélices (Loris et al., 1998; Sharon & Lis, 2002).

Actualmente las lectinas han sido estudiadas debido a sus múltiples actividades biológicas, entre las que se encuentran actividades anti-proliferativas e inducción de efectos apoptóticos en células cancerosas (Ribeiro et al., 2018). Una de las lectinas más estudiadas por nuestro equipo de trabajo son las lectinas que se extraen a partir del frijol Tépari ya que presentan efectos anti-proliferativos en células de cáncer (Campos-Vega et al., 2012).

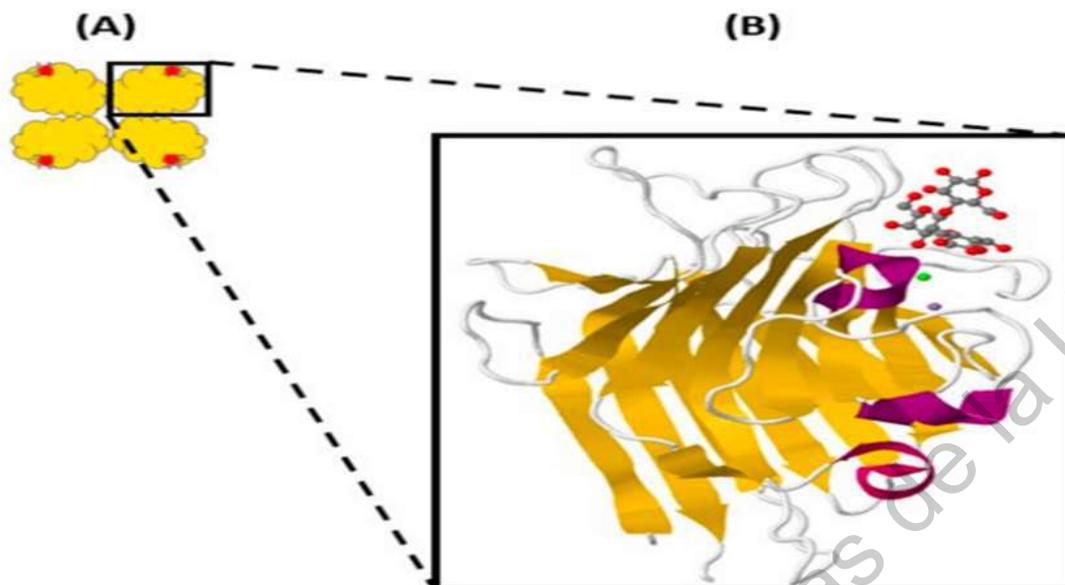


Figura 1. Estructura general de las lectinas de leguminosas.

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

2.2.1. Frijol Tépari

El nombre científico del frijol Tépari es *Phaseolus acutifolius* A. Gray, pertenece a la familia Fabaceae (Fig. 2). Es una leguminosa anual adaptada a las regiones áridas y semiáridas que se extiende desde el suroeste de América del Norte hasta Costa Rica, incluidos Puerto Rico y el norte de México (Valadez-Vega et al., 2011). El frijol Tépari prospera en condiciones agronómicas adversas como altas concentraciones de sal y bajos niveles de agua (Valadez-Vega et al., 2011).

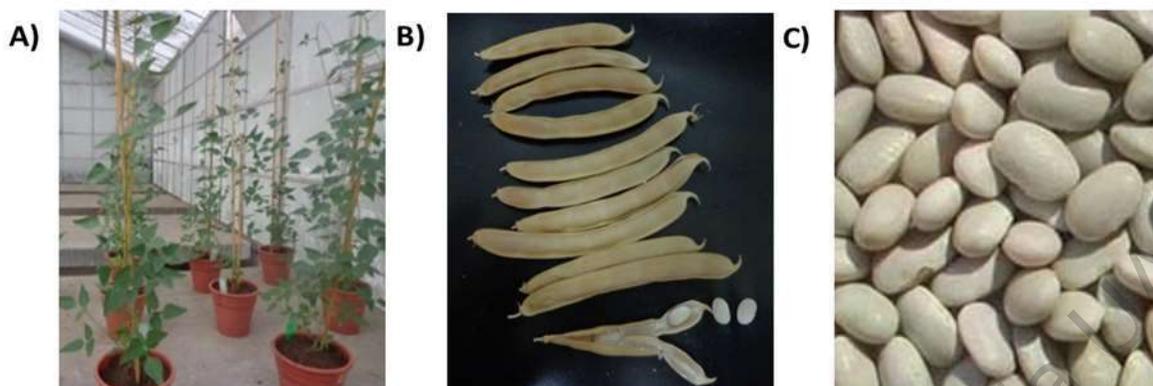


Figura 2. Planta, hoja y semilla del Frijol Tépari.

Planta de frijol Tépari. (B) hoja y vaina. (C) semilla. (Espinoza-Núñez, 2015).

2.2.1.1. Fracción Concentrada de Lectinas (FCL)

Desde los años 80's se ha purificado lectinas de frijol Tépari por medio de métodos cromatográficos. A partir de estas técnicas se ha obtenido una fracción concentrada de lectinas (FCL). FCL es una fracción semipura que contiene múltiples proteínas, sin embargo, únicamente dos de ellas resultan positivas para tinción de glicosilaciones. Por lo anterior, se asume que la actividad biológica tipo lectina, se debe a las proteínas contenidas en estas dos bandas, en lo posterior denominadas LN1 y LN2 (Fig. 3). LN2 tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa, la cual se sabe es un tetrámero con cuatro subunidades y con un sitio de reconocimiento a carbohidratos.

FCL tiene efecto citotóxico sobre fibroblastos murinos transformados (3T3/v-mos) y este efecto es 21 veces mayor que con respecto a su contraparte no tumorogénica (3T3-L1). Por su parte, Ferriz-Martínez y colaboradores sugieren que las lectinas de la FCL tienen efecto apoptótico promovido por caspasa 9 que, a su vez, activa a la caspasa 3. Lo anterior podría estar relacionado con el bloqueo de la vía de señalización de Akt (proteína cinasa B), lo que impide la fosforilación de caspasa 9 y por consecuencia la activación de caspasa 3 en células de cáncer de colon HT-29 (Ferriz-Martinez et al., 2015). El estudio de toxicidad aguda y subcrónica de la FCL reveló buena tolerabilidad sin evidencia de toxicidad sistémica a través de la evaluación de marcadores hepáticos, renales, pancreáticos y nutricios al ser administrada, por vía intragástrica en ratas a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal. En ratas con cáncer de colon inducido químicamente se ha observado que la FCL administrada a una dosis de 50 mg/kg de peso, inhibe la tumorogénesis temprana y lesiones pre-cancerígenas

mediante la inducción de apoptosis (Moreno-Celis *et al.*, datos no publicados) Tampoco se observaron evidencias de toxicidad en las muestras de tejidos al realizarse las pruebas histopatológicas (Ferriz-Martinez *et al.*, 2015). La FCL presenta resistencia a la digestión y conserva su actividad biológica incluso después de 72 h de ser excretada, además es capaz de activar de forma diferencial células del sistema inmune (Ferriz-Martinez *et al.*, 2015).

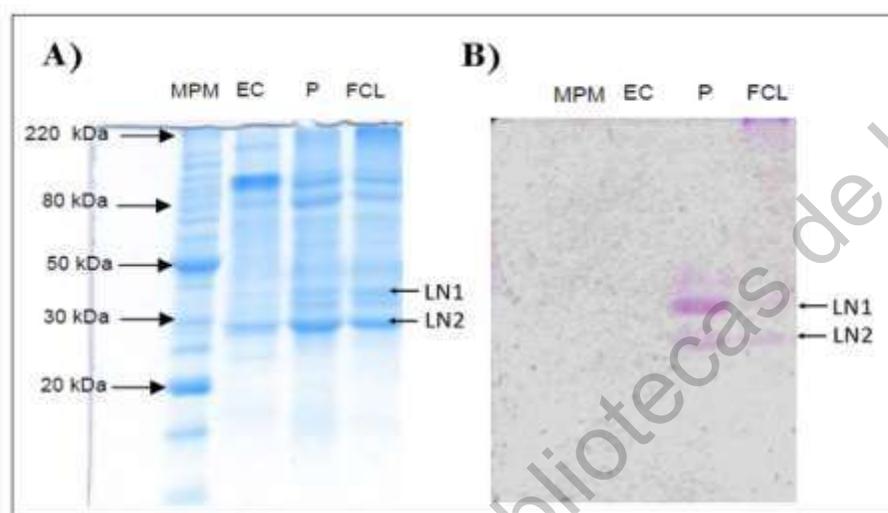


Figura 3. Perfil electroforético de la FCL.

A) perfil electroforético del proceso de purificación de la FCL teñido con azul de coomasie. En donde MPM son los marcadores de peso molecular, EC extracto crudo, P precipitado y dializado, FCL fracción concentrada de lectinas. B) perfil electroforético del proceso de purificación de la FCL con tinción de PASS para glicoproteínas. Las proteínas de FCL que poseen glicosilaciones se señalan con flechas negras (LN1 y LN2). Fuente: *Torres-Arteaga, 2010.*

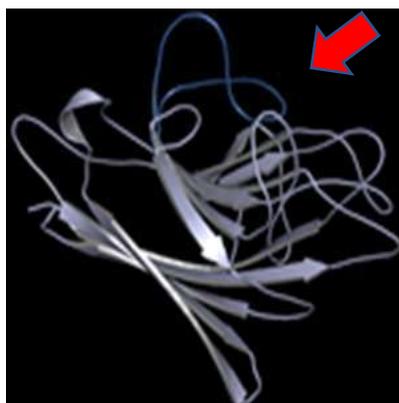


Figura 4. Localización de la zona expuesta en el modelaje del monómero de la lectina de frijol Tépari.

La estructura general está en azul pálido y el péptido seleccionado o bucles se muestra en azul oscuro (flecha roja).

2.2.1.2. Lectina Recombinante

Para la obtención de FCL, en nuestro laboratorio, se utilizaban cromatografías de exclusión de peso molecular y de intercambio iónico para su purificación parcial. Sin embargo, la purificación de FCL tiene algunos inconvenientes asociados a los sistemas de purificación tradicionales debido a que las técnicas convencionales para la purificación de lectinas a partir de su fuente natural generalmente presentan rendimientos muy bajos y en ocasiones son incapaces de discriminar entre isoformas de la misma lectina. Por lo tanto, se obtienen mezclas, lo que proporciona un alto rango de inseguridad (Estrada-Martínez et al., 2017). Así mismo estas estrategias proveen un bajo rendimiento y ocasionan la pérdida de hasta el 80 % la actividad aglutinante (García-Gasca, Hernandez-rivera, et al., 2012). Estos procedimientos son tardados y costosos por lo que no proveen una estrategia eficiente para la obtención de lectinas bioactivas con potencial farmacológico.

En este sentido la producción de lectinas recombinantes mediante técnicas de ingeniería genética tiene la ventaja de proporcionar proteínas individuales, con mejores rendimientos que permiten su caracterización precisa (Oliveira et al., 2014; Raemaekers et al., 1999). Existen bastantes reportes sobre la producción de lectinas recombinantes, particularmente de origen animal y vegetal, ya que se ha demostrado que tienen un espectro más amplio de aplicaciones. Las levaduras y bacterias son el sistema preferido para expresar estas lectinas (Martínez-Alarcón, 2017). Actualmente se utiliza un sistema heterólogo (*Pichia pastoris*), para la producción continua de lectina, que ofrece mayores rendimientos y con la misma actividad biológica que LN2, conservando su efecto citotóxico sobre células de cáncer.

2.2.2. Actividad biológica tipo lectina

El potencial anticancerígeno de las lectinas se puede considerar desde dos ángulos: diagnóstico y terapéutico. La primera se debe a la capacidad de reconocer glicosilaciones tumorales (Gorelik et al., 2001). Las lectinas ejercen sus efectos uniéndose a la superficie celular de una forma no covalente, al reconocer proteínas específicas en las membranas celulares, que con frecuencia se alteran en las células cancerosas (García-Gasca, García-Cruz, et al., 2012). Su potencial terapéutico se basa en su actividad antitumoral y efectos citotóxicos a través de la inducción a la muerte celular programada como la apoptosis y la

autofagia (Fu et al., 2011). Sin embargo, los mecanismos de inducción de muerte celular aún no se conocen por completo.

Existen tres hipótesis que tratan de explicar los mecanismos por los cuales las lectinas culminan en muerte celular programada en las células cancerosas: 1) inactivar directamente el ribosoma de la célula, 2) depender de la endocitosis y localizarse en algunos orgánulos como la mitocondria, 3) uniéndose a ciertos receptores que contienen azúcar en la superficie de la célula (Fu et al., 2011). Las lectinas tienen la capacidad adicional de distinguir entre células normales y transformadas que son frecuentemente más sensibles a sus efectos citotóxicos (Schwarz et al., 1999).

2.3. Calcio

Nuestro equipo de trabajo se ha enfocado en el estudio de los procesos celulares por los cuales las lectinas causan su efecto, en particular el papel que juegan los segundos mensajeros, como el calcio en la activación de procesos celulares tales como la apoptosis.

El calcio es el segundo mensajero que regula muchas funciones celulares, entre ellas, la exocitosis, proliferación y la apoptosis. Un aspecto interesante de la señalización de Ca^{2+} es su importancia en la evolución de los organismos multicelulares para regular su propia muerte celular. De hecho, los organismos multicelulares requieren un estricto control de calcio intracelular para permitir una homeostasis tisular adecuada; la pérdida de este control da como resultado un exceso en la proliferación (que puede desencadenar en la formación de tumores malignos) o a la pérdida de función (patologías neurodegenerativas) (Danese et al., 2017)

2.3.1. Mecanismos “OFF” y “ON”

En células normales, la concentración citoplasmática de Ca^{2+} está en el rango de los nM, sin embargo, su distribución no es homogénea, ya que se ejerce un estricto control sobre éste para mantener la homeostasis (Stewart et al., 2015). El Ca^{2+} está presente en altas concentraciones en reservorios intracelulares, principalmente en el retículo endo/sarcoplásmico (ER/SR) y el aparato de Golgi, donde las concentraciones oscilan entre 300 y 1000 μM 18,19. En el citoplasma, matriz mitocondrial y luz peroxisomal se mantienen concentraciones de Ca^{2+} muy bajas de 100 a 500 nM, ya que en estos sitios es donde se ejerce la señalización (Rizzuto et al., 1992). El mantenimiento de los niveles de calcio es dinámico

y tiene un efecto transitorio en función del tiempo. En la apoptosis se producen variaciones sostenidas y pronunciadas de $[Ca^{2+}]_i$ (Berridge et al., 2003; Danese et al., 2017). De igual manera, la célula también puede responder acortando el tiempo de aumento de calcio citoplasmático, disminuyendo la posibilidad de activar la apoptosis (Dubois et al., 2013; Stewart et al., 2015). En cualquier momento del tiempo, el nivel de calcio intracelular está determinado por un equilibrio entre las reacciones “ON” del citoplasma y las reacciones “OFF” (a través de las cuales la señal es eliminada) a través de un “paquete de herramientas” compuesta por amortiguadores, bombas e intercambiadores (Dubois et al., 2013). A través del empalme alternativo, muchos de los componentes del paquete de herramientas tienen diferentes isoformas con sutilmente diferentes propiedades, que amplían aún más la versatilidad a la señalización de calcio (Berridge et al., 2003).

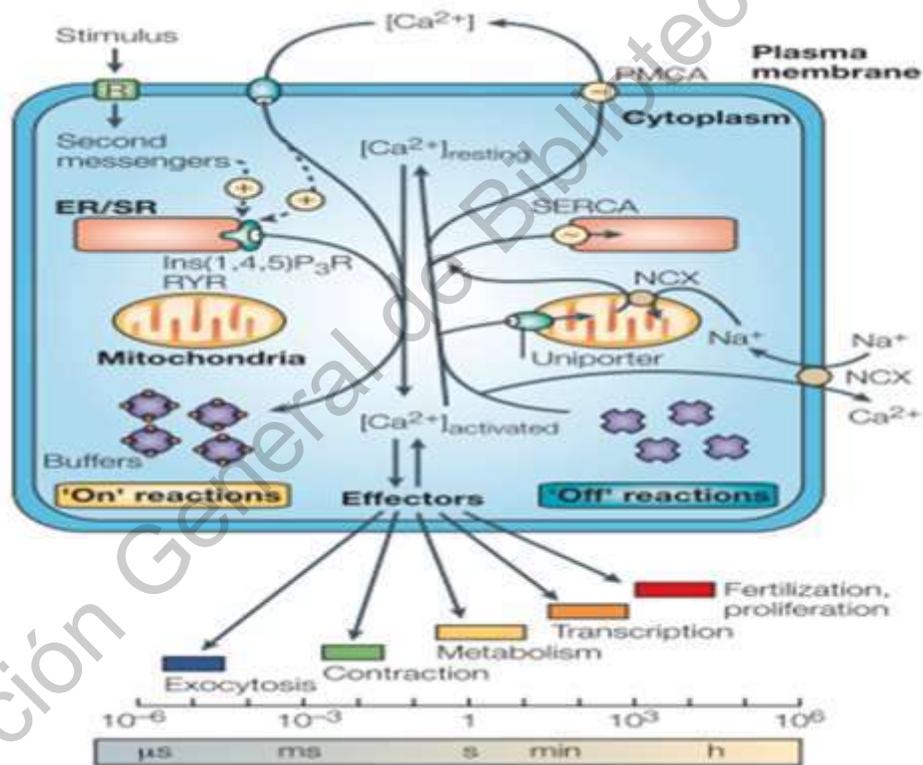


Figura 5. Dinámica de calcio y homeostasis.

