



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**“Caracterización de la respuesta de Ca^{2+} por el factor de
crecimiento epidérmico humano (hEGF) y papel del canal Orai3
en células HeLa”**

TESIS

Que Presenta

Lic. Amanda Renté Alpizar

**Para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS**

**En la Especialidad de
BIOQUÍMICA**

Director de la Tesis:

Dr. Agustín Guerrero Hernández

Durante el desarrollo de este proyecto
se contó con el apoyo económico del
Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías
(CONAHCYT) con el número de registro 1235226
Agradezco el apoyo otorgado.

*A quienes conquistaron este proyecto
para mí desde su apoyo*

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Agustín Guerrero Hernández**, por su infinita paciencia y su invaluable aporte a lo que seré como investigador y como persona. Aprecio cada jornada que hemos compartido y los conocimientos lógicos que me ha regalado los llevaré siempre en mí. Gracias por enseñarme de ciencia, de pedagogía y de humanidad.

Al **Dr. M. Leonardo Gallegos** y la **Dra. Lizeth Sandoval**, sin ustedes este proyecto no hubiese sido posible. Agradezco todo su esfuerzo y sacrificio. Valoro muchísimo cada aporte realizado a la materialización de este trabajo y sus enseñanzas en el laboratorio. Siempre ustedes serán ejemplos y fuente de admiración para mí.

A mis asesores: **Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega, Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes y Dr. José Antonio Arias Montaña**, por cada recomendación y sugerencia que abrió nuevos debates constructivos durante este proyecto. Gracias por otorgarme su tiempo y atención.

Al **Dr. Manuel Arias Montaña**, por su colaboración al proyecto. Agradezco su tiempo y entrega, que han resultado tan útiles a mi formación.

A los administrativos y profesores del Departamento de Bioquímica: **Angie y Priscila**, por toda la ayuda otorgada. A los Doctores por sus enseñanzas.

A mis compañeros de laboratorio: **Rodrigo Contreras y David Olvera**, quienes han sido gran fuente de apoyo laboral y emocional. A mi hermana mexicana de tesis, **Itzel Lievano**, por cada uno de los momentos de estrés compartidos y por los logros alcanzados juntas.

A mis compañeros de generación de maestría: En especial **Lechner, Sonia e Hiram**, por toda la hermandad que nos une. A **Fer**, por su confianza y cariño.

A mi familia mexicana: Mi mamá **Adriana López**, el **Sr. Andrés, Sebastián y Miriam**, por acogerme y mostrarme México. A **Marco A. González** por enseñarme la cultura mexicana, por su apoyo y cariño incondicional en mi vida personal.

A mis amigos: **Dayán**, un hermano para mí, **Robe, Bobi, Dainier**, por ser hijos para mi mamá. A mi padrino **Juanito** y a mi segundo padre **Samuel**. A **Aya, Ania y René**, por ser familia. A **Yasmery, Juan y María Elena**, por ser un pilar en mi vida. A mi jefa del laboratorio de alérgenos **Maytee** y a mi mentora **Damarys**. A mis tutores de Licenciatura del IPK **Yaxsier de Armas y Daniel Salazar**

A mis primos y tías: A **Nani, Mayito**, y a mi tía **Elenita** y mi tía **Marisela**, su confianza siempre me ha impulsado.

A **mis padres**, quienes conquistaron la universidad para mí desde su apoyo, mis hermanas **Neove, Lesly** y a mi amada **Susanne**. A mi cuñado **Danyer**, quien ha sido una bendición para nuestra familia.

A México: por la oportunidad y ser mi segunda patria.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El ión calcio (Ca^{2+}) como segundo mensajero intracelular	1
1.2 Mecanismos de transporte de Ca^{2+} en la membrana plasmática	2
1.3 El retículo endoplásmico como principal reservorio de Ca^{2+}	3
1.4 El Receptor de IP_3 , canal liberador de Ca^{2+} del RE en respuesta a estímulos	6
1.5 El Factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) y su receptor (EGFR).....	9
1.6 Los canales Orai se encuentran implicados en SOCE.....	11
1.7 El Fura-2 AM: un indicador sintético de cociente para determinar Ca^{2+} citosólico	13
2. ANTECEDENTES	15
3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	25
3.1 JUSTIFICACIÓN.....	25
3.2 HIPÓTESIS	25
3.3 OBJETIVO GENERAL	25
3.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1 Soluciones y reactivos.....	27
4.2 Cultivo celular.....	27
4.3 Transfección de células HeLa empleando los agentes Lipofectamina [®] 2000, FuGENE HD [®] y PEI (1X).....	28
4.4 Registros de Ca^{2+} citosólico empleando el indicador Fura 2-AM.....	30
4.5 Calibración de Fura-2 AM	30
4.6 Ajuste de la respuesta de hEGF a una ecuación biexponencial	31
4.7 Evaluación del amortiguamiento de Fura-2 en la respuesta inducida por hEGF	33
4.8 Ensayos con el inhibidor U73122 y su análogo inactivo U73343	33
4.9 Ensayos en Solución Salina con cafeína	33
4.10 Ensayos de participación del RyR.....	34
4.11 Análisis estadístico de los resultados	34
5. RESULTADOS	35
5.1 Registros de Ca^{2+} citosólico en respuesta a hEGF en células HeLa y efecto de dos concentraciones diferentes de Fura-2 AM.....	35
5.2 Efecto del vaciamiento del RE empleando un agonista productor de IP_3 y Tg en la respuesta de hEGF	37

5.3	Comparación de las respuestas de $[Ca^{2+}]_i$ a la adición de hEGF e histamina en ausencia de Ca^{2+} externo.	39
5.4	La histamina no afecta la cinética de liberación de Ca^{2+} inducida por el hEGF pero sí su amplitud.....	40
5.5	Efecto del U73122, un inhibidor selectivo de PLC, aplicado de forma aguda y pre-incubado en la respuesta de hEGF.....	41
5.6	Participación del canal Orai3 en la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por hEGF	42
5.7	Efecto de la cafeína en la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por los agonistas histamina y hEGF.....	45
5.8	Participación del RyR en la respuesta de Ca^{2+} citosólico provocada por la estimulación con hEGF	48
6.	DISCUSIÓN.....	50
7.	CONCLUSIONES.....	63
9.	PERSPECTIVAS	64
10.	ANEXOS	65

RESUMEN

Las células invierten energía, en forma de ATP, para mantener el gradiente de 4 órdenes de magnitud exclusivo del ion calcio (Ca^{2+}) entre el citoplasma (~ 100 nM) y el espacio extracelular (~ 1 mM). Las células presentan diferentes almacenes intracelulares de Ca^{2+} como el retículo endoplásmico (RE) que les permite tener eventos de señalización locales y efímeros y así limitar el papel tóxico de este ion. El RE se rellena con Ca^{2+} por la acción de la bomba SERCA, la cual se alimenta con Ca^{2+} provisto por diferentes canales de la membrana plasmática, como los canales Orai1 que en unión con STIM1 forman la entrada de Ca^{2+} operada por depósito (SOCE). El RE también presenta canales de liberación de Ca^{2+} (RIP_3) y de fuga (Orai3) junto con proteínas luminales que aumentan su capacidad de acumular Ca^{2+} . Se ha reportado que los incrementos iniciales de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por el factor de crecimiento VEGF requiere la expresión de los canales Orai3. Estos datos sugieren que el canal Orai3 pudiera participar en los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por los factores de crecimiento por lo que decidimos estudiar su papel en la señalización por Ca^{2+} inducida por factores de crecimiento diferentes al VEGF, como sería el hEGF en células HeLa para determinar si el efecto de Orai3 es generalizado en la señalización por Ca^{2+} de los factores de crecimiento. Por otra parte, lo convencionalmente establecido es que diferentes agonistas pueden actuar en receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK) activando a la $\text{PLC}\gamma$, lo que genera la producción de IP_3 y la apertura del RIP_3 . Se ha observado que el RIP_3 participa en la respuesta de hEGF ya que cafeína inhibe el incremento de Ca^{2+} citosólico inducido por este factor en células de glioma.