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

2.1.3. Alteraciones de la dinámica de calcio en células de cáncer

La perturbación de la homeostasis de Ca^{2+} en células de cáncer, se correlaciona con la proliferación celular sostenida y la inhibición de la muerte celular a través de la modulación de la señalización de este catión (Fig. 6) (Dubois et al., 2013). La señalización apoptótica del calcio implica dos factores: la elevación sostenida de Ca^{2+} intracelular, y una disminución prolongada de la concentración de calcio en el retículo endoplásmico (RE), con sutiles diferencias, dependiendo del tipo celular (McConkey & Orrenius, 1997). Las células cancerosas deben reducir sustancialmente o prevenir el flujo de calcio al disminuir la expresión de los canales permeables al calcio o las vías de señalización que llevan a su activación (McConkey & Orrenius, 1997; Prevarskaya et al., 2004). En segundo lugar, deben adaptarse a una baja concentración de calcio de los reservorios intracelulares como el RE (Prevarskaya et al., 2004; Vanden Abeele et al., 2002). La disminución del flujo de calcio en las células de cáncer previene la sobrecarga de calcio en respuesta a los estímulos proapoptóticos, lo que altera la efectividad de las vías apoptóticas mitocondriales y citoplásmicas, mientras que la adaptación al contenido reducido de calcio en ER disminuye la activación de las respuestas dependientes del estrés en ER (Pinton et al., 2008). En la progresión del cáncer, la célula puede generar alteraciones en localización o cambios en la actividad de los canales de calcio o bombas a través de la modificación postraduccional interrumpida. Tales cambios se identificarían mejor a través de la evaluación de la señal de calcio en lugar de los niveles de proteína o ARNm

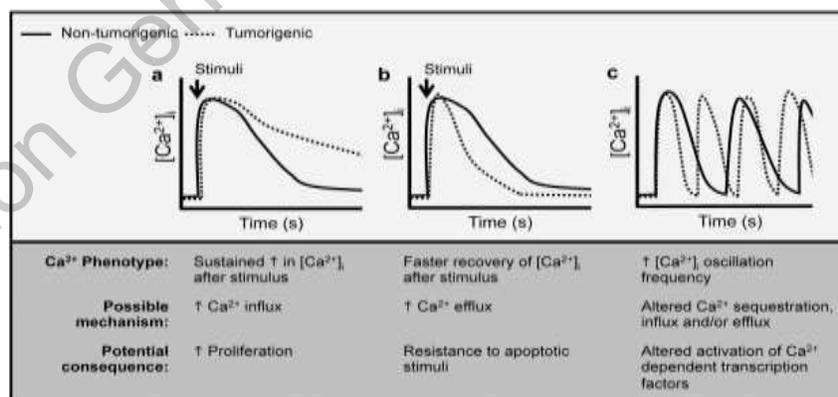


Figura 6. Ejemplos de remodelación hipotética de la señalización de Ca^{2+} , de células tumorogénicas y no tumorogénicas.

Cada representación estilizada de Ca^{2+} representa modelos de diversos aspectos de las vías de señalización de Ca^{2+} intracelular, incluidos (a) vías de entrada de Ca^{2+} (b) vías de salida de Ca^{2+} y c) $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Fuente: T.A. Stewart et al., 2015.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de mama es el tipo de neoplasia más común y una de las causas más frecuente de muerte en la población femenina mundial (Nagini, 2017). Por esta razón, es necesario desarrollar alternativas terapéuticas para la prevención y/o tratamiento del cáncer de mama. Una alternativa a los agentes quimioterapéuticos convencionales, son los compuestos bioactivos de productos vegetales, principalmente frutos, algas, cereales, raíces, hojas, y leguminosas. Estas moléculas bioactivas están siendo ampliamente investigadas para la creación de fármacos y alimentos nutraceuticos (Ji et al., 2009).

García Gasca y colaboradores, han obtenido una fracción concentrada de lectinas (FCL) con efectos citotóxicos sobre células de cáncer de colon HT-29 (Ferríz-Martínez, 2014; García-Gasca, García-Cruz, et al., 2012). Actualmente, se produce una lectina recombinante (LR) con mayor rendimiento y que conserva su actividad citotóxica (Martínez-Alarcón, 2017). FCL también tiene una actividad citotóxica sobre células de cáncer de mama (MCF-7) y esta actividad es mayor en comparación al control (Díaz Betancourt, 2018; Ferriz-Martínez et al., 2015).

Se han descrito distintos mecanismos de acción, por los cuales, las lectinas ejercen su efecto. Nuestro grupo de trabajo se ha orientado en estudiar las respuestas inducidas a corto plazo y nos hemos enfocado hacia la activación de respuestas inducidas en los primeros minutos, asociado al papel que tienen los segundos mensajeros como en el caso del calcio. Las células de cáncer realizan modificaciones en la dinámica de calcio y a las proteínas que regulan su concentración en el citosol para favorecer su proliferación e inhibir señales que derivan en apoptosis (Dubois et al., 2013; Stewart et al., 2015). En lectinas de frijol Tépari, se reportan los primeros resultados sobre dinámica de calcio por Díaz-Betancourt A y Saldaña C., donde a través de mediciones de calcio citoplasmático en líneas celulares MCF-7 y MCF-12, determinan que FCL libera Ca^{2+} hacia el medio intracelular aumentando su concentración de manera dosis dependiente (Díaz Betancourt, 2018). Aún se desconoce si LR moviliza calcio como lo realiza FCL en ambas líneas celulares de mama y cuáles son los mecanismos por los cuales se activa la apoptosis. Es importante determinar si el calcio movilizado a corto plazo es capaz de inducir la transcripción de genes (marcadores moleculares) asociados a la homeostasis de calcio y si estos eventos inducen cambios en la actividad mitocondrial.

IV. JUSTIFICACION

Se necesitan más estudios para determinar si LR moviliza calcio citoplasmático, de forma diferencial sobre células MCF-7 en comparación con MCF-12, como lo hace la FCL. Estos resultados permiten ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de acción de FCL y LR para producir la muerte celular programada. Caracterizar la función mitocondrial y la dinámica de calcio es importante cuando se investigan intervenciones terapéuticas y se seleccionan nuevos agentes para el tratamiento de cáncer (Lim et al., 2017). Es importante determinar si el calcio movilizado a corto plazo es capaz de inducir la transcripción de genes (marcadores moleculares) asociados a la homeostasis de calcio y si estos eventos inducen cambios en la actividad mitocondrial.

Los resultados de este estudio serán relevantes para otros estudios *in vitro* sobre los efectos citotóxicos y proapoptóticos de FCL y LR en esta y otras líneas celulares. El conocimiento sobre los mecanismos de acción sobre los efectos anti-proliferativos y citotóxicos de FCL y LR pueden ser conducidos hacia otros estudios relacionados con modelos *in vivo*, estudios preclínicos para otros tipos de cáncer, y hacia el diseño de fármacos y nutraceuticos, como agente terapéutico o suplemento en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama.

V. HIPÓTESIS

LR y FCL movilizan calcio en células MCF-7 y MCF-12, de forma dosis-dependiente y diferencial, de forma tal que el cambio en la señalización de calcio está relacionado con la actividad mitocondrial.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

VI. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los mecanismos celulares involucrados en la movilización de calcio citoplasmático en las líneas celulares MCF-7 y MCF-12 en presencia de FCL y de LR.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar el proceso de **movilización de calcio** dosis dependiente de FCL o LR en las líneas celulares MCF-7 y MCF-12.
2. Identificar diferencias en la **actividad mitocondrial** tras la aplicación de los tratamientos con FCL o LR en las líneas celulares MCF-7 Y MCF-123.
3. Determinar la **viabilidad celular** a diferentes tiempos en presencia de tratamientos de Fracción Concentrada de Lectina o Lectina Recombinante en las líneas celulares MCF-7 y MCF-12.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Reactivos

Penicilina y estreptomicina de Gibco BRL (Gaithersburgh, MD), ácido plurónico, albúmina sérica bovina (BSA), dimetil- sulfoxido (DMSO), solución Krebs, Tampón fosfato salino (PBS), Suero Fetal Bovino (FBS), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) de Gibco® (Gaithersburg, USA), Fluo-4AM™ de Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), AlamarBlue® de Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), y MitoTracker™ Green FM de Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA).

7.2. Pruebas de aglutinación y cuantificación de proteína.

La cuantificación de proteína se determinó por el micro-método de Bradford (Bradford, 1976).

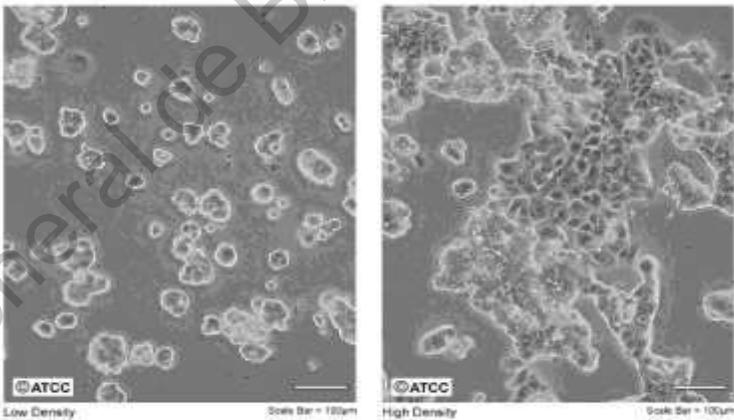
Las pruebas de hemaglutinación se realizaron colocando en el primer pozo 100 µL de PBS 1X como control negativo, en el siguiente pozo se agregaron 100 µL de proteína, en el primer pozo de una placa de 96 pozos, luego 50µL de PBS a partir del pozo 2 hasta el pozo 12. Del primer pozo se tomaron 50µl de la solución de FCL y se pasaron al segundo pozo, de este segundo pozo se tomaron otros 50µL de la dilución y se pasaron al tercer pozo, siguiendo de la misma forma hasta el último pozo 12. Esto se hizo por triplicado. Finalmente se agregaron 50 µL de eritrocitos del tipo A+, en una concentración menor al 1% para cada pozo. Las placas se incubaron durante 8 h 36 °C y se almacenaron en refrigeración durante 24 h para su posterior observación al microscopio. 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:

$$AE = 2^n/mg$$

7.3. Cultivo celular

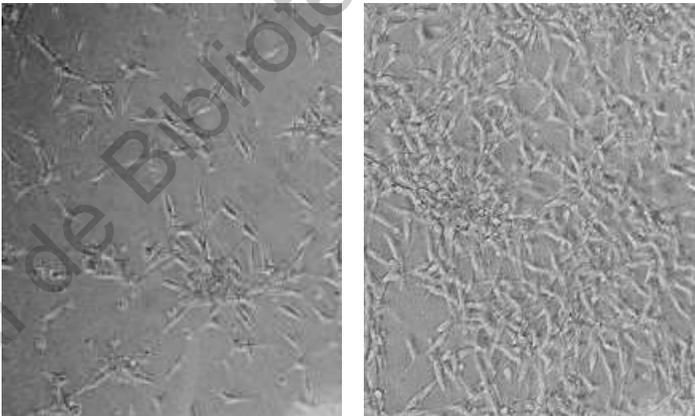
Se empleó la línea celular de cáncer de mama **MCF-7 (ATTC® HTB-22)** y la línea celular inmortalizada no transformada a cáncer **MCF-12F (ATTC® CRL-10783)** fueron proporcionadas por la unidad de Proteogenómica del INB, UNAM campus Juriquilla. Las características de cada población se muestran en la tabla 1 y 2.

Tabla 1. Descripción de la población: MCF-7 ATTC® HTB-22.

Características principales de líneas celulares de cáncer de mama	
Línea celular MCF-7	<ul style="list-style-type: none"> ❖ <i>Homo sapiens</i>, sexo femenino, caucásica, 69 años. ❖ Proveniente de glándula mamaria, obtenida a través de derrame pleural. ❖ Adenocarcinoma, epitelial, crece de forma adherente y forma cupulas. ❖ Procesa el estradiol a través de los receptores de estrógeno citoplásmicos ❖ Expresan el oncogén WNT7B. ❖ El crecimiento es inhibido por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa).
	<p>ATCC Number: HTB-22 Designation: MCF-7</p>  <p>Low Density Scale Bar = 100µm High Density Scale Bar = 100µm</p>

Fuente: (Brandes & Hermonat, 1983; Huguet et al., 1994; Pratt & Pollak, 1993; Soule et al., 1973)

Tabla 2. Descripción de la población MCF-12F ATTC® CRL-10783.

Características principales de líneas celulares de cáncer de mama	
Línea celular MCF-12	<ul style="list-style-type: none"> ❖ <i>Homo sapiens</i>, mujer caucásica, 60 años, nulipara. ❖ Proveniente de glándula mamaria, inmortalizadas espontáneamente, adherentes. ❖ No tumorigénica, epitelial, obtenida por mamoplastia de reducción con enfermedad fibroquística, que contenía áreas focales de hiperplasia intraductal. ❖ Obtenida por cultivo a largo plazo de medio sin suero con baja concentración de Ca²⁺. ❖ Derivada de las células adherentes en la población
	 <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> Low density High density </div>

Fuente: (Paine et al., 1992)

El cultivo de células se hizo de acuerdo con el manual de la ATCC. El medio base fue DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) formulado por Gibco con número de catálogo es 1199595065. Las células fueron sembradas en cajas Petri en medio DMEM (suplementado con 5% de Suero Fetal Bovino, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomina). El subcultivo de células se hizo partir de una caja Petri de 60 mm el medio confluyente en un 80%, se realizó de la siguiente manera. Se retiró y desechó el medio base de la caja de cultivo (primaria). Se enjuagó la capa celular con 3 mL de solución de Verseno (véase tabla 3) por

un minuto y se aspiró. Posteriormente se agregó solución de tripsina (300 μ L) y se incubó por seis minutos a 37 °C. Se agregaron 3 mL de medio DMEM y se resuspendieron las células. Se observaron las células bajo un microscopio invertido para asegurar la dispersión del monocapa celular. Se sembraron en otra caja de cultivo (secundaria), sobre vidrios de 12 mm marca WPI, 150 μ L de medio con células. A la caja de cultivo primaria se le añadieron los ml necesarios restantes de medio DMEM para completar un volumen total de 3 mL. Se incubaron las células a 37 °C con una atmosfera 5% de CO₂ y 95% de O₂. El subcultivo se realizó cada dos días para mantenerlas en confluencia.

Tabla 3. Componentes del verseno.

Verseno (1x, pH 7.4, 1L)	Componentes	Masa	Molaridad
PBS (Phosphate Buffered Saline)	NaCl (<i>mw</i> : 58.4 g/mol)	8 g	0.137 M
	KCl (<i>mw</i> : 74.551 g/mol)	200 mg	0.0027 M
	Na ₂ HPO ₄ (<i>mw</i> : 141.96 g/mol)	1.44 g	0.01 M
	KH ₂ PO ₄ (<i>mw</i> : 136.086 g/mol)	240 mg	0.0018 M
	EDTA (<i>mw</i> : 292.24 g/mol)	200	0.6 M

Abrev, mw: peso molecular

7.4. Movilización de calcio

Se utilizó la sonda fluorescente Fluo 4-AM que cuantifica las concentraciones de Ca²⁺ citoplasmático en el rango de 100 nM a 1 μ M. Los ésteres de acetoximetil (AM) le confiere una carga neutra, por lo que puede atravesar la membrana celular (Ver figura 7). Una vez dentro de la celda, las esterasas escindirán los grupos AM. Por su naturaleza quelante de calcio, se une a éste y su fluorescencia aumenta drásticamente con un máximo de emisión a 525 nm adecuado para detectores de uso convencional. Este gran cambio en la fluorescencia junto con un buen rendimiento de fotones proporciona un contraste muy alto que permitió la detección de eventos microscópicos de liberación de Ca²⁺ dentro de las células (Gee et al., 2000).

Los cambios en la concentración intracelular de ([Ca²⁺]_i) fueron registrados después de 24 h de cultivo. Se cargaron las células MCF12 y MCF7, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubaron por 30 min a temperatura ambiente con 5 μ M de Fluo4-AM (Thermo

Fisher Catálogo F14201, 2020) en solución Krebs, 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 y LR, 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, et al., 2009).