La aplicación de 80 ng/mL de hEGF a células HeLa incubadas con 250 nM ó 2 μM de Fura-2 AM produjo un incremento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en ausencia de Ca^{2+} externo. El área bajo la curva (ABC) de dicha respuesta fue similar, aunque la capacidad amortiguadora del Fura-2 haya sido diferente. Esta respuesta se eliminó por completo cuando se vació el RE con la combinación de taspigargina (Tg) e histamina (His). El ABC de la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por hEGF fue similar a la obtenida con His, un agonista típico liberador de Ca^{2+} del RE. Sin embargo, sólo His disminuyó el ABC de la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por hEGF, sin afectar la cinética de liberación y remoción de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producida por hEGF. Estos datos sugieren que His produce un vaciamiento parcial del RE mientras que el hEGF no lo hace. Se ha propuesto que hEGF activa la $\text{PLC}\gamma$, para verificar esto, se utilizó un inhibidor de esta enzima (U73122) y su análogo inactivo como control (U73343). La incubación de células HeLa con U73122, ya sea de forma pre-incubada o aguda, inhibió la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de His sin afectar la inducida por hEGF. Esto sugiere que hEGF libera Ca^{2+} del RE sin requerir un incremento de IP_3 . Se exploró la posible participación del canal Orai3 en la respuesta de hEGF, para tal fin se transfectaron las células con el agente PEI empleando Orai3DN o se sobreexpresó Orai3. La respuesta a hEGF fue similar a la mock por lo que no encontramos ninguna evidencia que sugiera la participación de Orai3 en el mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por hEGF. Por lo tanto, decidimos evaluar la participación del RIP_3 en el mecanismo de liberación de Ca^{2+} por hEGF empleando cafeína, que se ha reportado tiene un efecto inhibitorio en la actividad del RIP_3 , siendo el RIP_3 tipo3 el más sensible a este alcaloide. La cafeína inhibió en un 80% los ABC de hEGF y en un 50% los inducidos por His. No encontramos ninguna evidencia de que estos efectos se deban a la participación del receptor de rianodina. Sugerimos que hEGF activa al RIP_3 por un mecanismo de sensibilización independiente de la actividad de la $\text{PLC}\gamma$.

SUMMARY

Cells invest energy, in the form of ATP, to maintain an exclusive 4-order magnitude gradient of calcium ion (Ca^{2+}) between cytoplasm (~ 100 nM) and extracellular space (~ 1 mM). Cells have different intracellular Ca^{2+} stores, such as the endoplasmic reticulum (ER), which allows them to have local and transient signaling events, thereby limiting the toxic role of this ion. The ER is refilled with Ca^{2+} by the action of the SERCA pump, which is fed by Ca^{2+} provided by different plasma membrane channels, such as Orai1 channels that, in conjunction with STIM1, form the store-operated Ca^{2+} entry (SOCE). ER also features Ca^{2+} release (IP₃) and leak (Orai3) channels, along with luminal proteins that increase its Ca^{2+} storage capacity. It has been reported that the VEGF-induced initial increase in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ requires the expression of Orai3 channels. These data lead us to study its role in Ca^{2+} signaling induced by growth factors other than VEGF, such as hEGF in HeLa cells, to determine whether Orai3 has a generalized role in growth factor-induced Ca^{2+} signaling. Traditionally, the activation of receptors with tyrosine kinase activity (RTK) recruit the PLC γ , producing IP₃ which in turn opens the IP₃R. This contention is supported, among other things, by the inhibitory effect of caffeine on the activity of IP₃R and the associated hEGF response in glioma cells.

Application of 80 ng/mL hEGF to HeLa cells incubated with 250 nM or 2 μ M Fura-2 AM produced a transient increase in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the absence of external Ca^{2+} . The area under the curve (AUC) of this response was similar, although the Ca^{2+} buffering capacity of Fura-2 was different. This response was completely eliminated when the ER was emptied with the combination of thapsigargin (Tg) and histamine (His). The AUC of the hEGF-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ response was similar to that obtained with His, a typical ER Ca^{2+} -releasing agonist. However, only His decreased the AUC of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ response induced by hEGF, without affecting the kinetics of release and removal of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ produced by hEGF. These data suggest that His produces partial ER emptying while hEGF does not. It has been proposed that hEGF activates PLC γ ; to verify this, an inhibitor of this enzyme (U73122) and its inactive analogue (U73343) were used. Incubation of HeLa cells with U73122, either pre-incubated or acutely, inhibited the His $[\text{Ca}^{2+}]_i$ response without affecting that induced by hEGF. This suggests that hEGF releases Ca^{2+} from the ER without requiring an increase in IP₃. The possible participation of the Orai3 channel in the hEGF response was explored; for this purpose, the cells were transfected with the PEI agent using Orai3DN or Orai3 was overexpressed. The response to hEGF was similar to mock, so we did not find any evidence suggesting the participation of Orai3 in the mechanism of Ca^{2+} release induced by hEGF. Therefore, we decided to evaluate the participation of IP₃R in the Ca^{2+} release mechanism by hEGF using caffeine, which has been reported to have an inhibitory effect on IP₃R activity, with IP₃R3 being the most sensitive to this alkaloid. Caffeine inhibited the AUC of hEGF by 80% and those induced by His by 50%. We found no evidence that these effects were due to participation of the ryanodine receptor. We suggest that hEGF activates IP₃R by a sensitization mechanism independent of PLC γ activity.

ABREVIATURAS

2-APB	2-aminoetoxidifenil borato
ABC	Área bajo la curva
AM	Acetoximetil
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
BAPTA	1,2-Bis(2-aminofenoxil)etano-N,N,N',N'-tetraacético
BK	Bradicinina
Ca²⁺	Calcio
[Ca²⁺]_i	Concentración intracelular de calcio
[Ca²⁺]_e	Concentración extracelular de calcio
CFP	Proteína fluorescente cian
CCh	Carbacol
CICR	Liberación de calcio inducida por calcio
CO₂	Dióxido de carbono
DAG	Diacilglicerol
DN	Mutante dominante negativa
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Etilen glicol-bis(2-aminoetileter) -N,N,N',N'-ácido tetraacético
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
GPCR	Receptor acoplado a proteína G

His	Histamina
hEGF	Factor de crecimiento epidérmico humano
IC₅₀	Concentración inhibitoria media
IP₃	1,4,5- trisfosfato de inositol
RIP₃	Receptor de 1,4,5- trisfosfato de inositol
K_a	Constante de asociación
K_d	Constante de disociación
kDa	KiloDaltones
Lyn	Cinasa de la familia Src
MCU	Uniportador de calcio mitocondrial
MSIE	Células epiteliales de intestino de ratón
μM	Micromolar
mM	Milimolar
MP	Membrana plasmática
nM	Nanomolar
NCX	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺
P_o	Probabilidad de apertura
PAR1	Receptor activado por proteasa-1
PEI	Polietilenimina
PIP₂	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	Proteína cinasa A
PLCβ	Fosfolipasa C beta
PLCγ	Fosfolipasa C gamma
PMCA	ATPasa de Ca ²⁺ de la membrana plasmática

RE	Retículo endoplasmático
ROCs	Canales Operados por Receptores
RS	Retículo sarcoplasmático
RTK	Receptor con actividad de cinasa de tirosina
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
RyR	Receptor de rianodina
SERCA	ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico/endoplásmico
siRNA	ARN interferente pequeño
SMOC	Canales operados por segundos mensajeros
SOC	Canales operados por depósitos
SOCE	Entrada de calcio activada por depleción de depósitos
SS	Solución salina
STIM	Molécula de interacción estromal
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbóxicos
TFLLR	Péptido agonista treonina-fenilalanina-leucina-leucina-arginina
Tg	Tapsigargina
TM	Dominio transmembrana
TRP	Canal del Potencial transitorio del fotoreceptor
TRPC	Canal del Potencial transitorio del fotoreceptor canónico
TRPV	Canal del Potencial transitorio del fotoreceptor de vaniloides
TRPM	Canal del Potencial tansitorio del fotoreceptor de melastatina
vEGF	Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular
VOCC	Canales de calcio operados por voltaje
YFP	Proteína fluorescente amarilla

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El ión calcio (Ca^{2+}) como segundo mensajero intracelular

El ión calcio (Ca^{2+}) destaca como el mensajero celular más versátil y participa en la regulación de funciones celulares que incluyen la contracción, la secreción, el metabolismo, la expresión génica, la supervivencia y la muerte celulares. Un principio fundamental en la señalización de Ca^{2+} es que cualquier alteración en la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) desencadena una respuesta celular (Berridge *et al.*, 2000). En las células no estimuladas, el Ca^{2+} citosólico se mantiene a una concentración de ~ 100 nM comúnmente denominada como la concentración de Ca^{2+} "en reposo" o "basal". La estimulación extrínseca de las células puede ser de diferentes tipos como: señales hormonales, neurotransmisoras, factores de crecimiento, anticuerpos, estímulos mecánicos, eléctricos, térmicos, cambios de pH, alteraciones osmóticas, reactivos citotóxicos, invasiones microbianas o mediante la transmisión de señales celulares a través de uniones comunicantes. Por otro lado, la señalización de Ca^{2+} también puede ser intrínseca, manifestándose a través de señales celulares espontáneas en miocitos cardíacos y neuronas en desarrollo (Bootman y Bultynck, 2020).

Las células invierten gran parte de su energía para efectuar cambios en la concentración de Ca^{2+} . Una de las razones de mantener baja la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es que la unión de Ca^{2+} con polifosfatos como los ácidos nucleicos, fosfolípidos, nucleótidos y pirofosfato, forma complejos insolubles en agua, mientras que esto no ocurre con el catión Mg^{2+} . Por lo tanto, las células han desarrollado formas de secuestrar este catión divalente peligroso para reducir sus niveles citosólicos y usar su energía de enlace para la transducción de señales. A diferencia de las moléculas complejas, el Ca^{2+} no es susceptible a alteraciones químicas, lo que implica que para ejercer control sobre él las células deben secuestrarlo ya sea por proteínas u organelos intracelulares o extruirlo a través de la membrana plasmática (MP) (Clapham, 2007).

Las principales fuentes de Ca^{2+} son los depósitos intracelulares y el medio extracelular. En el medio externo, las $[\text{Ca}^{2+}]_e$ se encuentran alrededor de 1 mM, lo que implica que el gradiente

de Ca^{2+} entre el medio externo y el citoplasma es de cuatro órdenes de magnitud. Esto significa que el transporte del ion a través de la MP, la cual tiene una naturaleza hidrofóbica y resulta impermeable para el Ca^{2+} , sea de dos tipos: mediante transporte pasivo (canales iónicos) o activo (bombas de Ca^{2+}) (Guerrero *et al.*, 2023).

1.2 Mecanismos de transporte de Ca^{2+} en la membrana plasmática

Existen diferentes canales ubicados en la membrana plasmática que están involucrados en el movimiento del ion Ca^{2+} al interior de la célula. Estos son: a) canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VOCCs, por sus siglas en inglés), los cuales se expresan generalmente en células excitables; b) canales operados por receptores (ROCs, por sus siglas en inglés); c) canales operados por segundos mensajeros (SMOCs, por sus siglas en inglés), y d) canales operados por depósito (SOCs, por sus siglas en inglés), como los canales ORAI. Los canales que provocan un cambio transitorio del potencial de membrana del fotorreceptor (TRPs, por sus siglas en inglés) también son una familia de canales que transportan Ca^{2+} . Existen varios grupos en esta superfamilia, pero tres son los principales: la familia canónica TRPC, la familia de vaniloides TRPV y la familia de melastatina TRPM (Berridge *et al.*, 2003).

Diferentes mecanismos de remoción en la membrana plasmática tienen un importante papel en la homeostasis del Ca^{2+} y el mantenimiento de las concentraciones en el citoplasma de ~ 100 nM. La ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA, por sus siglas en inglés) es una bomba tipo P que utiliza energía en forma de ATP para extruir el ion Ca^{2+} en contra de su gradiente de concentración. La bomba PMCA tiene alta afinidad por Ca^{2+} y responde a elevaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a través de la proteína calmodulina (Krebs, 2022). El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) es un transportador bidireccional de iones presente en la MP, que también funciona como mecanismo de remoción de Ca^{2+} , transportando un ion Ca^{2+} fuera de la célula y tres iones de sodio dentro de la célula (Jeffs *et al.*, 2007). Algunos de estos mecanismos anteriormente mencionados se representan en la Figura 1.1. Adicionalmente, en el citoplasma hay proteínas de unión a Ca^{2+} , codificadas por ~ 200 genes y que pueden actuar como amortiguadores que regulan las concentraciones libres de este ion.

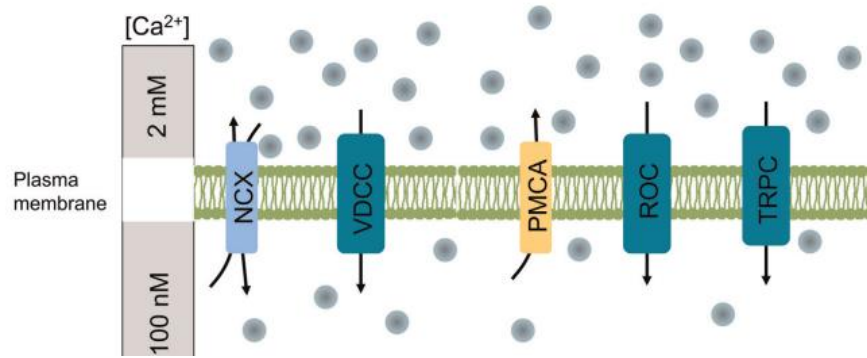


Figura 1.1. Proteínas de transporte del ion Ca^{2+} en la MP. El Ca^{2+} puede ingresar a la célula a través de diferentes canales presentes en la MP; por ejemplo: los canales operados por receptores, ROCs, canales TRPs y otros no representados en el esquema como SOCs y SMOCs. En la MP también existen mecanismos de remoción como el intercambiador NCX y la bomba PMCA. NCX, Intercambiador Na^+/Ca^{2+} (por sus siglas en inglés); PMCA, ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (por sus siglas en inglés); ROCs, Canales Operados por Receptores (por sus siglas en inglés); TRPC, Canal del Potencial transitorio del fotorreceptor canónico (por sus siglas en inglés); VDCC, Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (por sus siglas en inglés). Modificado del trabajo de Görlach y colaboradores; 2015.

1.3 El retículo endoplásmico como principal reservorio de Ca^{2+}

El RE es el principal organelo de almacenamiento de Ca^{2+} intracelular. Éste contiene numerosas proteínas involucradas en el mantenimiento de la homeostasis y la señalización por Ca^{2+} . En el lumen del RE, hay abundantes proteínas de unión a Ca^{2+} ; por ejemplo, calreticulina y calsecuestrina. Un regulador clave de la homeostasis del calcio celular es la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoendoplásmico (SERCA), que actúa transportando iones Ca^{2+} desde el citosol al RE. Las bombas SERCA pertenecen a la familia de ATPasas de tipo P que incluye una serie de ATPasas unidas a membranas, como la ATPasa de Ca^{2+} de membrana plasmática (PMCA), la ATPasa Na^+/K^+ y la ATPasa H^+/K^+ . Una característica común de estas ATPasas de tipo P es transportar iones metálicos contra el gradiente a través de la membrana debido a cambios conformacionales estabilizados por la autofosforilación de un residuo de ácido aspártico, por lo que se consume ATP (Xu y Van, 2021). La estructura de la proteína está altamente conservada, exhibiendo variaciones sólo en la extensión de la región C-terminal a través de isoformas y variantes de splicing. Se han identificado nueve

variantes de splicing de SERCA (SERCA1a-b, SERCA2a-d, SERCA3a-c) codificadas por tres genes diferentes (*ATP2A1-3*) en humanos.

La tapsigargina (Tg) se clasifica estructuralmente como una lactona sesquiterpénica, y se extrae de una planta, *Thapsia garganica*. Es un inhibidor farmacológico selectivo de SERCA en una variedad de células y se ha descrito que esto se debe a que Tg estabiliza la conformación E2 de SERCA evitando así su ciclo catalítico (Laporte *et al.*, 2004).

En el retículo endo/sarcoplásmico, además de sistemas de captura de Ca^{2+} como la bomba SERCA, también están presentes canales de liberación de Ca^{2+} como receptores de rianodina (RyR) y receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato (RIP_3 s). Existe una homología de ~40% entre RyR e RIP_3 en las regiones transmembrana putativas, lo que indica que estos dos canales evolucionaron a partir de un canal ancestral común. Aunque estructuralmente relacionados, RyR e RIP_3 tienen perfiles fisiológicos y farmacológicos distintos. RyR es un homotetrámero que comprende cuatro monómeros de 565 kDa, de aproximadamente 5000 aminoácidos cada uno y se expresa fundamentalmente en células excitables. Este receptor presenta sitios de unión de alta afinidad a Ca^{2+} , a bajas concentraciones citosólicas (~100–200 nM) el receptor permanece cerrado, y cuando las concentraciones llegan a concentraciones en el orden submicromolar el Ca^{2+} se une aumentando la probabilidad de apertura del canal (P_o). La actividad del canal es máxima cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es ~10 μM , y mayores concentraciones conducen a una reducción de P_o (Santulli *et al.*, 2017).

Existen tres subtipos de RyR en tejidos de mamíferos: RyR1 y RyR2 son necesarios para el acoplamiento excitación-contracción en el músculo esquelético y cardíaco, respectivamente, y también se expresan en tejidos no musculares y están regulados durante el desarrollo. El RyR3 se identificó originalmente en el cerebro, pero se expresa ampliamente en tejidos no neuronales (Zalk *et al.*, 2015).

Típicamente, la estimulación de las células conduce a un aumento agudo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ desde el nivel de reposo de 100 nM, y al final de la estimulación la concentración vuelve al estado de reposo. El nivel de Ca^{2+} citosólico depende de la naturaleza del estímulo, así como de

factores como la concentración, intensidad y duración del estímulo, y la presencia de proteínas amortiguadoras de Ca^{2+} (Bootman y Bultynck, 2020). Estos estímulos pueden ser diferentes agonistas, los cuales pueden incrementar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediante mecanismos que involucran al RIP_3 y Ca^{2+} proveniente del RE. En la sección 1.4 se abordarán estos mecanismos y se profundizará en estructura, función y particularidades del RIP_3 .