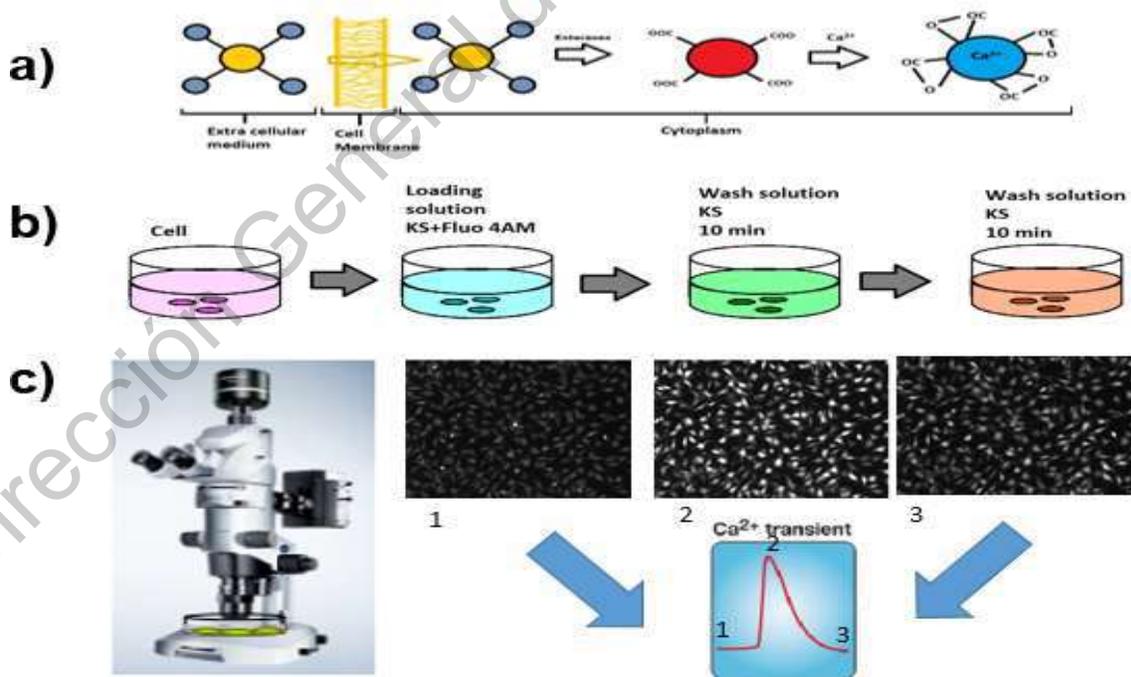


Figura 7. Movilización de calcio intracelular.

A) Sonda fluorescente Fluo- 4AM B) Protocolo de cargado C) Microscopio MV10 y análisis de imágenes.

Tabla 4. Componentes de la solución Krebs.

Solución Krebs (1x, pH 7.4, 1L)		
Componentes	Masa	Molaridad
NaCl (pm: 58.4 g/mol)	8.7 g	150 mM
KCl (pm: 74.551 g/mol)	74.5 mg	1 mM
MgCl ₂ (95.211 g/mol)	203 mg	1 mM
CaCl ₂ (110.98 g/mol)	265 mg	1.8 mM
HEPES (238.3012 g/mol)	2.4 g	10 mM
Glucosa (180.156 g/mol)	721 mg	4 mM

7.5. Actividad mitocondrial

Se utilizó la sonda Mito Tracker™ Green FM, que es un colorante de carbocianina, su fluorescencia se ha utilizado como una medida de la masa mitocondrial independiente de potencial de membrana mitocondrial negativo (MMP). Actualmente se sugiere que la proporción de fluorescencia es una medida relativa de la MMP independiente de la masa mitocondrial (Pendergrass et al., 2004). Un nuevo atributo de los tintes como Mito Tracker™ Green FM es su grupo clorometilo, que permite que los tintes se unan al grupos tiol de proteínas celulares y péptidos (Poot et al., 1996).

Se cultivaron las células en portaobjetos de vidrios estériles dentro de cajas Petri, se agregó solución Krebs con ácido plurónico y la sonda diluida (Mitotraker™ Deep Red) al 0.5µM y se incubaron por 5 min, se lavaron una vez por 5 min con solución Krebs (pH 7.4) y se le agregaron las distintas concentraciones de FCL y LR al 10% del volumen de Krebs agregado para su observación al microscopio. Se utilizaron los siguientes filtros de emisión-excitación, 633–665 nm. Las células cargadas en los vidrios se observaron y colocaron en un microscopio OLYMPUS MVX-10 acondicionado con un objetivo MUlapoTLAO2XC 20 X Olympus para obtener la fluorescencia emitida por Mitotraker™ Deep Red, y una cámara XM 10 tomándose 1 captura por minuto durante 30 minutos. Los niveles de fluorescencia, obtenidos en UFA's de los ROIs seleccionados se graficaron con respecto al tiempo con el software del fabricante del microscopio (Cell^P Olympus) e *Image J* (NIH. USA), se utilizó el

software Origin Pro para graficar y analizar la pérdida de la integridad mitocondrial durante el tratamiento con lectinas.

7.6. Viabilidad celular

Para evaluar el efecto de las lectinas sobre la viabilidad celular se utilizó el protocolo de Alamar Blue® (Catálogo DAL 1025 Alamar Blue ThermoFisher, 2020) que detecta el ambiente reductor de las células vivas. No es tóxico y no es necesario matar a las células durante el ensayo para obtener mediciones. Alamar Blue® monitorea el ambiente reductor de la célula viva (Ver figura 8). El ingrediente activo es resazurina (nombre IUPAC: 7-hidroxi-10-oxidofenoxazin-10-io-3-ona), es soluble en agua, estable en medio de cultivo. Es un tinte azul no fluorescente que se reduce a la resorufina de color rosa, altamente fluorescente. Alamar Blue actúa como un aceptor de electrones intermedio en la cadena de transporte de electrones, cuando el indicador acepta electrones (Rampersad, 2012) . La cantidad de resorufina producida es proporcional al número de células viables que se cuantifican en un fluorómetro de microplaca con un conjunto de filtros de excitación de 560 nm / emisión de 590 nm (Riss et al., 2004).

El ensayo se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante, se utilizaron dos cajas de 96 pozos, uno para la línea celular MCF-12 y otro para MCF-7. De cultivos confluentes y con una tasa de división de 24 h. Las células se contaron en una cámara de Neubauer y se extrapoló al volumen total. Cada pozo contenía 5,000 células, se diluyó en 1 mL de Alamar Blue® en 10 mL medio de cultivo DMEM, se agregaron 20 µL de tratamiento con FCL a las concentraciones de 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 mg/mL, 10 mg/mL, 100 mg/mL, 1 mg/mL. Se añadieron controles de glucosa (500 mM), taspigargina (5 µM), baselga (12%), tritón (0.1%) así como controles positivos y negativos con PBS y sin células. Las mediciones se realizaron a los 10 min, 30 min, 2 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, y 72 h de incubación a 37 °C. Se midió la fluorescencia en un espectrofotómetro Varioskan (Thermo Fisher Scientific, LUX multimode reader) a una longitud de onda de excitación de 560 nm y de emisión a 590 nm. Finalmente, los resultados se analizaron comparando la intensidad de la fluorescencia con las concentraciones de FCL (AlamarBlue® Cell Viability Assay Protocol, ThermoFisher).

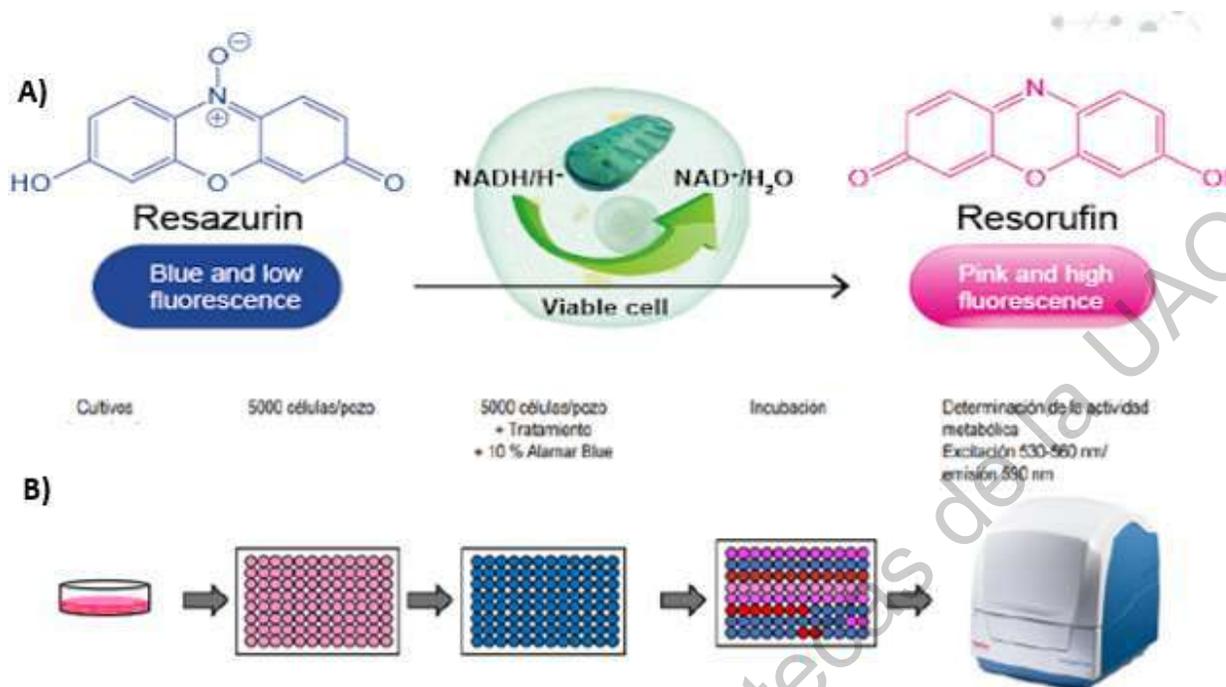


Figura 8. Protocolo Alamar Blue.

A) Fundamento del ensayo de Alamar Blue® (Fuente: www.abpbio.com) B) Protocolo de Alamar Blue® utilizado (Fuente: *Morales-Tlalpan V; Saldaña C. 2018*).

7.7. Análisis estadístico

Los resultados se presentarán como el valor promedio \pm error estándar de la media (SEM). Las diferencias entre los grupos múltiples se analizarán mediante ANOVA de una vía y una prueba post hoc de Tukey. Se utilizará el software Origin Pro v8.0724, 2018 y GraphPad Prism versión 9, 2020. Considerando un valor de probabilidad (P) inferior a 0,05 para indicar significación estadística.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Cuantificación de proteína por Bradford

Se obtuvo una concentración final de la Fracción Concentrada de Lectina de 429 mg/ml con una curva estándar de $R^2 = 0.9846$. Para la lectina Recombinante el rendimiento fue menor con una concentración de proteína de 139 mg/ml y una $R^2 = 0.9468$ (fig. 9).



Figura 9. Curva de cuantificación de proteína en FCL y LR.

El rendimiento de cuantificación de proteína para FCL es mayor considerando que se trata de una fracción de varias proteínas. En cambio, en LR, al tratarse de un sistema recombinante se expresada mayoritariamente LN2. Para homologar la concentración de proteína LN2 de FCL respecto a LR se requiere realizar un gel para mayor certeza. Sin embargo, para efectos de este estudio se utilizan estas concentraciones (fig. 9).

8.2. Pruebas de eritroaglutinación

Se muestran los resultados de la prueba de aglutinación con el control negativo con PBS, el pozo 1 con la concentración más alta 10 mg/ml de liofilizado diluido en PBS, el pozo 9 fue el último donde se observó aglutinación con una concentración de 0.1 ng/ml de liofilizado en PBS (Fig. 10).

Las unidades de aglutinación (UA) fueron las siguientes:

$$AE = 2^n/mg = 2^9/0.429 \text{ mg} = 1201.88 \text{ UA}$$

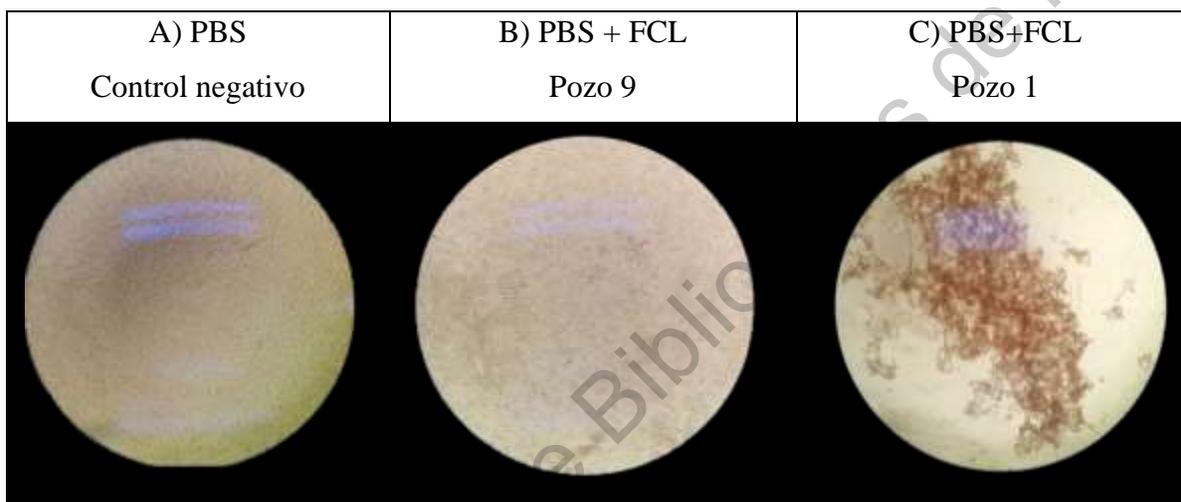


Figura 10. Prueba de eritroaglutinación.

Se realizaron diluciones dobles seriadas con eritrocitos humanos del grupo A+ al 2%. A) Se utilizó PBS como control negativo. B) Primera dilución con 100 μ L de FCL (1 mg/ml). C) Dilución 9 con 100 μ L de FCL (0.1 ng/ml). Las imágenes fueron observadas en un microscopio invertido a 10x.

Algunas lectinas como las presentes en FCL son capaces de reconocer hidratos de carbono en la superficie de eritrocitos humanos. La hemaglutinación se define como la agregación de eritrocitos mediada por macromoléculas específicas (anticuerpos o lectinas) que reconocen estructuras moleculares determinadas (antígenos) sobre la superficie celular (Rodríguez et al., 2005). La distribución de los ligandos en la superficie de la membrana es lo que media la aglutinación la cual depende de la afinidad y del sitio de unión específico. La FCL tiene un subfracción (PA) con mayor afinidad por eritrocitos de tipo A+. Estos datos concuerdan con lo reportado anteriormente (Dena Beltran, 2020; Díaz Betancourt, 2018).

8.3. Determinación de transitorios de calcio basales

Los resultados se presentan como el cambio relativo de la fluorescencia determinado en UFA's (Unidades de Fluorescencia Arbitarias) donde se grafica la respuesta en el aumento del calcio citoplasmático en relación al tiempo (1 captura por segundo) de forma cualitativa. Los resultados fueron normalizados de 0 a 1. El primer experimento se realizó sin la adición de compuestos bioactivos, se observa movilización de calcio que corresponde a mecanismos de las células activados en condiciones basales, las respuestas no se activan en el mismo momento, por lo tanto, no se observa un mecanismo ON y OFF al graficar varias células en distintos momentos. También las respuestas suelen ser más cortas que al momento de interactuar con un fármaco. Se observan diferencias en los transitorios basales de MCF-12 con respecto a MCF-7 (Fig. 11)

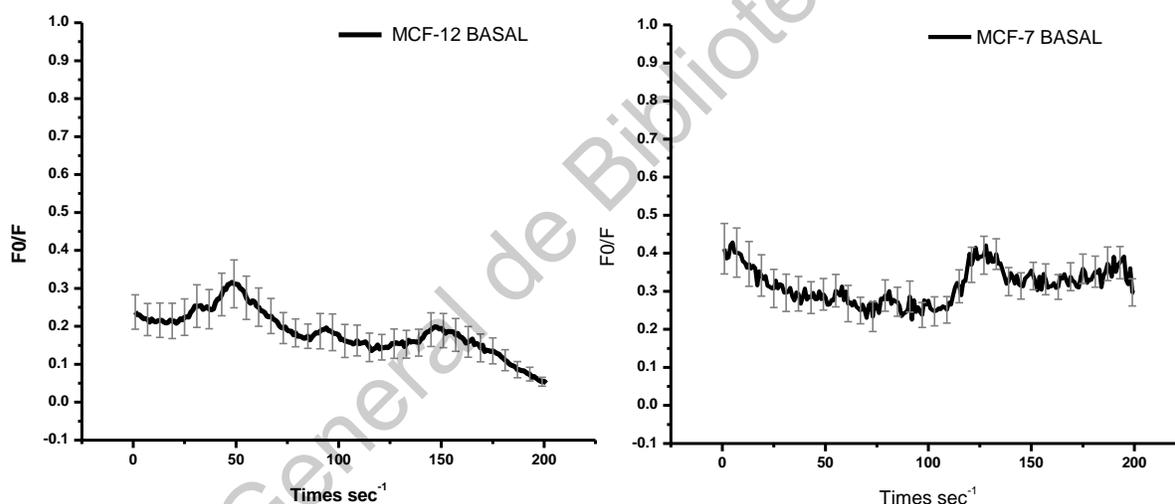


Figura 11. Determinación de transitorios de calcio basales en células MCF-12.

Se reporta el cambio en la fluorescencia con relación al tiempo. Las células fueron cargadas con el indicador FLUO 4-AM. Se graficaron 30 células por campo. Se muestra la media \pm el error estándar.

8.4. Determinación de transitorios de calcio en MCF-12 con FCL y LR

Los experimentos con dosis de 100 ng/ml de FCL y LR en MCF-12 muestran una respuesta mayor para FCL, ya que es una fracción de proteínas, se sugiere LN2 puede ser una proteína que se una a los receptores de la membrana plasmática y active la movilización de calcio (Fig 12). Los resultados muestran que la cantidad de calcio citoplasmático que se moviliza es mayor al calcio basal y se observa una respuesta a una concentración en el orden nanomolar de los compuestos bioactivos, lo que concuerda con lo reportado anteriormente donde se demuestra que FCL moviliza calcio en MCF-12 (Díaz Betancourt, 2018).