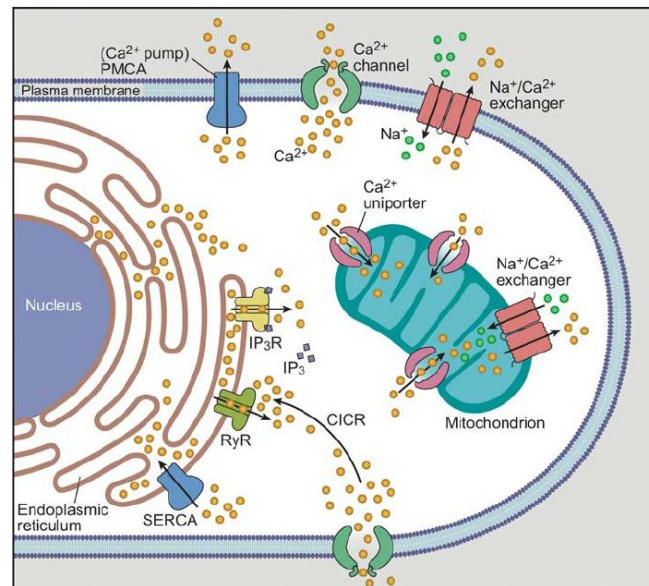


Figura 1.2. Dinámica del ion Ca^{2+} intra y extracelular. El ion Ca^{2+} puede ingresar al interior celular a través de diferentes canales presentes en la membrana plasmática. El Ca^{2+} es extruido por la bomba PMCA o por el intercambiador NCX . En el principal reservorio intracelular de Ca^{2+} , el RE, también existen mecanismos de remoción como la bomba SERCA y canales de liberación como el RyR y el RIP_3 que se expresan según el tipo celular. Se muestra el proceso de liberación de calcio inducida por calcio (CICR). En la mitocondria existe el canal MCU y el NCX mitocondrial. Tomado de Dong *et al.*, 2006.

Aunque el RE es el principal reservorio de Ca^{2+} , otros organelos también son capaces de captar el ion como por ejemplo el aparato de Golgi, las mitocondrias y los lisosomas (Raffaello *et al.*, 2016). Se ha reportado que el Ca^{2+} liberado desde el RE puede captarse por las mitocondrias y promueve la bioenergética y la supervivencia celular al estimular las actividades de las deshidrogenasas que controlan el flujo de carbonos a través del ciclo de

los ácidos tricarboxílicos (TCA). Se ha reportado que este organelo también tiene mecanismos de remoción y liberación. La captación de Ca^{2+} mitocondrial ocurre a través del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU) y la salida de Ca^{2+} de este organelo está mediado por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (Fernández *et al.*, 2023). Los mecanismos de liberación y remoción descritos en esta sección se representan en la Figura 1.2 que describe la dinámica del ion Ca^{2+} .

1.4 El Receptor de IP_3 , canal liberador de Ca^{2+} del RE en respuesta a estímulos

En los mamíferos, existen tres subtipos diferentes (1, 2 y 3) del IP_3R , que comparten entre un 60 y un 70% de identidad de secuencia; pueden formar homotetrámeros o heterotetrámeros, exhibir diferentes perfiles de expresión espacial y están involucrados en diversas vías de señalización. Las subunidades de este receptor tienen 2700 residuos de modo que IP_3R y RyR son los canales iónicos más grandes conocidos (Bezprozvanny, 2005). Existen diferentes agonistas que pueden interactuar con receptores acoplados a proteína G (GPCR, por sus siglas en inglés), o con diferentes receptores de cinasas de tirosina (RTK, por sus siglas en inglés), que estimulan la enzima fosfolipasa β ($\text{PLC}\beta$, por sus siglas en inglés) y $\text{PLC}\gamma$ respectivamente, y conducen a la producción de IP_3 . La activación del IP_3R requiere la unión tanto de IP_3 como Ca^{2+} en sus cuatro subunidades (Alzayady *et al.*, 2016).

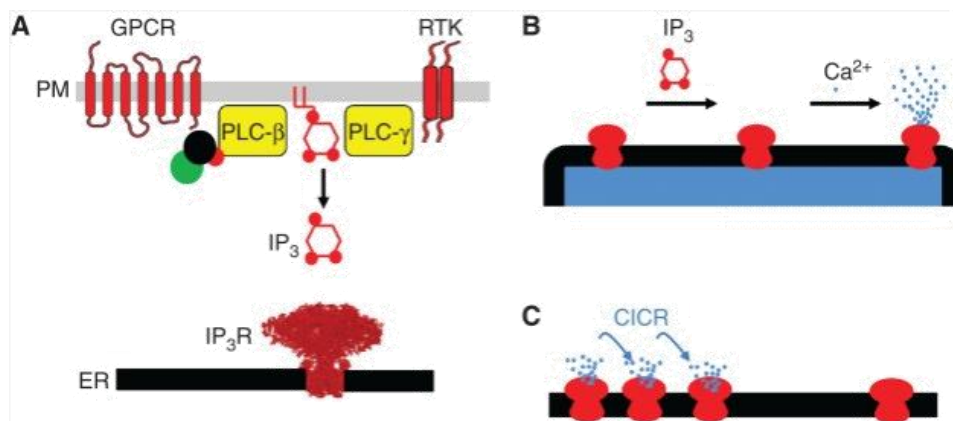


Figura 1.3. Los IP_3R son estimulados por IP_3 y Ca^{2+} . Se muestra el mecanismo convencional de producción de IP_3 ante la estimulación de receptores de tipo GPCR y RTK. El IP_3R requiere de la unión de IP_3 y Ca^{2+} para la apertura del canal y la liberación de Ca^{2+} intracelular. El mecanismo que subyace esta retroalimentación positiva es conocido como CICR. Tomado de Prole y Taylor, 2019.

Se ha reportado que el RIP_3 presenta dos sitios de unión a Ca^{2+} , un sitio estimulador, que se encuentra más cercano al poro del canal que el sitio inhibitor. Se han propuesto diferentes esquemas para explicar la interacción entre IP_3 y Ca^{2+} ; se propone que IP_3 podría regular únicamente el sitio inhibitor (reduciendo la afinidad por el Ca^{2+}) o tanto el inhibitor y el estimulador (aumentando su afinidad por el Ca^{2+}). Cualquiera que sea el mecanismo detallado, el resultado es que el IP_3 es necesario para que el RIP_3 responda a la estimulación por Ca^{2+} . Esta interacción tiene implicaciones importantes, ya que permite que el RIP_3 , en presencia de IP_3 , pueda propagar señales de Ca^{2+} inducidas por Ca^{2+} de forma regenerativamente, lo que es el principio del proceso de liberación de calcio inducida por calcio (CICR, por sus siglas en inglés) (Prole y Taylor, 2019). Esquemas de dichos mecanismos se presentan en la Figura 1.3.

Los subtipos del RIP_3 difieren en sus patrones de expresión entre tejidos, tienen diferentes afinidades por IP_3 ($\text{RIP}_{3-2} > \text{RIP}_{3-1} > \text{RIP}_{3-3}$), difieren en sus asociaciones con otras proteínas y en su modulación por señales adicionales. También parecen diferir en su capacidad para sostener oscilaciones de Ca^{2+} y las consecuencias funcionales de perturbar los RIP_3 difieren para los diferentes subtipos (Prole y Taylor, 2016). Los receptores de tipo 3 (RIP_{3-1-3}) se expresan predominantemente en células que proliferan rápidamente y la expresión de estos está regulada a la alza en varios tipos de cáncer, como el glioblastoma, el cáncer de mama, el cáncer gástrico y el cáncer colorrectal (Mound *et al.*, 2017).

De forma general las subunidades que forman el canal iónico tetramero RIP_3 se pueden dividir en 3 regiones: el dominio citoplasmático N-terminal grande (CD), el dominio transmembrana formador del canal (TMD) y el dominio citoplasmático C-terminal (CTD). Cada subunidad del RIP_{3-3} está compuesta por 2,671 residuos. El CD de cada subunidad del RIP_3 tipo 3 se asemeja a un trípode con un dominio de enlace central (CLD) en forma de bisagra, conectado a 3 dominios de solenoide de Armadillo (ARM_{1-3}). El CLD se encuentra en el perímetro externo del receptor tetramero. El dominio N-terminal (ARM_1) se extiende hacia el eje central de simetría de 4 pliegues y se conecta a 2 dominios contiguos β -trébol (β -TF1 y β -TF2), formando el dominio de unión al ligando (LBD). β -TF1 de una subunidad interactúa con β -TF2 de la subunidad vecina formando un borde alrededor del eje de simetría

de 4 pliegues. El segundo dominio ARM (ARM2) sobresale de la CLD y está orientado paralelo a la superficie de la membrana, interactúa con ARM1 de la subunidad vecina y forma la periferia externa del receptor junto con la CLD. El tercer dominio ARM (ARM3) conecta los dominios citoplasmáticos con un dominio yuxtamembrana (JD) situado en la cara citoplasmática de la TMD. El JD está formado por el ensamblaje de dos fragmentos separados por el TMD. Un motivo en U compuesto por una horquilla β y un motivo de hélice a su vez situado en el extremo C-terminal del dominio ARM3 encapsula un dominio similar a un pestillo que se extiende desde el extremo C-terminal del TMD. El JD se estabiliza aún más por un dominio de dedo de zinc H2C2 formado por los residuos Cys-2538, Cys-2541, His-2558, His-2563 y un ion zinc (Wu y Chen, 2023).

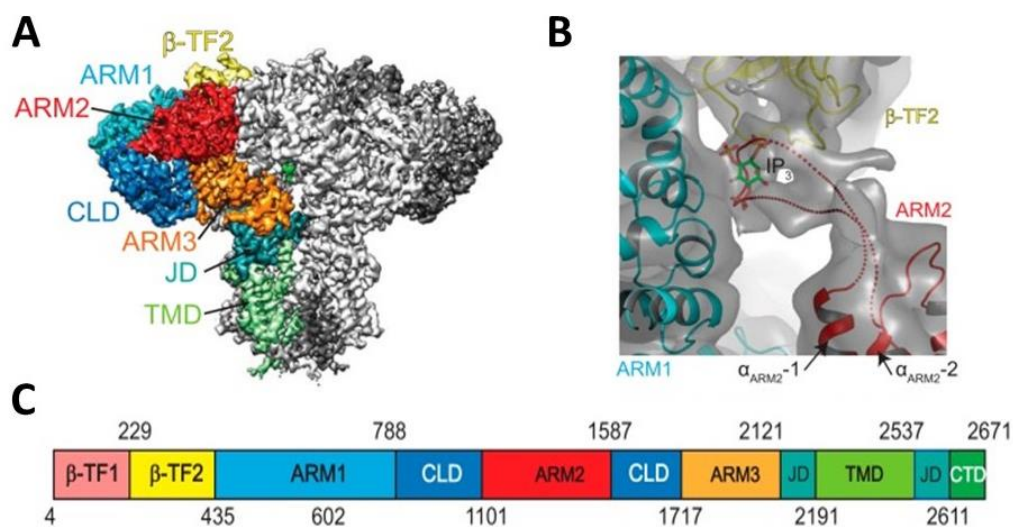


Figura 1.4. Los RIP₃-3 presentan un bucle en el sitio de unión a IP₃. A. Se muestra la estructura tridimensional del RIP₃-3 resuelta por criomicroscopía electrónica. B. Un bucle que se extiende entre la primera y segunda hélice de ARM2 ocupa el sitio de unión a IP₃ en la isoforma 3 del RIP₃, estructura que no se presenta en las otras isoformas y que explica la menor afinidad por IP₃ de este receptor. C. Esquema representativo de los dominios que conforman el RIP₃-3. Modificado a partir de Karakas y colaboradores; 2020.

Los tres tipos de RIP₃ comparten entre un 60 y un 70% de identidad de secuencia. Se ha logrado identificar mediante experimentos de criomicroscopía electrónica (Cryo-EM, por sus siglas en inglés) que el RIP₃-3 presenta un bucle de alta flexibilidad que ocupa el sitio de unión a IP₃ en esta isoforma del receptor. Esta estructura de lazo presente de forma diferencial

en el RIP₃-3 fue resuelta por el grupo de Karakas y colaboradores en 2020 (Azumaya *et al.*, 2020).

1.5 El Factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) y su receptor (EGFR)

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) fue descubierto por Cohen. Este se aisló por primera vez de las glándulas submaxilares del ratón macho adulto, y se observó que estimula la proliferación de una serie de tejidos epiteliales tanto *in vivo* como *in vitro* (Carpenter y Cohen, 1979). El EGF humano es un polipéptido de cadena simple que consta de 53 residuos de aminoácidos, incluidos seis residuos de Cys que forman tres enlaces disulfuro intramoleculares que estabilizan a la proteína y mantienen su actividad biológica (Ogiso *et al.*, 2002). Este factor de crecimiento se sintetiza como un precursor que consta de 1217 residuos de aminoácidos, a partir de los cuales se puede generar la forma madura por proteólisis. El precursor del EGF es una proteína transmembrana glicosilada con un peso molecular aparente de 140-150 kDa (Valcarce *et al.*, 1999). Ya que no tiene un peso molecular único, es muy difícil hablar de concentraciones molares de este factor de crecimiento.

Entre los RTKs que pueden inducir la activación de PLC γ , se encuentra el EGFR, cuyo ligando es el EGF. Este receptor es miembro de la familia ErbB de receptores con actividad de cinasas de tirosina y se encuentra entre los receptores más estudiados tanto en términos de análisis de estructura-función y también como prototipo de oncogén cuyas múltiples mutaciones dan lugar a mutaciones clínicamente relevantes y cánceres en varios tipos de células (Uribe *et al.*, 2021).

El gen del EGFR humano codifica para una proteína de 1210 aminoácidos con una masa molecular de aproximadamente 134 kDa. Los primeros 24 aminoácidos son el péptido señal de esta proteína y a menudo se excluyen de la numeración estructural. El dominio de unión al ligando extracelular del EGFR contiene 620 aminoácidos (25-645) que se dividen en cuatro subdominios: I (L1), II (CR1), III (L2) y IV (CR2). L1 y L2 son dominios ricos en leucina y son responsables de la unión del factor de crecimiento. Tanto CR1 como CR2 son regiones ricas en cisteína con enlaces disulfuro intracatenarios. CR1 desempeña un papel en la

formación de homo o heterodímeros de EGFR con otros miembros de la familia ErbB. L1, CR1 y L2 forman una especie de receptáculo que acomoda al ligando para unirse entre L1 y L2. En el complejo dimérico EGF-EGFR, los dos ligandos de EGF se encuentran en el lado opuesto del dímero y están separados por 79 Å entre sí (Ogiso *et al.*, 2002).

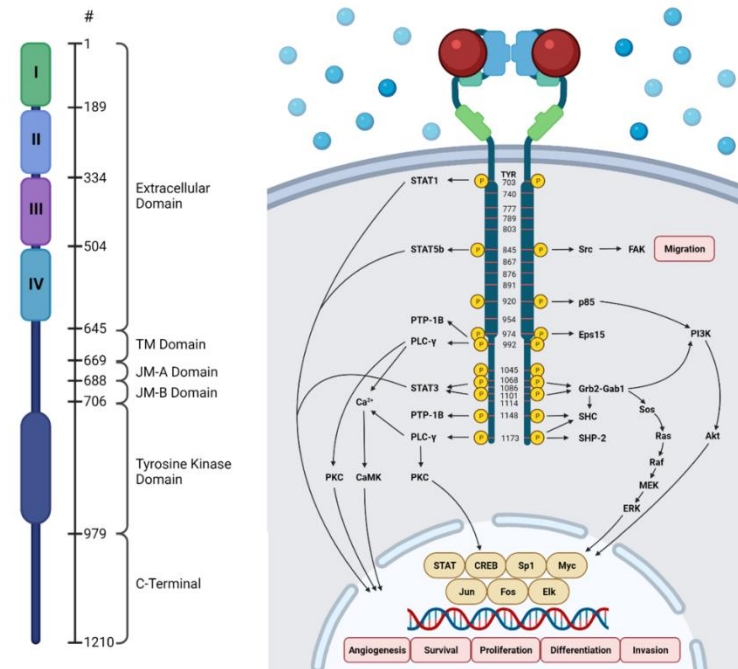


Figura 1.5. El ligando EGF promueve la dimerización del EGFR y activa su cinasa de tirosina para reclutar proteínas y producir cambios en la expresión de genes. Se muestra un esquema de los dominios que conforman la estructura del EGFR. Se presentan los sitios de fosforilación del EGFR y la interacción de algunas proteínas (enzimas y de andamiaje) con éste. Las tirosinas fosforiladas actúan como sitios de reclutamiento para moléculas de señalización posteriores que contienen dominios SH2 y/o PTB. Se representan los factores de transcripción que pueden ser activados mediante las cascadas de señalización río debajo de la activación del EGFR y algunas de las funciones fisiológicas a las que conduce dicha activación. Modificado de Tasia *et al.*, 2022.

El dominio transmembrana (TM) consta de ~22 aminoácidos que conectan el dominio extracelular e intracelular del EGFR. El dominio yuxtamembranal vincula el extremo C terminal del dominio TM con el dominio cinasa del EGFR y desempeña un papel importante en su dimerización y activación. El dominio yuxtamembrana es una región flexible y corta que contiene solo ~ 37 residuos, pero consta de una secuencia de localización nuclear, sitio de unión a calmodulina, proteína cinasa C y sitios de fosforilación de MAPK. El dominio de

cinasa de tirosina (TK) del EGFR consta de un lóbulo N-terminal (lóbulo N) y un lóbulo C-terminal (lóbulo C). El sitio de unión de ATP está ubicado en una hendidura entre los dos lóbulos, debajo de un bucle de unión a fosfato rico en glicina. Finalmente, el dominio C-terminal del EGFR consta de 229 aminoácidos y desempeña un papel importante en la regulación de la activación del receptor al suprimir la actividad de cinasa en ausencia de autofosforilación. Este dominio es rico en prolina, y presenta una estructura flexible (Tasia *et al.*, 2022).