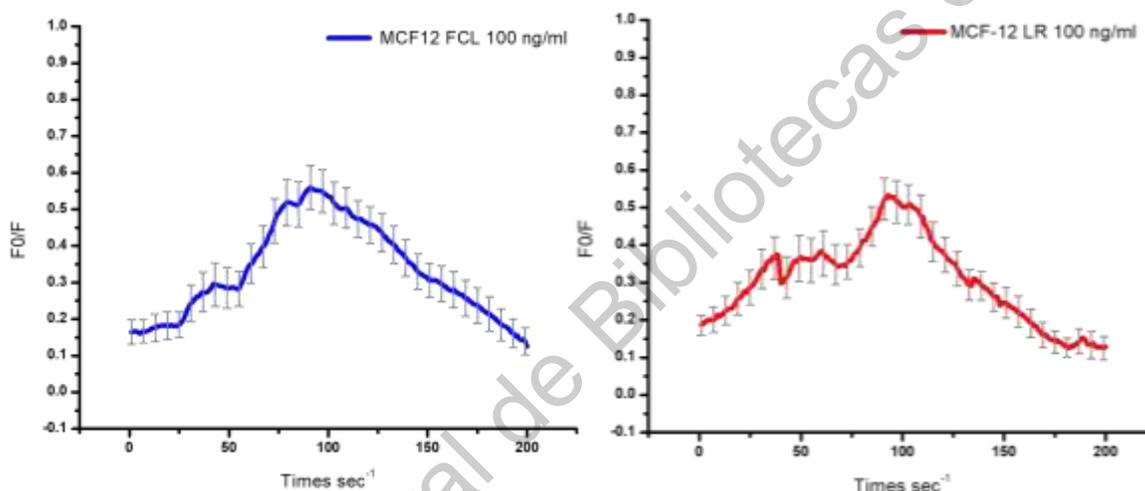


Figura 12. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL y LR en células MCF-12, utilizando una concentración de 100 ng/ml.

Se reporta el cambio en la fluorescencia con relación al tiempo. Las células fueron cargadas con el indicador FLUO 4-AM. Se graficaron 30 células por campo. Se muestra la media \pm el error estándar.

A concentraciones mayores de 10 $\mu\text{g/ml}$ se observa un mayor pico de respuesta (Fig. 13). Se puede distinguir el mecanismo ON (entrada de calcio) del mecanismo OFF (salida de calcio). El efecto de FCL sugiere ser mayor debido a que se observa una sola respuesta. Cuando se aplica LR, las células responden a diferentes tiempos, indicando una respuesta menor.

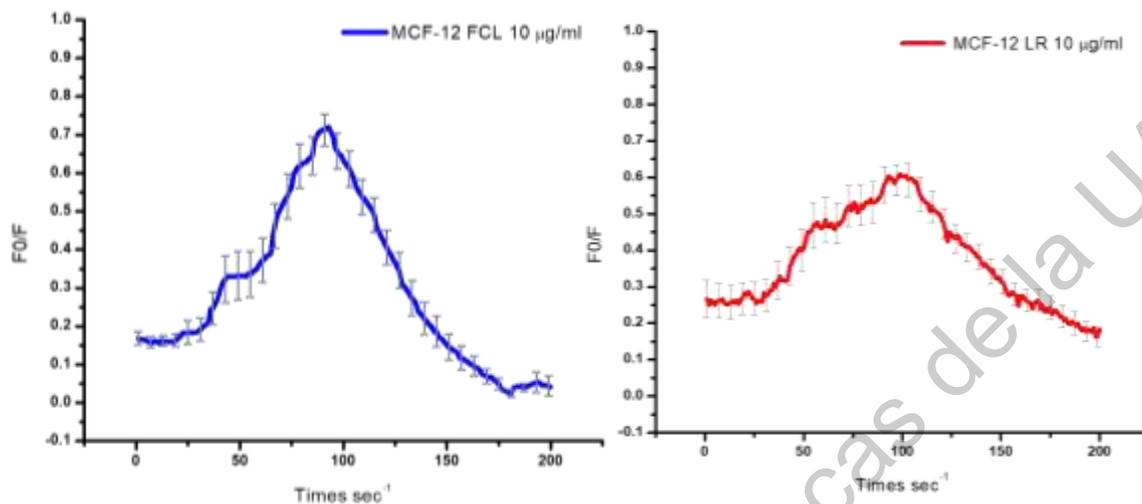


Figura 13. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL y LR en células MCF-12, utilizando una concentración de 10 µg/ml.

Se reporta el cambio en la fluorescencia en relación con el tiempo. Las células fueron cargadas con el indicador FLUO 4-AM. Se graficaron 30 células por campo. Se muestra la media \pm el error estándar.

Al utilizar una dosis mayor de 1 mg/ml se observa un solo pico de respuesta es decir la mayoría de las células responden al mismo tiempo y la respuesta es mayor al compararse con concentraciones menores probadas anteriormente (fig 14). Los datos sugieren que FCL y LR movilizan calcio en MCF-12, lo hacen de forma diferencial y dependiente de la concentración, el pico de activación de la respuesta es mayor para FCL en comparación con LR, sin embargo, esto puede deberse a la cantidad de proteína presentes en ambos fármacos.

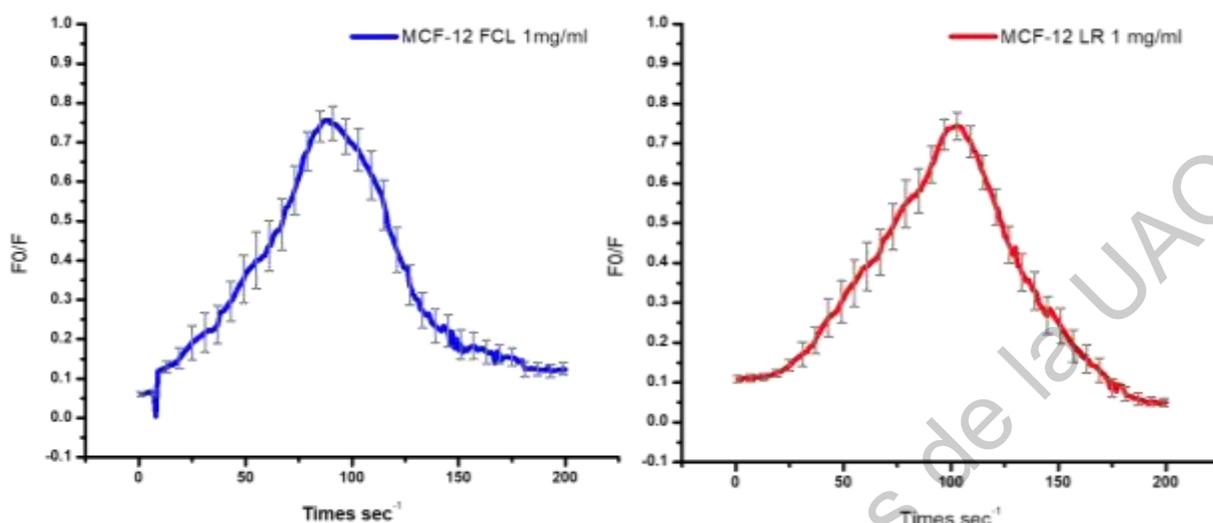


Figura 14. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL y LR en células MCF-12, utilizando una concentración de 1 mg/ml.

Se reporta el cambio en la fluorescencia en relación con el tiempo. Las células fueron cargadas con el indicador FLUO 4-AM. Se graficaron 30 células por campo. Se muestra la media \pm el error estándar.

Dado que la movilización de calcio en las células se observa a diferentes tiempos, no es posible determinar un tiempo de activación de la respuesta graficando varias respuestas en distintos tiempos, por lo tanto, se adaptó un modelo matemático denominado dosis-respuesta que permite obtener el tiempo medio de activación para cada célula. De esta forma, se calculó el tiempo medio de activación a la respuesta máxima del mecanismo ON de las tres concentraciones probadas y se obtuvo el tiempo medio de activación. Al graficarse cada una de las células de forma individual y obtenerse el tiempo medio de activación del mecanismo τ_{ON} se promediaron los tiempos de 30 células por vidrio. En la tabla 9 se presenta el promedio \pm DE τ_{ON} los tiempos de activación obtenidos. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre LR y FCL en las tres dosis probadas en MCF-12. En células control MCF-12 se observa movilización de calcio, sin embargo, esta respuesta no necesariamente puede activar muerte celular ya que la célula puede responder al cambio activando mecanismos de recaptura impidiendo la elevación sostenida de calcio, que finalmente podría llevar a la célula a activar mecanismos de muerte celular programada. El mantenimiento de los niveles de calcio es dinámico y tiene un efecto transitorio en función

del tiempo. En la apoptosis se producen variaciones sostenidas y pronunciadas de $[Ca^{2+}]_i$ (Berridge et al., 2003; Danese et al., 2017)

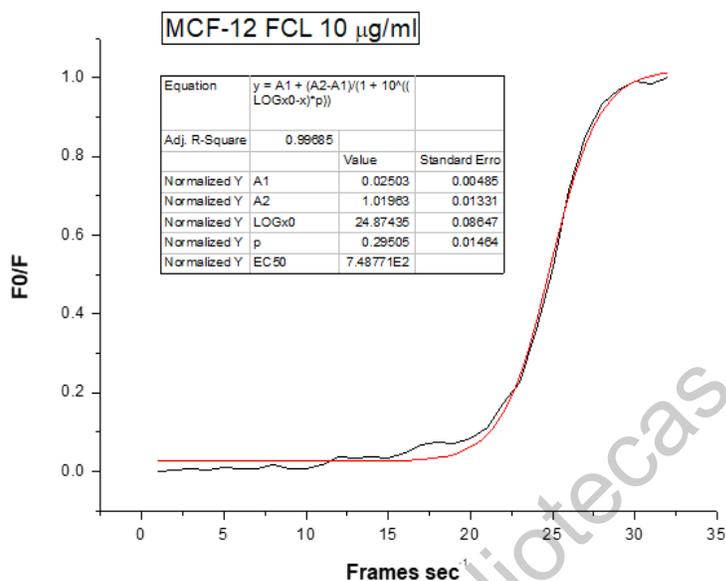


Figura 15. Determinación de la respuesta al pico, representación gráfica del Mecanismo TON y tiempo de activación de la respuesta.

Tabla 5. Tiempo medio de activación de la respuesta

Concentración del compuesto	FCL		LR		P
	X ₁ (s)	DE ₁ (s)	X ₂ (s)	DE ₂ (s)	
1 mg/ml	38	12	31	10	0.14
10 µg/ml	23	4	20	2	0.07
100 ng/ml	21	4	19	3	0.45

Se muestra el promedio de 30 células \pm desviación estándar del tiempo de activación para activar la movilización de calcio intracelular.

X= Mediana

DE= desviación estándar

8.5. Determinación de transitorios de calcio en MCF-7 con FCL y LR

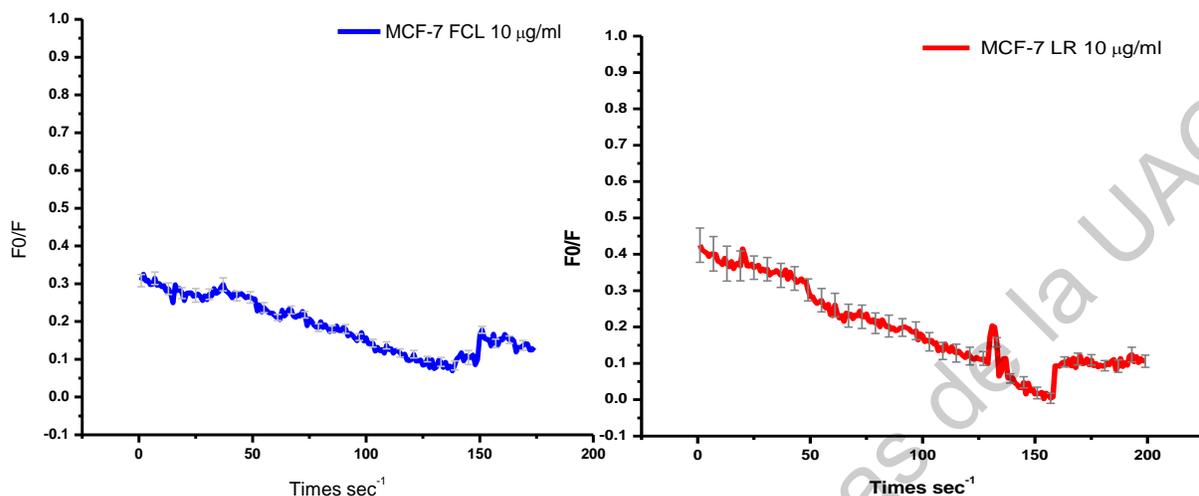


Figura 16. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL y LR en células MCF-7, utilizando una concentración de 10 µg/ml.

Se reporta el cambio en la fluorescencia en relación con el tiempo. Las células fueron cargadas con el indicador FLUO 4-AM. Se graficaron 30 células por campo. Se muestra la media \pm el error estándar.

Entre MCF-7 y células control MCF-12 se pueden observar diferencias claras en la dinámica de calcio. Tanto FCL como LR ocasionan cambios en los mecanismos ON y OFF. Los compuestos bioactivos presentes en fuentes vegetales naturales, pueden modular una o más vías de transducción de señales involucradas en la supervivencia de las células cancerosas para inhibir la viabilidad celular y la metástasis e inducir apoptosis y autofagia, entre otros mecanismos de muerte y supervivencia, todos estos procesos se activan al modificar la señalización de calcio que finalmente dan como resultado la inducción de muerte celular programada (Chino et al., 2017; Taing et al., 2015). Existen cambios en la expresión de los canales de calcio. Uno de los cambios que se presentan en células de cáncer de mama es la expresión de SERCA 3 (So et al., 2018). La activación de las células dependientes del calcio se inicia mediante la liberación de calcio del retículo endoplásmico por segundos mensajeros como el inositol-1,4,5- tris- fosfato. La acumulación de calcio en este organelo depende enteramente de la actividad de las enzimas SERCA. Por lo tanto, la extensión, las características espaciotemporales, la frecuencia y la amplitud de la recaptura de calcio desde el retículo endoplásmico son dependientes y moduladas por el transporte de calcio

dependiente de SERCA (retroalimentación negativa). Se sabe que las células MCF-12 tienen SERCA1 y SERCA2, 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 SERCA3 trunca, lo que provoca una reducción en la eficiencia para mantener la homeostasis celular de $[Ca^{2+}]_i$ (Morales-Tlalpan, datos no publicados). Mientras que SERCA3 se expresa abundantemente en el epitelio gástrico y colónico, la expresión de SERCA3 está disminuida en los adenomas de colon y se pierde en los adenocarcinomas, lo que demuestra que las proteínas que modulan la señal de calcio tienen un papel importante en el desarrollo de la enfermedad, diagnóstico y tratamiento por lo que se sugiere medir la expresión en tiempo real de estos canales y la utilización de fármacos para estudiar las modificaciones en la señalización de calcio.

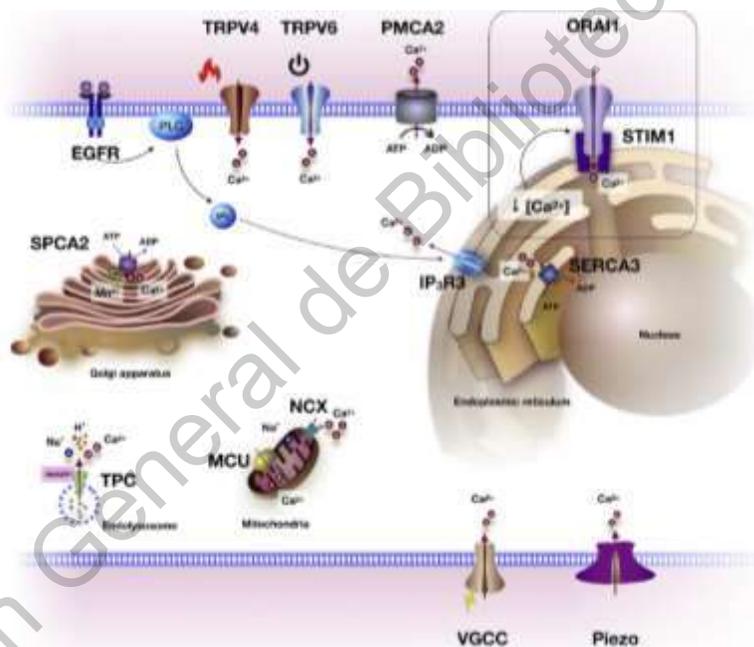


Figura 17. Ejemplos específicos de bombas, canales e intercambiadores de calcio que contribuyen a la señalización del calcio en las células del cáncer de mama.

Se sabe que la FCL y varias lectinas son capaces de reconocer glicosilaciones aberrantes expresadas en células de cáncer a través del único sitio de reconocimiento a oligosacáridos (Cruz, P. y col., 2005), de esta forma se favorece una acción sostenida en células transformadas (Castillo-Villanueva A. y Abdullaev F., 2005) lo que le confiere a FCL y LR una ventaja sobre otros compuestos bioactivos al tener respuestas diferenciales en células

sanas y transformadas. Lo que relaciona con los datos obtenidos de Saldaña C y Díaz-Betancourt A. que sugieren una elevación sostenida de calcio en MCF-7 y una respuesta de recaptura de calcio en las células control al interactuar con FCL (Fig 18). Los efectos diferenciales también se han sugerido en pruebas *in vitro* realizadas por Rivera *et al.*, sobre fibroblastos murinos tumorigénicos y su control no transformado, así también se ha descrito activación de la apoptosis en células HT-29 (Ferríz-Martínez, 2014; García-Gasca, García-Cruz, et al., 2012; Moreno-Celis et al., 2017).