La unión del EGF a la región extracelular del EGFR induce la dimerización del receptor, que acerca los dos dominios citoplasmáticos de cinasa de tirosina de los receptores lo suficiente para que ocurra la autofosforilación, y se establezca la actividad intrínseca de cinasa de tirosina. Como se observa en la Figura 1.5, los residuos de fosfotirosina recién formados se comportan como sitios de acoplamiento para varias proteínas adaptadoras que posteriormente inician cascadas de señalización intracelular, lo que lleva a la activación de efectores posteriores, como la cinasa soluble Src, las vías PI3K/Akt, MAPK, Ras/Raf/Mek/Erk, JAK/STAT y PLC γ 1/PKC, por nombrar las más relevantes (Levantini *et al.*, 2022).

1.6 Los canales Orai se encuentran implicados en SOCE

La entrada de Ca²⁺ operada por depósito (SOCE), es un mecanismo que vincula las dos fuentes principales de Ca²⁺ subyacentes a las señales de Ca²⁺ citosólico en la célula: el espacio extracelular y el mayor reservorio: el RE. Después de la liberación de Ca²⁺ dependiente de agonistas desde el RE, SOCE permite la reposición de las reservas intracelulares agotadas y, en consecuencia, es un actor clave en la homeostasis del Ca²⁺ (Schulte y Blum, 2022).

Los dos principales elementos moleculares implicados en SOCE han sido bien descritos: los primeros son miembros de la familia de moléculas de interacción estromal (STIM), que son proteínas integrales de la membrana del RE que detectan la disminución de los niveles luminales de Ca^{2+} en este organelo y se trasladan a sitios de contacto con la membrana plasmática donde se agrupan y reclutan el segundo componente de SOCE. El segundo componente son los miembros de la familia de canales Orai que median la entrada de Ca^{2+} a la célula (Emrich *et al.*, 2021). Los mamíferos expresan dos proteínas STIM (STIM1/2) y tres proteínas Orai (Orai1-3), que están codificadas por cinco genes independientes. Las tres isoformas de Orai presentan características farmacológicas diferentes (Zhang *et al.*, 2020).

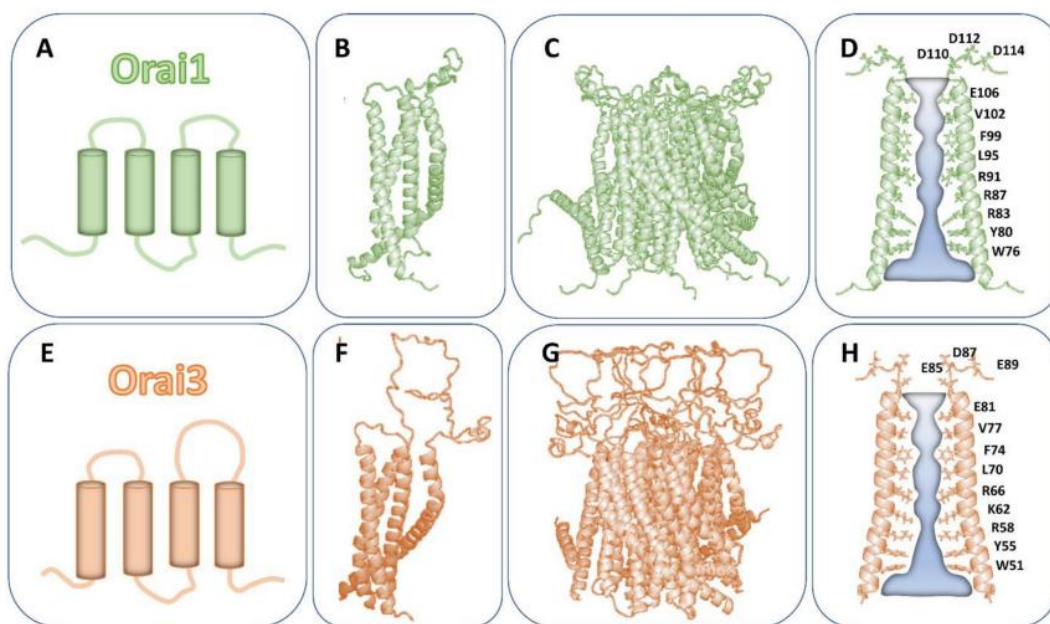


Figura 1.6. Las isoformas 1, 2 y 3 son hexámeros y el poro del canal está formado por seis regiones TM₁. **A y E** representan la estructura secundaria de los canales Orai 1 y 3 respectivamente. **B y F** muestran la estructura terciaria de las subunidades monoméricas de Orai 1 y 3. **C y G.** Estructura terciaria de los hexámeros de Orai 1 y 3. **D y H.** El esquema muestra el poro del canal de las isoformas 1 y 3, el cual está formado por seis segmentos TM₁. Tomado de Tiffner A. y Derler I.; 2021.

Estructuralmente, las tres proteínas Orai consisten en cuatro dominios TM flanqueados por los extremos N y C citosólico, y unidos por dos asas extracelulares y uno intracelular. La Figura 1.6 muestra la estructura secundaria y tridimensional de Orai1 y Orai3. A pesar de que estas isoformas tienen una estructura general comparable, solo comparten un 50-60% de identidad de secuencia general. En detalle, solo la secuencia de las regiones TM₁ es idéntica, mientras que los otros tres dominios TM son comparables en un 81-87%. Las regiones

citoplasmática y extracelular muestran diferencias mayores en la secuencia, y tampoco son totalmente conservados el extremo N-terminal, el extremo C-terminal, ni las asas extra e intracelulares (asas 1, 2 y 3). Esto es suficiente para alterar sus propiedades estructurales y para suponer diferencia en la regulación de las diferentes isoformas de Orai (Tiffner y Derler, 2021).

Todos los homólogos humanos de Orai forman complejos hexaméricos. Dentro del hexámero, los seis dominios TM1 se encuentran en el centro y forman el poro iónico selectivo a Ca^{2+} del canal de Orai. En el lado extracelular, el poro iónico está formado por una región que permite la adsorción de Ca^{2+} , a la que le siguen el filtro de selectividad (E106) y la cavidad hidrofóbica (L95, F99, V102) (Tiffner y Derler, 2021). En general se ha determinado que las subunidades de Orai pueden formar complejos homo-hexaméricos o hetero-hexaméricos para formar el poro del canal (Yoast *et al.*, 2020).

1.7 El Fura-2 AM: un indicador sintético de cociente para determinar Ca^{2+} citosólico

Una estrategia muy exitosa para estudiar el papel del Ca^{2+} en un proceso celular específico ha sido el uso de indicadores fluorescentes de Ca^{2+} . En términos generales, estos indicadores presentan una alteración en sus propiedades fluorescentes con Ca^{2+} unido. Generalmente, existen dos clases principales de indicadores de Ca^{2+} : los sintéticos y las proteínas fluorescentes junto con proteínas que unen Ca^{2+} . Los indicadores de Ca^{2+} se unen y están en equilibrio con la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que representa a los iones Ca^{2+} de libre difusión. En este sentido, es importante recordar que la mayor parte del Ca^{2+} dentro de las células no está libre, sino que está estrechamente unido a proteínas amortiguadoras. Al seleccionar un indicador se debe considerar cuidadosamente no sólo las características espectrales de un indicador químico, sino también prestar mucha atención a sus propiedades de unión (Russell, 2011).

El indicador Fura-2 AM es un tetracarboxilato fluorescente de alta afinidad y selectividad. Está formado por la unión de dos moléculas: BAPTA y estilbeno. El BAPTA, es un tetracarboxilato con la capacidad de quelar Ca^{2+} . El estilbeno es la parte fluorescente del Fura-2, cuyo espectro de excitación muestra un corrimiento hacia longitudes de onda menores ante la unión de Ca^{2+} al BAPTA. Esta característica hace que el Fura-2 sea un

indicador de Ca^{2+} de cociente. La constante de disociación (K_d) o su inversa, la constante de asociación (K_a), describe la afinidad con la que el indicador se une a los iones Ca^{2+} . La K_d tiene unidades molares y corresponde a la concentración de Ca^{2+} a la que la mitad de las moléculas indicadoras están unidas con Ca^{2+} en equilibrio. La K_d del Fura-2 que utilizamos es 200 nM, la cual se obtuvo de ajustes a la curva de saturación del indicador realizados en el laboratorio y es el valor empleado en otros trabajos que han sido previamente publicados (Muñoz *et al.*, 1998). Cuando sea posible, se deben utilizar indicadores para medir concentraciones de Ca^{2+} entre 0,1 y 10 veces su K_d . Este es el rango en el que los cambios en la fluorescencia dependientes de Ca^{2+} son mayores. Las longitudes de onda de excitación del fura son 340 y 380 nm y su longitud de onda de emisión es 510 nm. La fluorescencia a 360 nm no se modifica ante los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]$ y por lo tanto es un control que nos permite calibrar y corroborar que los cambios en fluorescencia se deben a cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]$ y no a algún otro artefacto como cambios en la intensidad de la luz, cambios en la concentración del indicador o la unión de algún otro metal al indicador (Guerrero *et al.*, 2023).