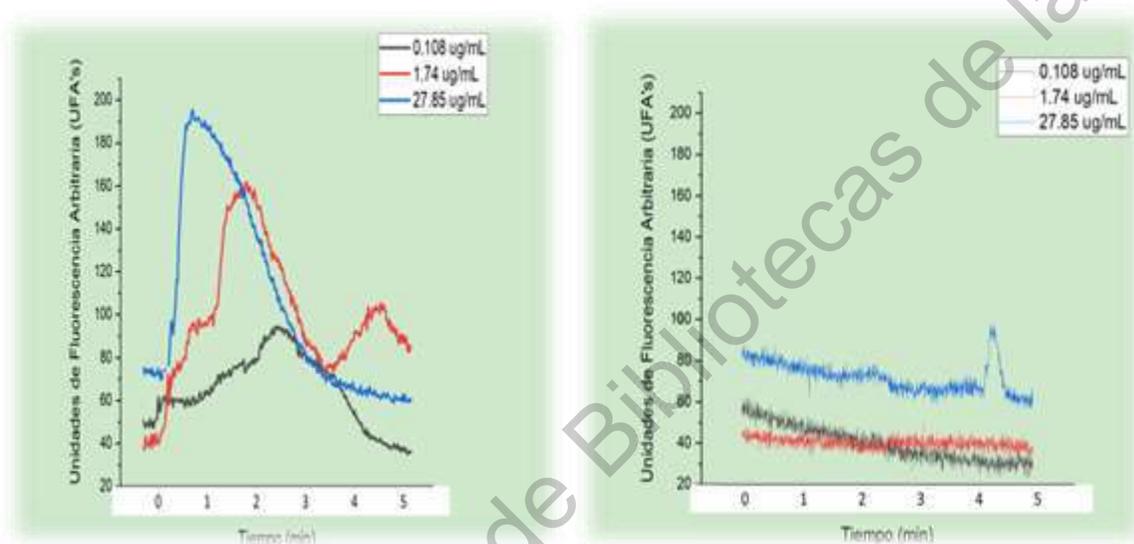


Figura 18. Determinación de transitorios de calcio inducidos por diferentes concentraciones de FCL en células MCF-12 y MCF-7.

Las células fueron cargadas con el indicador Fluo 4- AM. Fuente: Díaz-Betancourt, A; Saldaña, C. Tesis de maestría. 2018.

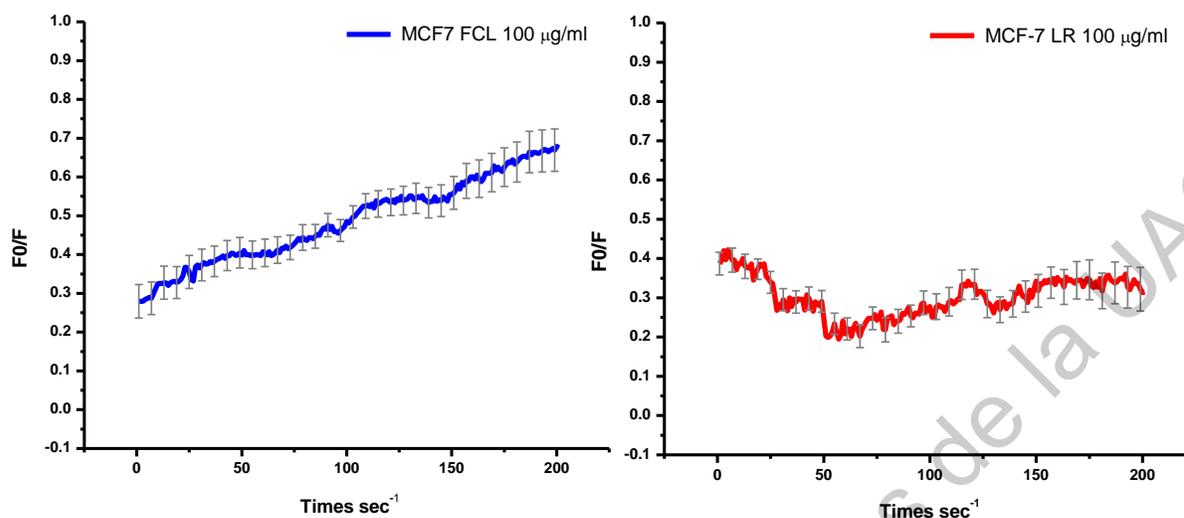


Figura 19. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL y LR en células MCF-7, utilizando una concentración de 100 µg/ml.

Se reporta el cambio en la fluorescencia en relación con el tiempo. Se puede observar la presencia de dos transitorios diferenciados a la concentración de 100 µg/ml. Las células fueron cargadas con el indicador FLUO 4-AM. Se graficaron 30 células por campo. Se muestra la media \pm el error estándar.

Se observa una menor respuesta en la movilización del calcio en dosis altas al comparar la respuesta de FCL y LR, a dosis de 10 µg/ml se registra una disminución de calcio citoplasmático, sin activarse el mecanismo de salida y recaptura de calcio durante el experimento (fig. 18). En concentraciones altas de 100 µg/ml existe una elevación del calcio citoplasmático para ambos compuestos (fig. 19). En el control (MCF-12) aún en concentraciones altas como 1 mg/ml se observa como la célula es capaz de responder activando el mecanismo de entrada y salida de calcio, mientras que en la línea celular MCF-7 se observan diferencias en las respuestas activadas por concentraciones de 100 µg/ml y 1 mg/ml. Anteriormente se ha demostrado que uno de los mecanismos de acción de la LR está relacionado con su interacción con el EGFR, lo que provoca su degradación por vía lisosomal en células de cáncer de colon en experimentos *in vitro*, así que LR mediante la interacción con el EGFR y la vía de señalización Akt en células de cáncer de colon puede activar la vía de caspasas, especialmente 9 y 3 (Dena Beltran, 2020; Ferríz-Martínez, 2014; Moreno-Celis et al., 2017). Como ya se sabe el ion calcio es un segundo mensajero ubicuo que controla una amplia variedad de eventos fisiológicos. Existe una regulación fina de la homeostasis del

Ca²⁺ intracelular por las proteínas anti y proapoptóticas, como las proteínas de la familia Bcl-2, esta señal alterada a la que están expuestas las mitocondrias y otros orgánulos induce muerte celular (Pinton et al., 2008)- Se propone la vía de estrés ER como mecanismo de activación de la apoptosis, como se observa, existe un incremento en el calcio citoplasmático en células MCF-7 y se sugiere que a través de un aumento en los niveles de Ca²⁺ en los compartimentos mitocondrial y/o citosólico, se active la vía de las caspasas. Las caspasas efectoras (caspasa-3) y luego se escinden sus sustratos, como la poli (ADP-ribosa) polimerasa (una enzima reparadora del ADN), actina, lamina y fodrina, lo que da como resultado cambios en la estructura celular. morfología y características bioquímicas de la apoptosis (Morishima et al., 2002; Pinton et al., 2008). Al mismo tiempo la caspasa-9 está relacionada con la vía intrínseca o mitocondrial (Sun et al., 1999). Para demostrar que el incremento de calcio promueve un estrés en retículo endoplásmico es necesario realizar experimentos más largos en ambas líneas celulares MCF-12 y de cáncer de colon, que demuestren que hay una elevación sostenida de Ca²⁺ citoplasmático en el tiempo. Diversos estudios de homeostasis y dinámica de calcio con compuestos bioactivos determinaron una concentración media de respuesta en el orden de microgramos, una deshidrocostuslactona proveniente de *Saussurea lappa*, y *Aucklandia lappa* en células NCI-H460, NCI-H520 y A549, movilizan calcio citoplasmático a una concentración de 15 µg/ml y finalmente activa mecanismos apoptóticos (Hung et al., 2010) y ácido gálico proveniente de un extracto de *Mangifera indica L (NMD)* en células MCF-7 a una concentración de 60 µg/ml moviliza calcio y su efecto está relacionado con una disminución en la proliferación (Taing et al., 2015). Es importante destacar que éstos son los primeros resultados que sugieren que las lectinas movilizan calcio en células de cáncer.

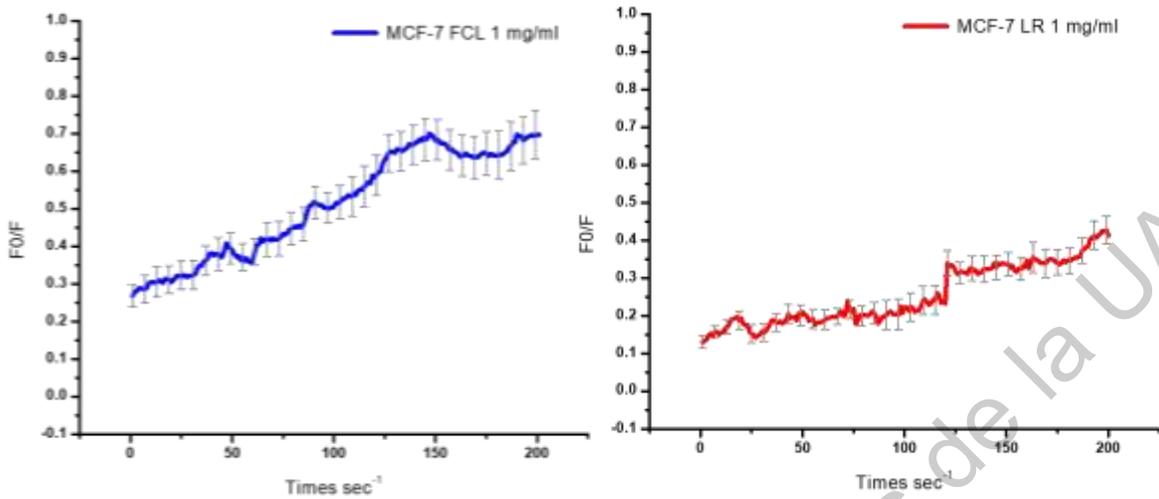


Figura 20. Determinación de transitorios de calcio inducidos por FCL y LR en células MCF-7 a una concentración de 1 mg/ml.

Se reporta el cambio en la fluorescencia en relación con el tiempo. Se puede observar la presencia de dos transitorios diferenciados a la concentración de 1 mg/ml. Las células fueron cargadas con el indicador FLUO 4-AM. Se graficaron 30 células por campo. Se muestra la media \pm el error estándar.

8.6. Actividad mitocondrial

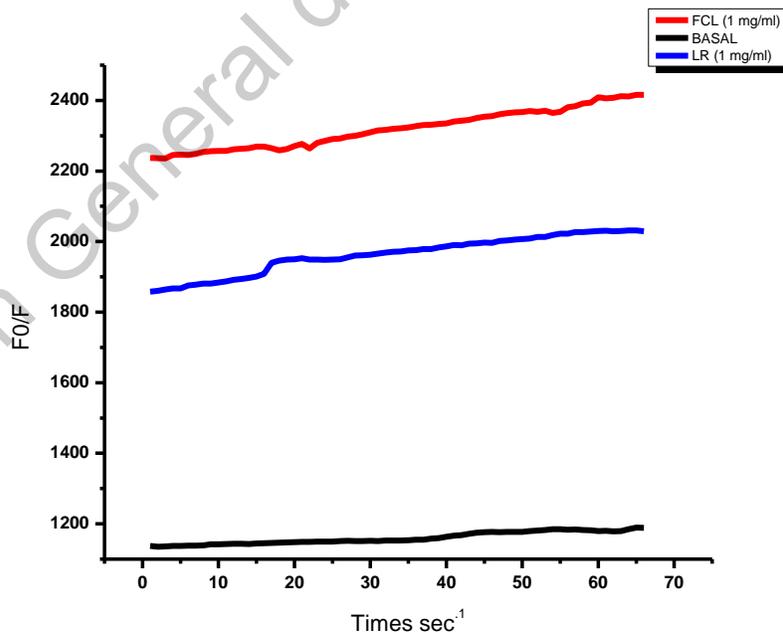


Figura 21. Imagen representativa del en la actividad mitocondrial después de aplicar los tratamientos con lectinas por media hora.

Se reporta el cambio en la fluorescencia en relación con el tiempo en MCF12.

Otro de los organelos involucrados en el control de calcio citoplasmático y que regula la vía intrínseca de la apoptosis es la mitocondria, en la figura 20 se observan las diferencias en el potencial mitocondrial en células MCF-12 a dosis altas de lectinas (1 mg/ml), se sugiere que hay un incremento del potencial de membrana mitocondrial interno probablemente por un aumento en la producción de ATP después de los tratamientos con LR y FCL. Lo que probablemente tendrá como resultado una pérdida del potencial y la sobrecarga de Ca^{2+} en las mitocondrias induce la inflamación mitocondrial, a través de la vía pro-apoptótica que conduce a la perturbación o rotura de la membrana externa, y el resultado es la liberación de factores apoptóticos mitocondriales en el citosol (Pinton et al., 2008). La sobreexpresión de Bcl-2 puede prevenir la reducción de la concentración de calcio en el RE, y también se cree que reduce la cantidad de Ca^{2+} liberada del RE (Shibasaki & McKeon, 1995). Además, la entrada de Ca^{2+} en las mitocondrias podría activar la liberación del citocromo C y mediadores de apoptosis en sentido descendente. Los miembros de la familia Bcl-2 están involucrados en la translocación de Ca^{2+} a las mitocondrias (Vanden Abeele et al., 2002). La producción de ROS intracelular también causa un agotamiento de glutatión (GSH) y la peroxidación lipídica. Debido a que GSH es un importante antioxidante en las células para controlar el estado redox, el agotamiento de GSH se considera como un indicador temprano de la progresión hacia la apoptosis debido al estrés intra y extracelular (Franco & Cidlowski, 2009). Además, la peroxidación lipídica inducida por ROS cambia las funciones mitocondriales integrales, incluida la respiración, las propiedades de barrera de la membrana interna, el mantenimiento de MMP y la homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial (Barrera, 2012). Los compuestos bioactivos pueden inducir estas vías de señalización que conducen a la muerte celular de la célula de cáncer activando la vía mitocondrial de la apoptosis. Compuestos como el carvacrol incrementa la producción de ROS y aumenta las concentraciones de iones de calcio en la matriz mitocondrial al interrumpir el MMP ($\Delta\psi$) en las células JAR y JEG3 (Lim et al., 2019). Se necesitan más estudios para determinar si las lectinas como FCL o LR aumentan la producción de ROS y disminuyen el MMP en las células MCF-12 y MCF-7 para determinar si la activación de la apoptosis está dada por estas vías.

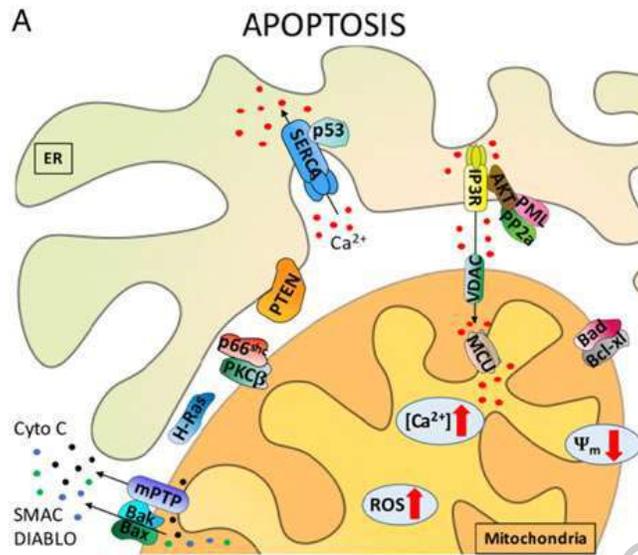


Figura 22. Activación de la apoptosis en la mitoncondria.
Fuente: Danese A, et al. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2017.

8.7. Viabilidad celular

En la figura 23 se indica el orden en el que fueron aplicados los tratamientos. En el ensayo de Alamar Blue se utilizaron siete concentraciones de lectinas. Los controles fueron de lectinas sin células, PBS sin células, PBS con células como control positivo, TX 100 0.1% como control negativo, glucosa (100 Mm) como control de proliferación celular. También se agregaron controles con tapsigargina (1 μ M) y baselga al 12 %.

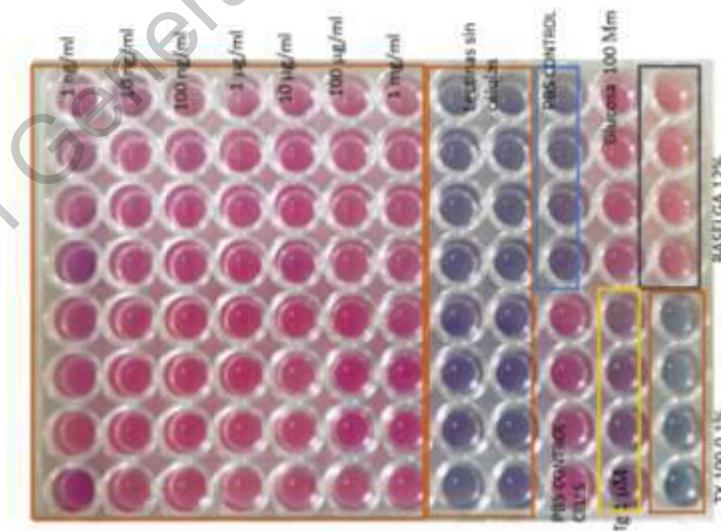


Figura 23. Ensayo de Alamar Blue y tratamientos aplicados de diferentes concentraciones de lectinas.

En la figura 24 se observan los ensayos de Alamar Blue® en las líneas celulares MCF-12 y MCF-7, se aplicaron los tratamientos de FCL con los controles, a la hora no se observan diferencias entre tratamientos, a las 48 h ya se observan diferencias en el cambio de color pudiendo detectarse las diferencias entre los controles y las diferentes dosis para MCF-12, en cambio para MCF-7 se observan diferencias entre los controles, pero no entre dosis de FCL. La forma reducida, resorufina, es rosa y muy fluorescente, y la intensidad de la fluorescencia producida es proporcional al número de células vivas que respiran, se pueden hacer lecturas cuantitativas (fluorométricas y colorimétricas) y cualitativas porque se observan cambios visibles de color indicando la presencia y ausencia de células viables (Rampersad, 2012). La decoloración del color rosa (extinción de la fluorescencia) generalmente ocurre después de tiempos de incubación muy prolongados debido a la formación de un producto incoloro llamado dihidroresorufina (Rampersad, 2012). La decoloración no se observó en este ensayo por lo tanto se puede sugerir que los tiempos de incubación fueron adecuados.

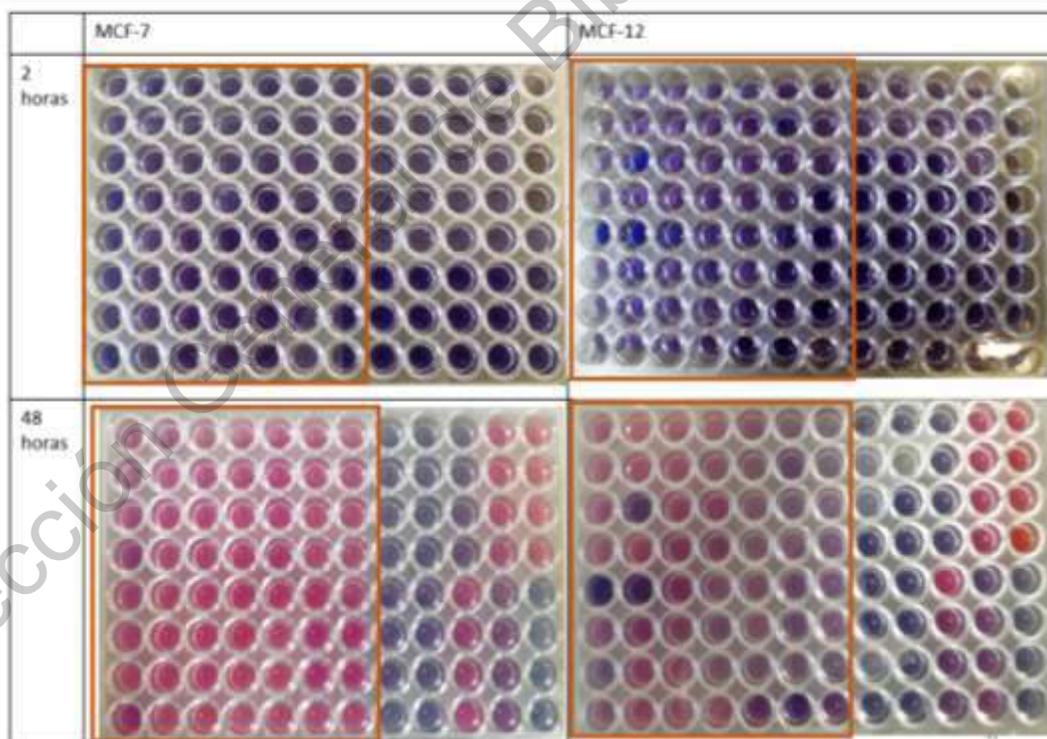


Figura 24. Ensayo de Alamar Blue en MCF-7 y MCF-12 a las 2 y 48 horas.

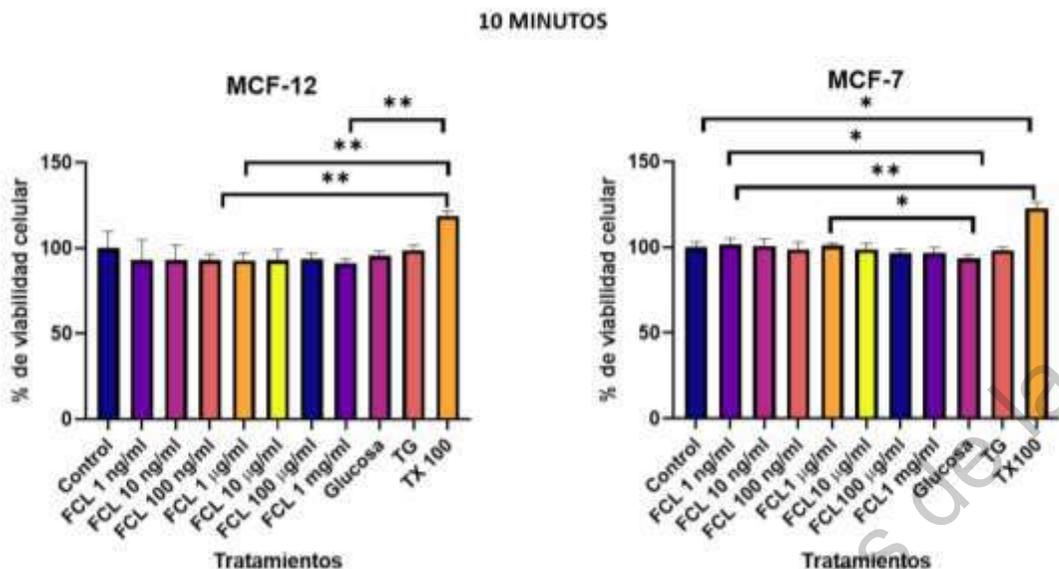


Figura 25. Porcentaje de viabilidad celular al 10 min de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con FCL.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

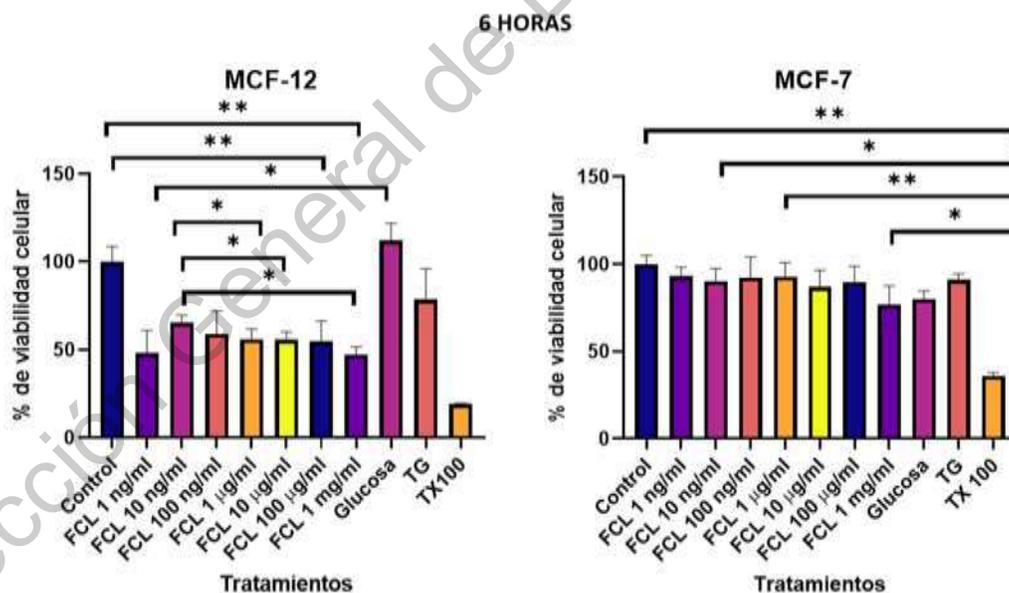


Figura 26. Porcentaje de viabilidad celular a las 6 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con FCL.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

Se graficaron las lecturas fluorométricas, a los 10 min se observan diferencias significativas respecto al control negativo y todos los tratamientos en la placa de MCF-12, en el caso de las MCF-7 se registran diferencias significativas entre tratamientos principalmente entre glucosa y las concentraciones de FCL 1 ng/ml y 1 µg/ml.

A las 6 h, los efectos de FCL son evidentes entre líneas celulares. En MCF-12 las diferencias son significativas entre el control y las dosis más altas de FCL, también hay diferencias entre el control positivo y la dosis más baja de FCL. Entre dosis hay disimilitudes principalmente entre 10 ng/ml vs las concentraciones más altas de 1 µg/ml, 10 µg/ml y 1 mg/ml. En MCF-12 las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos aún se registran más que entre el control negativo con el control y algunas concentraciones de FCL.

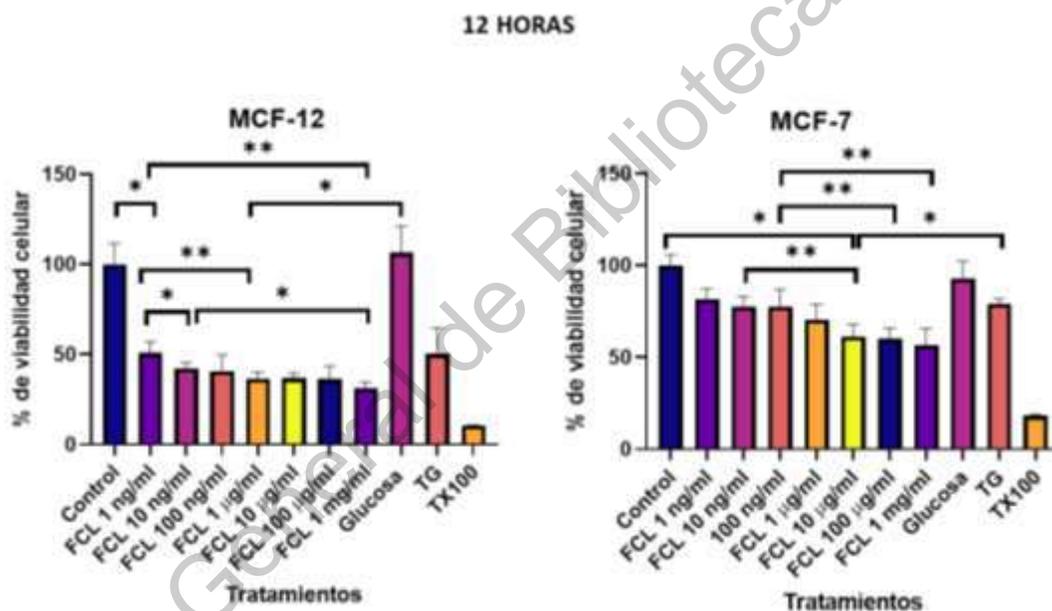


Figura 27. Porcentaje de viabilidad celular a las 12 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con FCL.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

A las 12 h, en la caja de MCF-12, ya se demuestran significancias entre el control y las dosis más baja, también entre la dosis de FCL, 1 ng/ml vs 10 ng/ml. Diferencias entre 10 ng/ml y la concentración más alta de 1 mg/ml, y entre el control de proliferación (glucosa) y 1 µg/ml. En MCF-7, se observan diferencias entre dosis 10 ng/ml vs 10 µg/ml.

24 HORAS

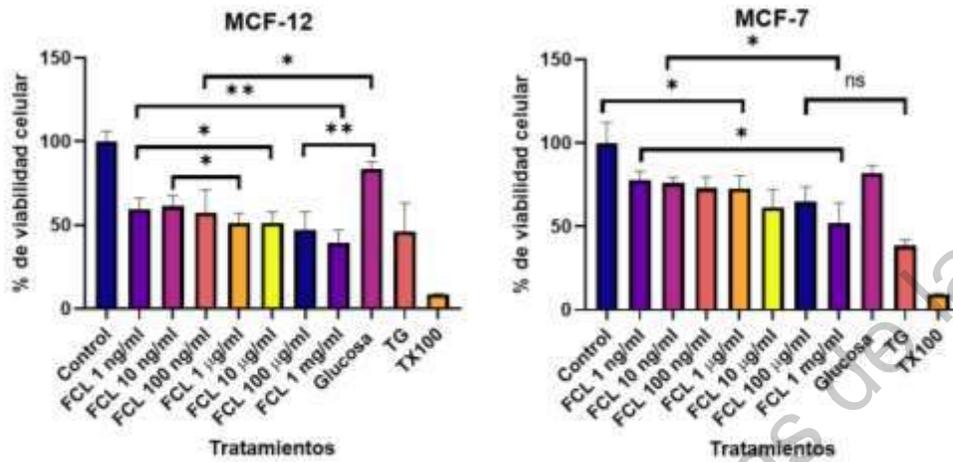


Figura 28. Porcentaje de viabilidad celular a las 24 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con FCL.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

48 HORAS

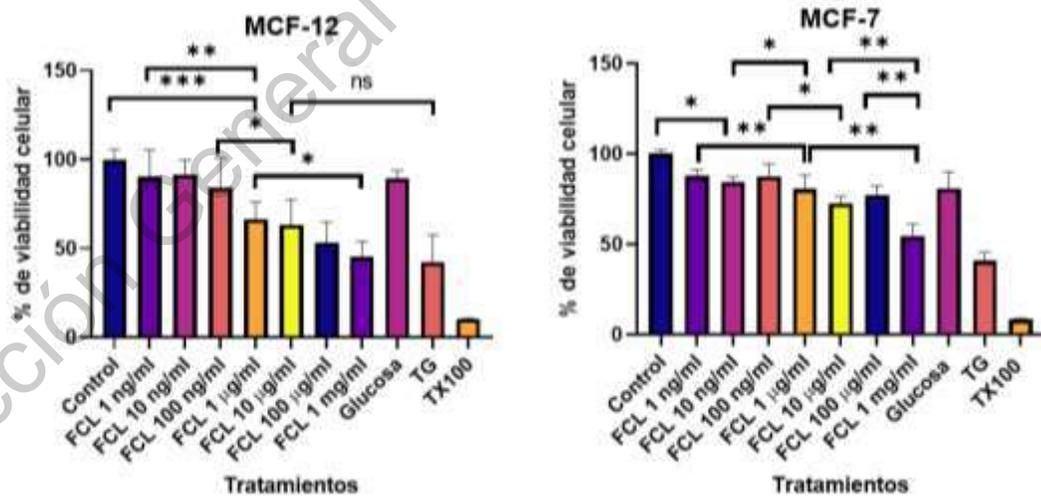


Figura 29. Porcentaje de viabilidad celular a las 48 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con FCL.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

A las 24 h, se observa un aumento de la viabilidad celular respecto a las 12 h en MCF-12, el control respecto a todas las dosis de FCL muestra una mayor proliferación celular, se registran diferencias significativas entre la menor concentración del fármaco 1 ng/ml y 10 µg/ml, también entre 1 ng/ml y la concentración mayor de 1 mg/ml, entre 10 ng/ml y 1 µg/ml. En las MCF-7 se registra la mayor respuesta anti-proliferativa del fármaco FCL a las 14 horas, hay diferencias significativas entre el control y la dosis de 1 µg/ml y entre las concentraciones de 10 ng/ml, ya no existen diferencias entre la concentración de 100 µg/ml. A las 48 horas se registra un aumento de la viabilidad celular sobre todo en las concentraciones más bajas, en ambas líneas celulares. En MCF-12 se observan diferencias entre el control y la dosis de 1 µg/mg y no hay diferencias entre 10 µg/ml y tapsigargina. En MCF-7 hay diferencias respecto al control y la dosis de 10 ng/ml y entre 1 µg/ml y 1 mg/ml.

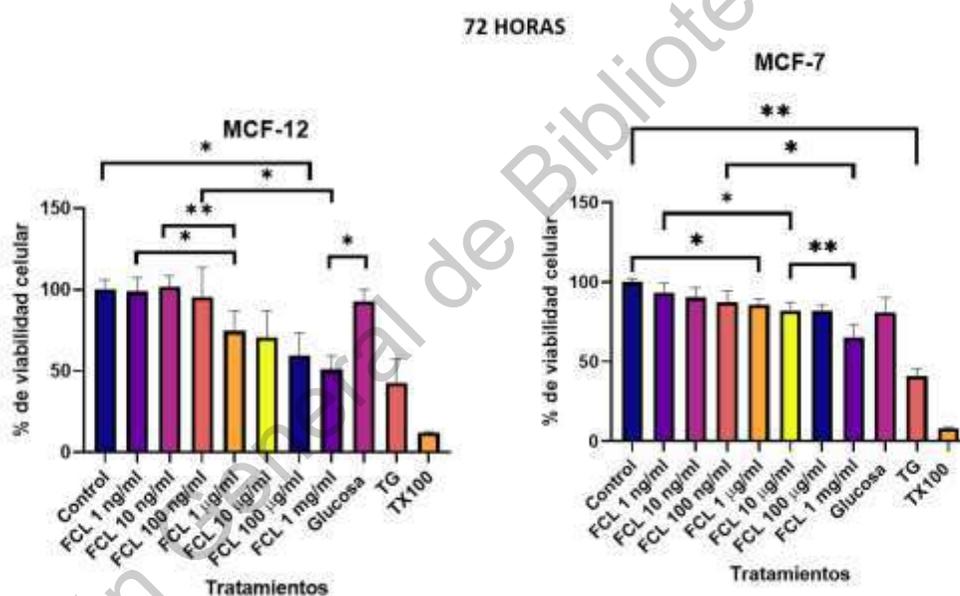


Figura 30. Porcentaje de viabilidad celular a las 72 h de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con FCL.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

Se sugiere que FCL disminuye el porcentaje de viabilidad celular en todas las dosis observadas tanto en MCF-12 como en MCF-7, la respuesta es mayor con relación al tiempo, se observa una mayor respuesta a los tratamientos de lectina en MCF-12, a las 12 horas se registra el menor porcentaje de viabilidad y después se observa un aumento de la proliferación, se registra que las concentraciones menores de FCL producen un efecto

proliferativo mayor al control. En MCF-7, la menor respuesta se registra a las 24 horas, el porcentaje de viabilidad es mayor en comparación del efecto de la lectina en MCF-12, después de las 24 horas se observa una recuperación de la respuesta, a las 72 horas las dosis menores son similares al control.