2. ANTECEDENTES

Li y colaboradores (2015) observaron que la estimulación con 30 ng/mL del factor de crecimiento endotelial vascular (vEGF) provocaba el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en varios modelos de células endoteliales como HUVEC, SVEC, CMEC y LEC. Estos autores demostraron midiendo las $[Ca^{2+}]_i$ con el indicador Fura-2 que dicho incremento disminuía ante la ausencia del canal Orai3 al emplear un siRNA del canal como se aprecia en la Figura 2.1 A.

En la Figura 2.1 B se muestra la estadística de las respuestas de Ca^{2+} citosólico para los experimentos realizados por estos autores y se aprecia que usando cualquiera de dos diferentes siRNAs de Orai3 se podía observar una disminución de la primera fase de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ o pico, mientras que no hay cambios en una segunda fase denominada respuesta sostenida (Li *et al.*, 2015). Estos experimentos demuestran la participación de Orai3 en el mecanismo de incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por este factor de crecimiento. Por otra parte, estos autores proponen que el canal Orai3 viaja del interior de la célula a la MP, sin considerar que eso toma mucho más tiempo que el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$.

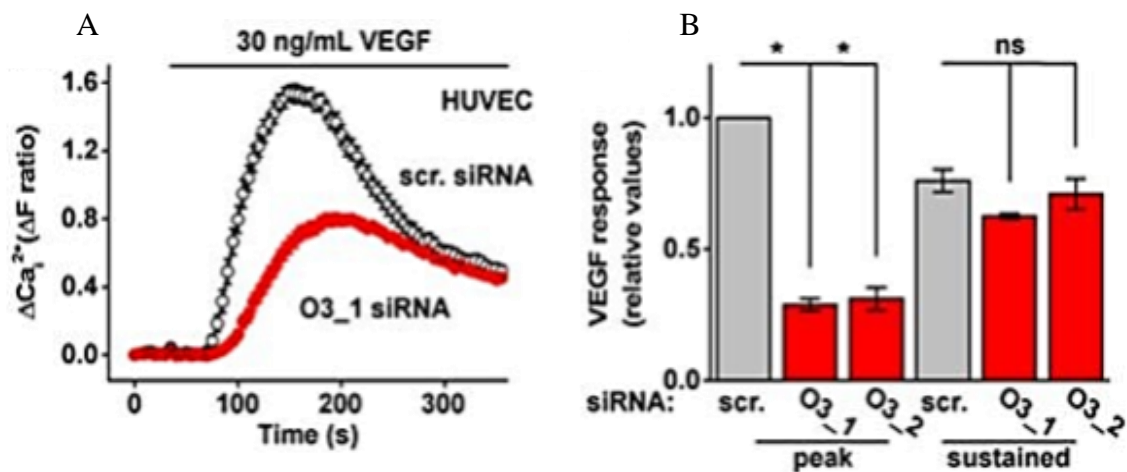


Figura 2.1. Un siRNA de Orai3 disminuye la fase de pico del incremento de las $[Ca^{2+}]_i$ que provoca la estimulación con vEGF en células HUVEC. A. Mediciones de $[Ca^{2+}]_i$ en células HUVEC empleando Fura-2 en dos grupos de células transfectadas, el primero con un siRNA control y el segundo con un siRNA de Orai3. **B.** Estadística de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ en la fase pico y sostenida empleando los siRNAs de Orai 3 O3_1 y O3_2. Tomado de Li J. y colaboradores; 2015.

Sin embargo, en nuestro laboratorio, Leon Aparicio en el año 2017 realizó experimentos de microscopía confocal, utilizando el RIP₃ tipo 1 como un marcador de retículo y evaluó la colocalización de este canal con las tres isoformas de Orai. Estos experimentos se muestran en la Figura 2.2 y como se aprecia en la cuantificación, se observó un alto coeficiente de Manders que indica colocalización entre Orai3 y el RIP₃ (Leon-Aparicio *et al.*, 2017). Estos resultados coinciden con lo observado por Varadarajan y colaboradores en el 2013, que demostraron la colocalización de BAP 31, un marcador del retículo, con el canal Orai3 (Varadarajan *et al.*, 2013).

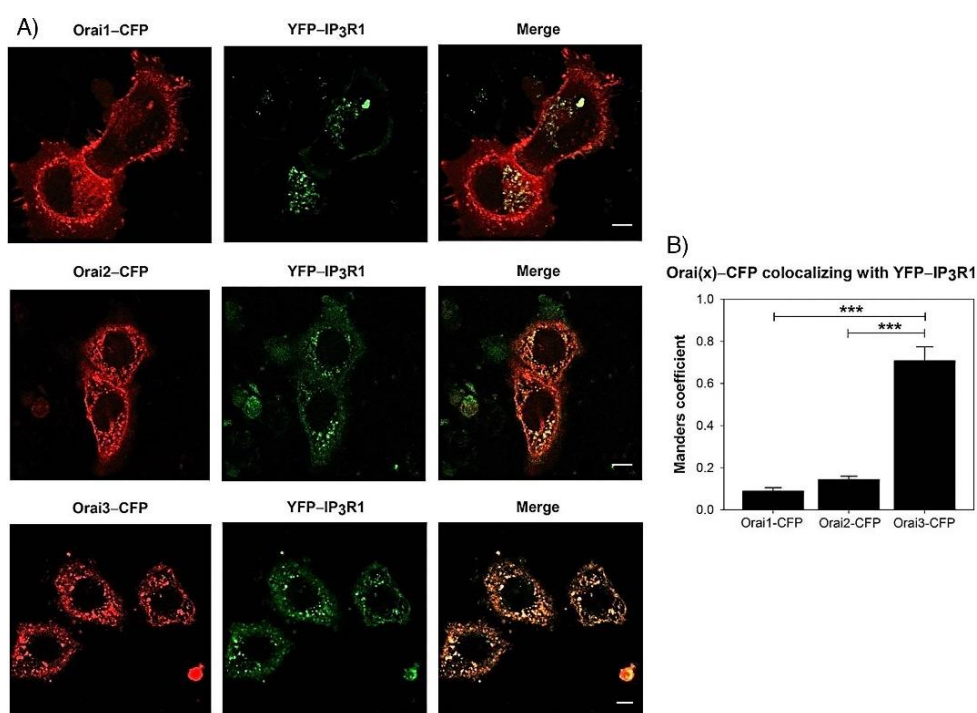


Figura 2.2. El canal orai3 es un canal de la membrana del RE. A. Imágenes de microscopía confocal utilizando las isoformas de Orai acopladas a la proteína fluorescente cian (CFP) y el RIP₃ tipo 1 marcado con la proteína fluorescente amarilla (YFP). **B.** Estadística para la colocalización entre Orai1, 2 y 3 y el RIP₃ tipo 1 empleando el coeficiente de Manders. Tomado de Leon Aparicio y colaboradores; 2017.

Los canales Orai3 y Orai1 presentan diferencias estructurales (Tiffner y Derler, 2021) y también quedó demostrado que diferencias en su localización mayoritaria, lo que plantea la posibilidad de una función diferente para ambas isoformas. El 2-APB (2-aminoetoxidifenil borato) había sido caracterizado como inductor de fuga de Ca²⁺ del RE dependiendo de la

concentración utilizada del fármaco por León Aparicio y colaboradores, en este mismo año (Leon-Aparicio *et al.*, 2017), y se empleó como herramienta en la demostración de que el canal Orai3 es un canal de fuga del RE. Estos autores realizaron registros de Ca^{2+} citosólico y luminal en las mismas células, empleando los indicadores Fura-2 y Mag-Fluo-4, como se muestra en la Figura 2.3. En los experimentos mostrados se emplearon dos grupos de células HeLa, el primer grupo transfectado con siRNA control y el otro con siRNA de Orai3.