Estos resultados son similares a los reportados anteriormente en el laboratorio donde se obtuvo una respuesta acorde a la evolución de la dosis-respuesta con FCL en ambos tipos celulares, se reportó también una menor actividad metabólica en MCF-12 en comparación con MCF-7 (Díaz Betancourt, 2018).

Estos datos difieren de lo demostrado en estudios *in vitro* se reportó un menor porcentaje de sobrevivencia en la línea CaCO₂, al compararse con la línea celular no transformada a cáncer IEC-18, para lograr un efecto similar en la toxicidad se utilizó una dosis tres veces menor para CaCO₂ que la administrada a células normales de colon (López-Sánchez et al., 2010).

IX. CONCLUSIONES

FCL y LR movilizan calcio de manera dosis-dependiente al espacio intracelular en células MCF-12 de manera dosis-dependiente, se registran los mecanismos τ ON y τ OFF, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos de activación de FCL vs LR. Ambas lectinas movilizan calcio en MCF-7, de manera diferencial al control donde se observa una respuesta más sensible, el mecanismo τ ON se prolonga en el tiempo, y la respuesta es dependiente de la dosis. Se observan respuestas a dosis bajas del fármaco. En MCF-12 se observan cambios en la dinámica de calcio, lo que podría explicar en parte sus efectos diferenciales observados en la línea control.

FCL y LR aumentan el potencial mitocondrial a dosis altas (1 mg/ml) lo que podría estar relacionado con la síntesis de ATP, el cual podría ser un mecanismo de la activación de apoptosis en MCF-12.

Esto concuerda con los datos obtenidos de los ensayos de viabilidad celular, donde se observan respuestas diferentes en el tiempo entre líneas celulares, el porcentaje de viabilidad celular fue menor en MCF-12 después de los tratamientos con FCL. La línea celular MCF-12 tuvo una respuesta en un lapso mayor en el tiempo con una respuesta sostenida en el tiempo. En la línea celular MCF-7 hubo una recuperación de la viabilidad celular a través del tiempo después de la administración del fármaco.

X. REFERENCIAS

- Barrera, G. (2012). Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncology*, 2012, 137289. <https://doi.org/10.5402/2012/137289>
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), 517–529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Brandes, L. J., & Hermonat, M. W. (1983). Receptor status and subsequent sensitivity of subclones of MCF-7 human breast cancer cells surviving exposure to diethylstilbestrol. *Cancer Research*, 43(6), 2831–2835. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6850594>
- Campos-Vega, R., García-Gasca, T., Guevara-Gonzalez, R., Ramos-Gomez, M., Oomah, B. D., & Loarca-Piña, G. (2012). Human gut flora-fermented nondigestible fraction from cooked bean (*Phaseolus vulgaris* L.) modifies protein expression associated with apoptosis, cell cycle arrest, and proliferation in human adenocarcinoma colon cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(51), 12443–12450. <https://doi.org/10.1021/jf303940r>
- Catálogo DAL 1025 Alamar Blue Thermofisher. (2020). *Reactivo de viabilidad de células alamarBlue™*. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/DAL1025#/DAL1025>
- Chino, X. M. S., Martínez, C. J., Garzón, V. R. V., González, I. Á., Treviño, S. V., Bujaidar, E. M., Ortiz, G. D., & Hoyos, R. B. (2017). Cooked Chickpea Consumption Inhibits Colon Carcinogenesis in Mice Induced with Azoxymethane and Dextran Sulfate Sodium. *Journal of the American College of Nutrition*, 36(5), 391–398.

<https://doi.org/10.1080/07315724.2017.1297744>

Chrispeels, M. J., & Raikhel, N. V. (1991). Lectins, Lectin Genes, and Their Role in Plant Defense. *The Plant Cell Online*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.1.1>

Danese, A., Patergnani, S., Bonora, M., Wieckowski, M. R., Previati, M., Giorgi, C., & Pinton, P. (2017). Calcium regulates cell death in cancer: Roles of the mitochondria and mitochondria-associated membranes (MAMs). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1858(8), 615–627. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2017.01.003>

Dena Beltran, J. L. (2020). *Evaluación del mecanismo de acción de una lectina recombinante del frijol Tépari (Phaseolus acutifolius) sobre células de cáncer de colon*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.

Díaz Betancourt, A. (2018). *Efecto dosis respuesta de la fracción concentrada en lectinas (FCL) de frijol Tépari (Phaseolus acutifolius) en la movilización de calcio citoplasmático en líneas celulares de mama*. Tesis de Mestría. Universidad Autónoma de Querétaro.

Dubois, C., Vanden Abeele, F., & Prevarskaya, N. (2013). Targeting apoptosis by the remodelling of calcium-transporting proteins in cancerogenesis. *FEBS Journal*, 280(21), 5500–5510. <https://doi.org/10.1111/febs.12246>

Espinoza-Núñez, A. (2015). *Transformación genética de frijol Tépari (Phaseolus acutifolius) mediada por Agrobacterium tumefaciens empleando genes de prueba*. Tecnológico de celaya.

Estrada-Martínez, L., Moreno-Celis, U., Cervantes-Jiménez, R., Ferriz-Martínez, R., Blanco-Labra, A., García-Gasca, T., Estrada-Martínez, L. E., Moreno-Celis, U., Cervantes-Jiménez, R., Ferriz-Martínez, R. A., Blanco-Labra, A., & García-Gasca, T. (2017). Plant Lectins as Medical Tools against Digestive System Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1403. <https://doi.org/10.3390/ijms18071403>

Feregrino-Perez, A. A., Piñol-Felis, C., Gomez-Arbonés, X., Guevara-González, R. G.,

Campos-Vega, R., Acosta-Gallegos, J., & Loarca-Piña, G. (2014). A Non-digestible Fraction of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis During Early Carcinogenesis. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69(3), 248–254. <https://doi.org/10.1007/s11130-014-0428-7>

Ferríz-Martínez, R. A. (2014). *Caracterización del efecto citotóxico de un concentrado de lectina de frijol Tépari (Phaseolus acutifolius) sobre cáncer de colon*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Querétaro.

Ferriz-Martínez, R., García-García, K., Torres-Arteaga, I., Rodríguez-Mendez, A. J., Guerrero-Carrillo, M. de J., Moreno-Celis, U., Ángeles-Zaragoza, M. V., Blanco-Labra, A., Gallegos-Corona, M. A., Robles-Álvarez, J. P., Mendiola-Olaya, E., Andrade-Montemayor, H. M., Garcia, O. P., & 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. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2014.10.015>

Ferriz-Martinez, R., Garcia-Gasca, T., Torres-Arteaga, I., Rodríguez-Mendez, A. J., Guerrero-Carrillo, M. de J., Moreno-Celis, U., Ángeles-Zaragoza, M. V., Blanco-Labra, A., Gallegos-Corona, M. A., Robles-Alvarez, J. P., Mendiola-Olaya, E., Andrade-Montemayor, H. M., & Garcia, O. P. (2015). Tolerability assessment of a lectin fraction from Tepary bean seeds (*Phaseolus acutifolius*) orally administered to rats. *Toxicology Reports*, 2, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.10.015>

Fouad, Y. A., & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. In *American Journal of Cancer Research* (Vol. 7, Issue 5, pp. 1016–1036). E-Century Publishing Corporation.

Franco, R., & Cidlowski, J. A. (2009). Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death and Differentiation*, 16(10), 1303–1314. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.107>

Fu, L., Zhou, C., Yao, S., Yu, J., Liu, B., & Bao, J. (2011). Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(10), 1442–1449.

<https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2011.07.004>

García-Gasca, T., García-Cruz, M., Hernandez-Rivera, E., López-Martínez, J., Castañeda-Cuevas, A. L., Yllescas-Gasca, L., Rodríguez-Méndez, A. J., Mendiola-Olaya, E., Castro-Guillén, J. 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. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.722246>

García-Gasca, T., Hernandez-rivera, E., Lopez-Martínez, J., Casta, A. L., Yllescas-gasca, L., Rodriguez, A. J., Mendiola-olaya, E., Castro-guillen, L., & Blanco-labra, A. (2012). *Effects of Tepary Bean (Phaseolus acutifolius) Protease Inhibitor and Semipure Lectin Fractions on Cancer Cells*. 64(8), 1269–1278. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.722246>

Gee, K. R., Brown, K. A., Chen, W. N. U., Bishop-Stewart, J., Gray, D., & Johnson, I. (2000). Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes. *Cell Calcium*, 27(2), 97–106. <https://doi.org/10.1054/ceca.1999.0095>

Gorelik, E., Galili, U., & Raz, A. (2001). On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 20(3–4), 245–277. <https://doi.org/10.1023/a:1015535427597>

Huguet, E. L., McMahon, J. A., McMahon, A. P., Bicknell, R., & Harris, A. L. (1994). Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. *Cancer Research*, 54(10), 2615–2621. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8168088>

Hung, J. Y., Hsu, Y. L., Ni, W. C., Tsai, Y. M., Yang, C. J., Kuo, P. L., & Huang, M. S. (2010). Oxidative and endoplasmic reticulum stress signaling are involved in dehydrocostuslactone-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer*, 68(3), 355–365. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2009.07.017>

Imberty, A., Gautier, C., Lescar, J., Pérez, S., Wyns, L., & Loris, R. (2000). An Unusual Carbohydrate Binding Site Revealed by the Structures of Two *Maackia amurensis* Lectins Complexed with Sialic Acid-containing Oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry*, 275(23), 17541–17548.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M000560200>

Jesinger, R. A. (2014). Breast anatomy for the interventionalist. In *Techniques in Vascular and Interventional Radiology* (Vol. 17, Issue 1, pp. 3–9). Elsevier.

<https://doi.org/10.1053/j.tvir.2013.12.002>

Ji, H.-F., Li, X.-J., & Zhang, H.-Y. (2009). Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? *EMBO Reports*, *10*(3), 194–200. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.12>

Knaul, F. M., Nigenda, G., Lozano, R., Arreola-Ornelas, H., Langer, A., & Frenk, J. (2009). Cáncer de mama en México: Una prioridad apremiante. *Salud Publica de Mexico*, *51*(SUPPL.2). <https://doi.org/10.1590/S0036-36342009000800026>

Kopans, D. B. (2007). *Breast anatomy and basic histology, physiology, and pathology*. In: *Kopans DB*, (Breast Imaging (ed.); 3°). Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

Lagarda-Diaz, I., Guzman-Partida, A., & Vazquez-Moreno, L. (2017). Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(6), 1242. <https://doi.org/10.3390/ijms18061242>

Lam F, Ervik M, Ferlay J, Soerjomataram I, Mery L, B. F. (2018). *World Source: GLOBOCAN 2018*. <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-factsheets.pdf>

Lim, W., Ham, J., Bazer, F. W., & Song, G. (2019). Carvacrol induces mitochondria-mediated apoptosis via disruption of calcium homeostasis in human choriocarcinoma cells. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(2), 1803–1815. <https://doi.org/10.1002/jcp.27054>

Lim, W., Yang, C., Jeong, M., Bazer, F. W., & Song, G. (2017). Coumestrol induces mitochondrial dysfunction by stimulating ROS production and calcium ion influx into mitochondria in human placental choriocarcinoma cells. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, *23*(11), 786–802. <https://doi.org/10.1093/molehr/gax052>

- Lodish, H. F., Berk, A., & Kaiser, C. (2013). *Biología celular y molecular* (7th ed.). Editorial Médica Panamericana .
- López-Sánchez, C., López-Martínez, F., Castañeda-Cuevas, A., Yllescas-Gasca, L., Ferriz-Martínez, R., Torres-Arteaga, I., & García-Gasca, T. (2010). Evaluación de la Toxicidad In Vitro e In Vivo de Lectinas de Frijol Tépari. *Ciencia UAQ*, 3. https://www.uaq.mx/investigacion/revista_ciencia@uaq/ArchivosPDF/v3-n1/Evaluacion.pdf
- Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J., & Wyns, L. (1998). Legume lectin structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1383(1), 9–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9546043>
- Martaindale, S. R. (2018). Breast MR Imaging: Atlas of Anatomy, Physiology, Pathophysiology, and Breast Imaging Reporting and Data Systems Lexicon. In *Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America* (Vol. 26, Issue 2, pp. 179–190). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.mric.2017.12.001>
- Martínez-Alarcón, D. (2017). *Producción de una lectina recombinante de frijol tépari (phaseolus acutifolius) con efecto citotóxico sobre células de cáncer de colon*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- McConkey, D. J., & Orrenius, S. (1997). The Role of Calcium in the Regulation of Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 239(2), 357–366. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1997.7409>
- Moreira, R. de A., Ainouz, I. L., De Oliveira, J. T., & Cavada, B. S. (1991). Plant lectins, chemical and biological aspects. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 86 Suppl 2, 211–218. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1842004>
- Moreno-Celis, U., López-Martínez, J., Blanco-Labra, A., Cervantes-Jiménez, R., Estrada-Martínez, L. E., García-Pascalín, A. E., Guerrero-Carrillo, M. D. J., Rodríguez-Méndez, A. J., Mejía, C., Ferríz-Martínez, R. A., & García-Gasca, T. (2017). Phaseolus acutifolius Lectin Fractions Exhibit Apoptotic Effects on Colon Cancer: Preclinical Studies Using Dimethylhydrazine or Azoxi-Methane as Cancer Induction

Agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(10), 1670.

<https://doi.org/10.3390/molecules22101670>

Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., & Yasuhiko, Y. (2002). An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 34287–34294. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204973200>

Nagini, S. (2017). Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 17(2), 152–163. <https://doi.org/10.2174/1871520616666160502122724>

Nasi, A., Picariello, G., & Ferranti, P. (2009). Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legume seeds lectins. Perspectives for the assessment of food quality and safety. *Journal of Proteomics*, 72(3), 527–538. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.02.001>

Oliveira, C., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2014). Recombinant production of plant lectins in microbial systems for biomedical application – the frutalin case study. *Frontiers in Plant Science*, 5, 390. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00390>

Paine, T. M., Soule, H. D., Pauley, R. J., & Dawson, P. J. (1992). Characterization of epithelial phenotypes in mortal and immortal human breast cells. *International Journal of Cancer*, 50(3), 463–473. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.2910500323>

Pandya, S., & Moore, R. G. (2011). Breast development and anatomy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 54(1), 91–95. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e318207ffe9>

Pendergrass, W., Wolf, N., & Pool, M. (2004). Efficacy of MitoTracker Green™ and CMXRosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry Part A*, 61(2), 162–169. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20033>

Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., & Rizzuto, R. (2008). Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*,

27(50), 6407–6418. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.308>

Poot, M., Zhang, Y. Z., Krämer, J. A., Wells, K. S., Jones, L. J., Hanzel, D. K., Lugade, A. G., Singer, V. L., & Haugland, R. P. (1996). Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *44*(12), 1363–1372. <https://doi.org/10.1177/44.12.8985128>

Pratt, S. E., & Pollak, M. N. (1993). Estrogen and antiestrogen modulation of MCF7 human breast cancer cell proliferation is associated with specific alterations in accumulation of insulin-like growth factor-binding proteins in conditioned media. *Cancer Research*, *53*(21), 5193–5198. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7693333>

Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2004). Ca²⁺ homeostasis in apoptotic resistance of prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *322*(4), 1326–1335. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.037>

Raemaekers, R. J., de Muro, L., Gatehouse, J. A., & Fordham-Skelton, A. P. (1999). Functional phytohemagglutinin (PHA) and Galanthus nivalis agglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris* correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. *European Journal of Biochemistry*, *265*(1), 394–403. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00749.x>

Rampersad, S. N. (2012). Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors*, *12*, 12347–12360. <https://doi.org/10.3390/s120912347>

Rehnke, R. D., Groening, R. M., Van Buskirk, E. R., & Clarke, J. M. (2018). Anatomy of the superficial fascia system of the breast: A comprehensive theory of breast fascial anatomy. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *142*(5), 1135–1144. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000004948>

Ribeiro, A. C., Ferreira, R., & Freitas, R. (2018). Plant Lectins: Bioactivities and Bioapplications. *Studies in Natural Products Chemistry*, *58*, 1–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64056-7.00001-5>

Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., &

- Minor, L. (2004). Cell Viability Assays. In *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>
- Rizzuto, R., Simpson, A., Brini, M., & Pozzan, T. (1992). Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*, 358(6384), 325–327. <https://doi.org/10.1038/358325A0>
- Rodriguez, M. V., Riquelme, B., Valverde, J., & Gattuso, S. (2005). Caracterización del efecto aglutinante de lectinas de la familia de las fabáceas sobre los eritrocitos humanos mediante el análisis de imágenes. *Anales Afa*, 16(1).
<https://anales.fisica.org.ar/journal/index.php/analesafa/article/view/334>
- Sadler, T. W. (2009). *Langman's Medical Embryology*. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Schwarz, R. E., Wojciechowicz, D. C., Picon, A. I., Schwarz, M. A., & Paty, P. B. (1999). Wheatgerm agglutinin-mediated toxicity in pancreatic cancer cells. *British Journal of Cancer*, 80(11), 1754–1762. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690593>
- Sharon, N., & Lis, H. (2002). How proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6586–6591.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf020190s>
- Shibasaki, F., & McKeon, F. (1995). Calcineurin functions in calcio-activated cell death in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology*, 131(3), 735–743.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1083/jcb.131.3.735>
- So, C. L., Saunus, J. M., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2018). Calcium signalling and breast cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.
<https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2018.11.001>
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1409–1416. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4357757>
- Stewart, T. A., Yapa, K. T. D. S., & Monteith, G. R. (2015). Altered calcium signaling in

cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848(10), 2502–2511. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2014.08.016>

Stone, K., & Wheeler, A. (2015). A Review of Anatomy, Physiology, and Benign Pathology of the Nipple. *Annals of Surgical Oncology*, 22(10), 3236–3240. <https://doi.org/10.1245/s10434-015-4760-4>

Sun, X. M., MacFarlane, M., Zhuang, J., Wolf, B. B., Green, D. R., & Cohen, G. M. (1999). Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 274(8), 5053–5060. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.8.5053>

Taing, M.-W., Pierson, J.-T., Shaw, P. N., Dietzgen, R. G., Roberts-Thomson, S. J., Gidley, M. J., & Monteith, G. R. (2015). Mango Fruit Extracts Differentially Affect Proliferation and Intracellular Calcium Signalling in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Journal of Chemistry*, 2015, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/613268>

Thermo Fisher Catálogo F14201. (2020). *Fluo-4, AM*. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F14201#/F14201>

Torre, L. A., Sauer, A. M. G., Chen, M. S., Kagawa-Singer, M., Jemal, A., & Siegel, R. L. (2016). Cancer statistics for Asian Americans, Native Hawaiians, and Pacific Islanders, 2016: Converging incidence in males and females. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(3), 182–202. <https://doi.org/10.3322/caac.21335>

Valadez-Vega, C., Guzmán-Partida, A. M., Soto-Cordova, F. J., Álvarez-Manilla, G., Morales-González, J. A., Madrigal-Santillán, E., Villagómez-Ibarra, J. R., Zúñiga-Pérez, C., Gutiérrez-Salinas, J., & Becerril-Flores, M. A. (2011). Purification, Biochemical Characterization, and Bioactive Properties of a Lectin Purified from the Seeds of White Tepary Bean (*Phaseolus Acutifolius* Variety *Latifolius*). *Molecules*, 16(3), 2561–2582. <https://doi.org/10.3390/molecules16032561>

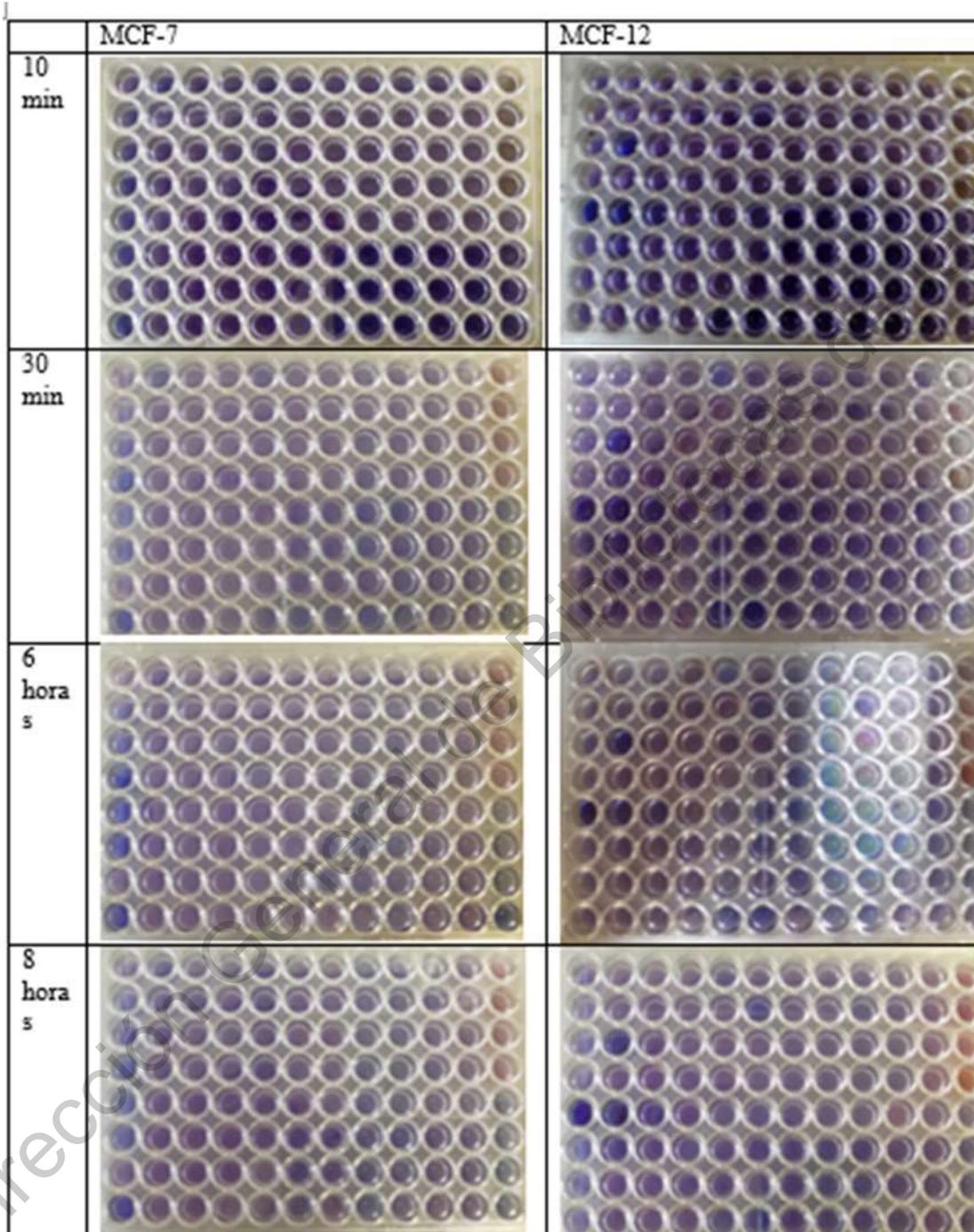
Vanden Abeele, F., Skryma, R., Shuba, Y., Van Coppenolle, F., Slomianny, C., Roudbaraki, M., Mauroy, B., Wuytack, F., & Prevarskaya, N. (2002). Bcl-2-dependent modulation of Ca(2+) homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell*, 1(2), 169–179. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1535->

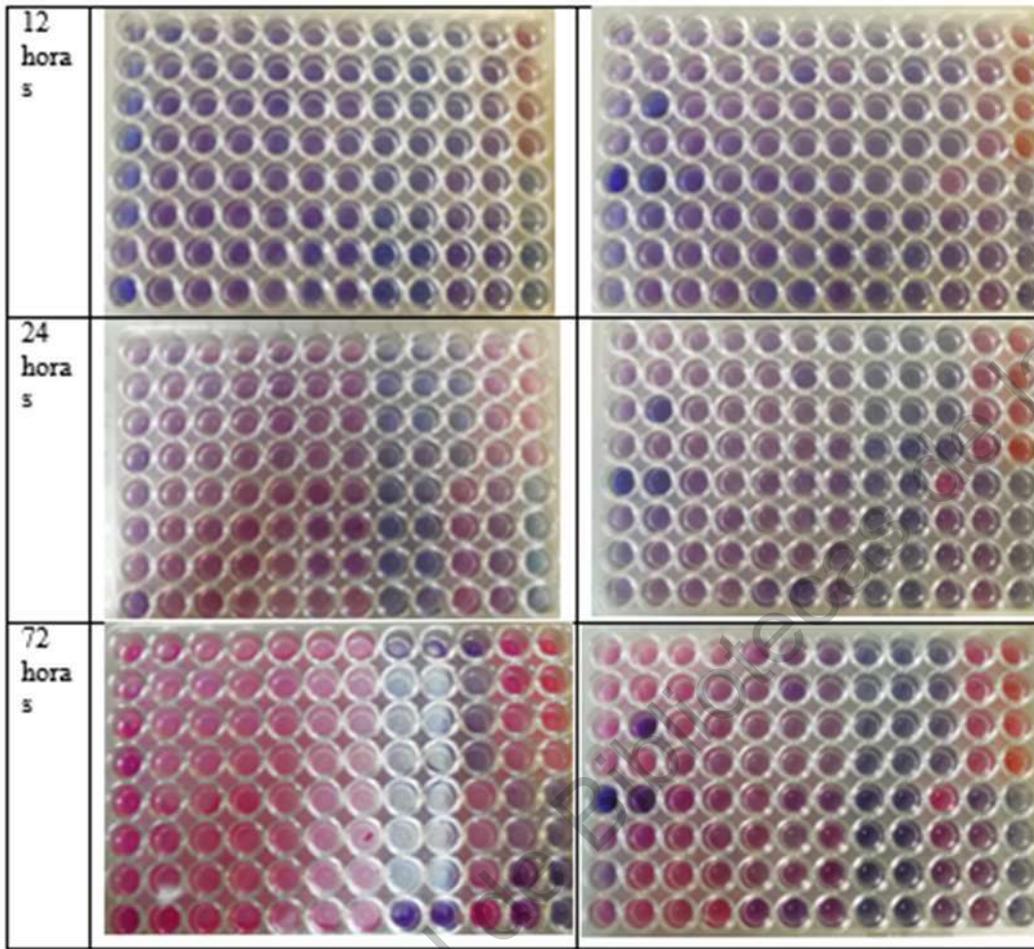
6108(02)00034-X

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

XI. ANEXOS

Placas de Alamar Blue





Dirección General

Imágenes de Alamar Blue

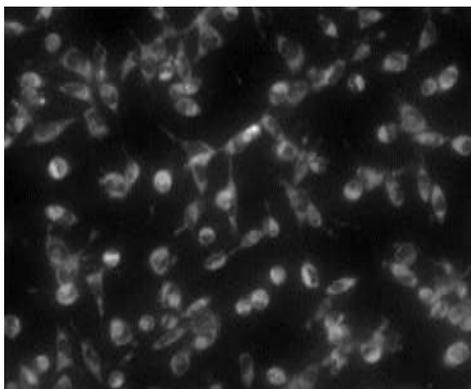


Figura 31. Actividad mitocondrial en células MCF-12.
Las células se marcaron el marcador *Mitrotracker Deep FM*.

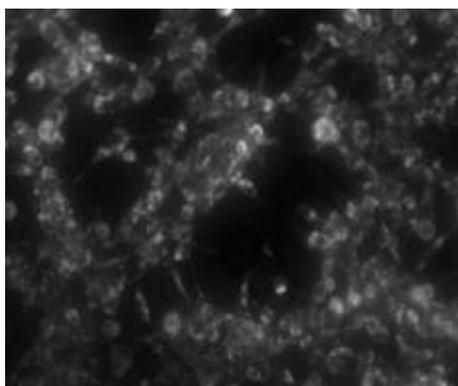


Figura 32. Efecto de FCL sobre la actividad mitocondrial en MCF-12
Las células se marcaron el marcador *Mitrotracker Deep Red FM* después de la incubación por media hora con FCL (1 mg/ml)

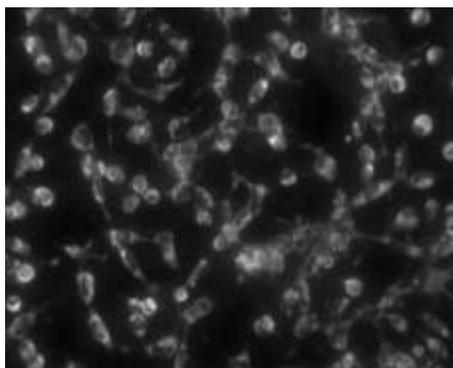


Figura 33. Efecto de LR sobre la actividad mitocondrial en MCF-12.
Las células se marcaron el marcador *Mitrotracker Deep Red FM* después de la incubación por media hora con FCL (1 mg/ml)

Figuras de Alamar Blue

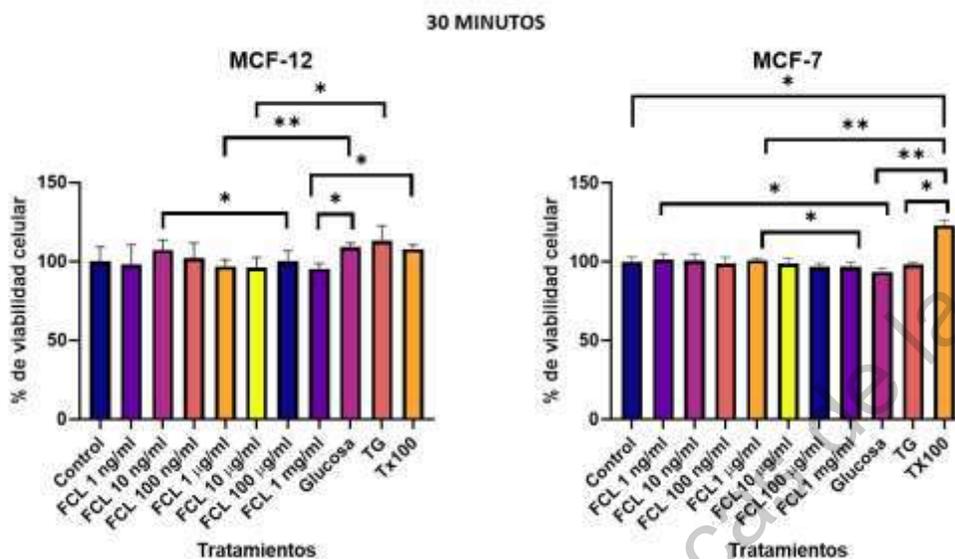


Figura 34. Porcentaje de viabilidad celular a los 30 minutos de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con FCL.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $P < 0.0001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

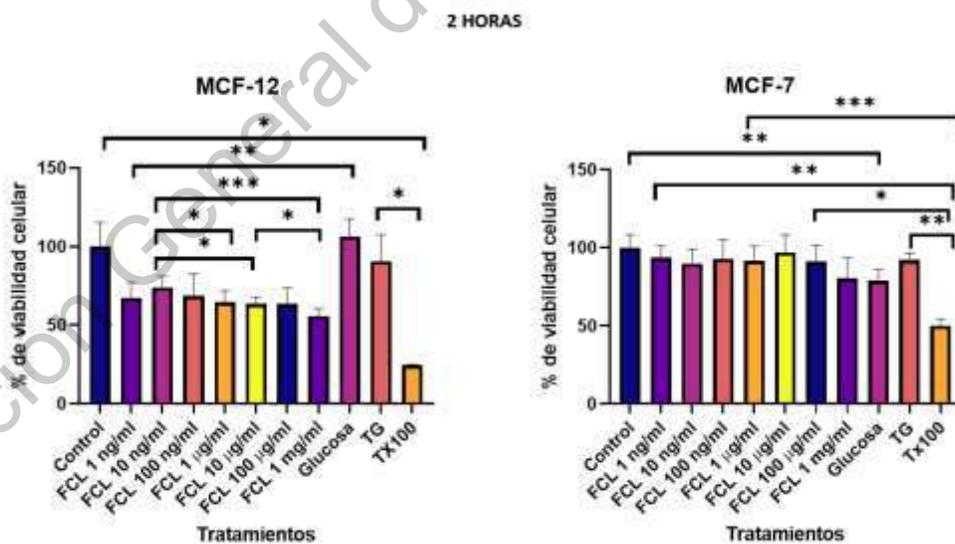


Figura 35. Porcentaje de viabilidad celular a las 2 horas de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con FCL.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $P < 0.0001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

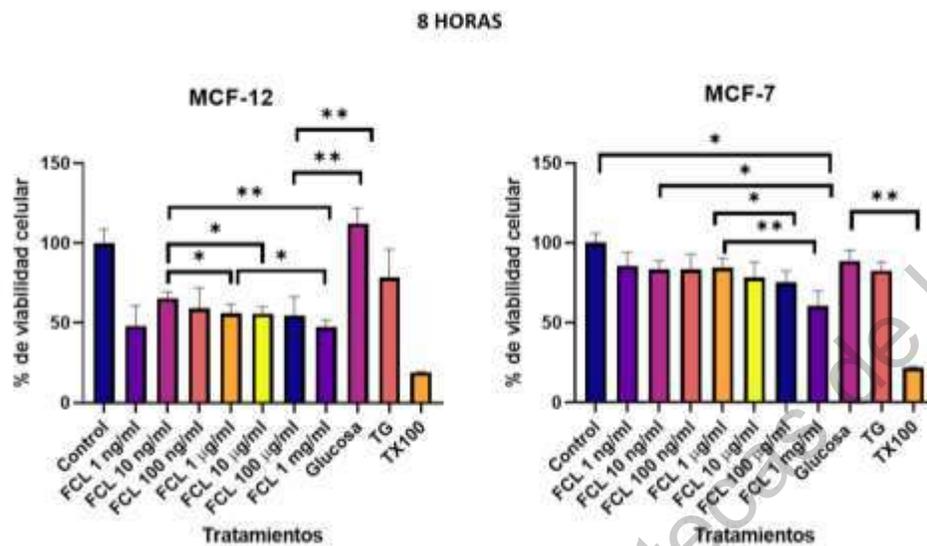


Figura 36. Porcentaje de viabilidad celular a las 8 horas de incubación con respecto a los tratamientos y concentraciones con FCL.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $P < 0.0001$ a partir de datos obtenidos de la prueba Post hoc de Tukey.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