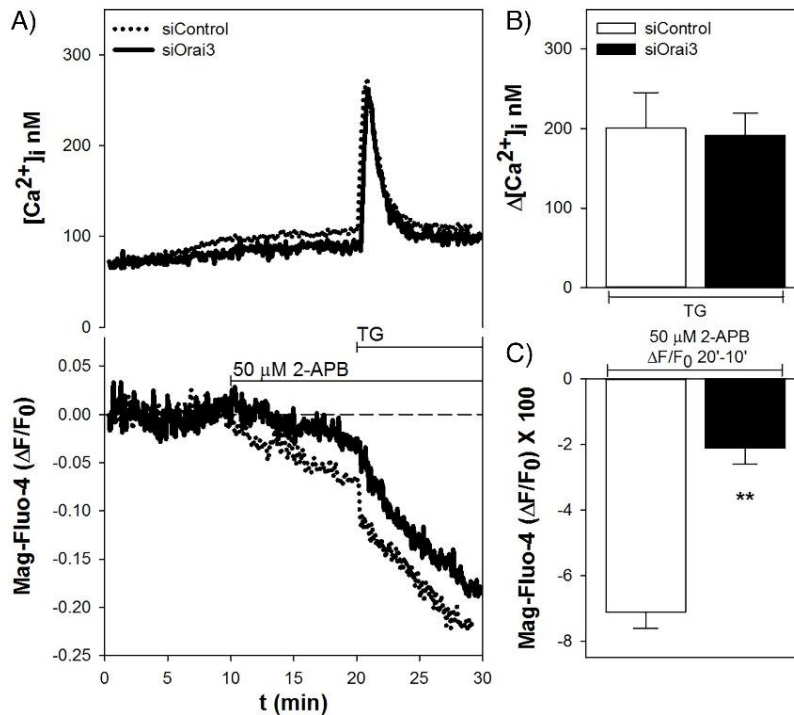


Figura 2.3. El canal Orai3 es un canal de fuga del RE. A. Registros de Ca^{2+} citosólico y luminal en las mismas células. Los registros se realizaron en una solución que contenía 1.8 mM de Ca^{2+} . Se aplicó a los 10 min un estímulo de 2-APB (50 μM) y a los 20 min de Tg (1 μM). B. Estadística para el efecto de Tg en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se aprecia que no hubo cambios en estas dos condiciones. C. Estadística para la salida de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{luminal}}$, provocado por el 2-APB, la cual se ve afectada ante la ausencia del canal Orai3. Tomado de León Aparicio y colaboradores; 2017.

Para el protocolo de registro se aplicó un estímulo con 50 μM de 2-APB, en este mismo trabajo se demostró que tiene efectos diferenciales en las diferentes isoformas de Orai, y se plantea que provoca la apertura de Orai3. Posteriormente, se añadió Tg para provocar el vaciamiento del RE. Como podemos apreciar en la Figura 2.3 C, en las células en las que se utilizó el siRNA de Orai3, estaba disminuida la salida de Ca^{2+} del RE, lo que sugiere que el canal Orai3 es un canal de fuga de este compartimento (Leon-Aparicio *et al.*, 2017).

El hEGF, otro factor de crecimiento diferente de vEGF también provoca incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$, en diferentes modelos celulares que expresan el EGFR; por ejemplo: en células de glioblastoma y A431 (Bryant *et al.*, 2004), en células de hepatoma humano (Fu *et al.*, 1994), y también en el modelo de células HeLa (Uyemura *et al.*, 2005), de interés para nuestro proyecto. En este sentido, lo convencionalmente establecido es que la producción de IP_3 vía $PLC\gamma$ conducen a la activación del RIP_3 y a la consecuente liberación de Ca^{2+} .

U73122 es un aminoesteroide descrito como un inhibidor de PLC. Los efectos de este inhibidor han sido previamente reportados para $PLC\gamma$ en células de fibroblastos orbitales (Roh *et al.*, 2023) y en células T CD4 del sistema inmune (Kumari *et al.*, 2015). También, como se observa en la Figura 2.4, se ha reportado la inhibición de la respuesta provocada por EGF y carbachol en células HSY al emplear U73122 (Zhang *et al.*, 2002).

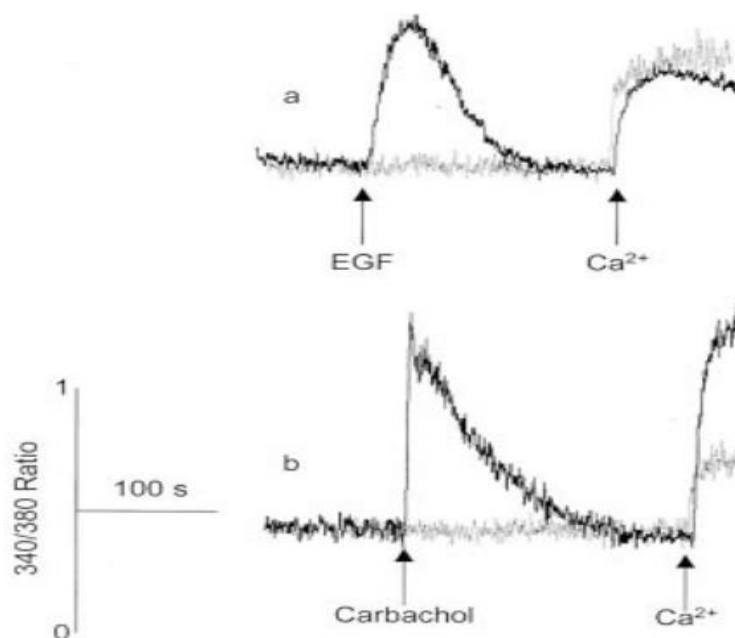


Figura 2.4. U73122 es un inhibidor de $PLC\gamma$ y de las oscilaciones de Ca^{2+} de EGF. En células HSY el uso del U73122 (5 μ M), un inhibidor de PLC, pre-incubado durante 10 min, elimina la respuesta de Ca^{2+} que se produce en suspensiones de células. **A.** Se muestran trazos representativos de los registros de la $[Ca^{2+}]_i$ empleando Fura-2 en células HSY estimuladas con 5 nM de EGF en células control (líneas negras) y células pre-incubadas con U73122 (líneas grises). **B.** Se muestran trazos representativos de los registros de la $[Ca^{2+}]_i$ empleando Fura-2 en células HSY estimuladas con 100 μ M de carbachol en células control (líneas negras) y células pre-incubadas con U73122 (líneas grises). Tomado de Zhang y colaboradores; 2002.

Por otra parte, en el 2010 Kang y colaboradores observaron en células de glioma U178MG empleando el indicador Fura-2, que la respuesta de Ca^{2+} producida por hEGF podía ser inhibida por cafeína (Kang *et al.*, 2010). El efecto inhibitorio de cafeína no se observó solamente en la respuesta de EGF, sino que pudo observarse para otros agonistas productores de IP_3 como TFLLR (Figura 2.5). Este último es un péptido (treonina-fenilalanina-leucina-leucina-arginina) agonista selectivo para el receptor activado por proteasa-1 (PAR1). PAR-1 es un receptor acoplado a proteína G que se expresa en múltiples tipos celulares en el sistema nervioso, con la expresión más prominente en las células gliales (Han *et al.*, 2011). El hecho de que cafeína inhibe la respuesta inducida tanto por receptores tipo RTK como GPCR, generó la pregunta de si se debe a un efecto en el IP_3 directamente. En este sentido estos mismos autores realizaron un experimento en un modelo de células HEK293T, en el que sobreexpresaron los tres tipos de IP_3 , y evaluaron la inhibición de las respuestas de Ca^{2+} en presencia de cafeína para cada grupo, como se muestra en la Figura 2.6. Estos experimentos sugieren la participación del IP_3 en el mecanismo de inhibición de la respuesta de Ca^{2+} por cafeína.

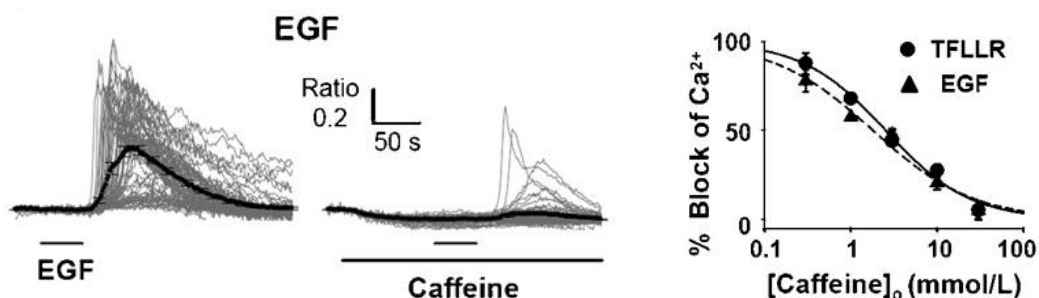


Figura 2.5. EGF produce incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células de glioblastoma. En células U178MG puede observarse un transitorio de Ca^{2+} en respuesta a la estimulación con 100 ng/mL de EGF que se inhibe con cafeína, de forma dependiente de la dosis. Tomado de Kang y colaboradores; 2010.

La cafeína es un modulador clásico de la actividad del RyR (Murayama *et al.*, 2018). En este proyecto se empleó un modelo de células HeLa y teniendo en cuenta la acción que ejerce cafeína en el RyR es necesario considerar su expresión en este tipo celular. La evidencia de la expresión de RyR en varios tejidos excitables y no excitables se ha obtenido principalmente utilizando métodos moleculares o farmacológicos. Para otras células no

excitables existe el problema de que las técnicas moleculares han identificado la expresión de ARNm de RyR, pero la evidencia funcional ha sido confusa, ya que algunos agentes activadores de RyR no logran evocar respuestas en estas células. Por ejemplo, en las células epiteliales del pulmón y en los linfocitos T de Jurkat, que parecen expresar RyR3, se han observado efectos de la rianodina, pero no de la cafeína (Hakamata *et al.*, 1994).

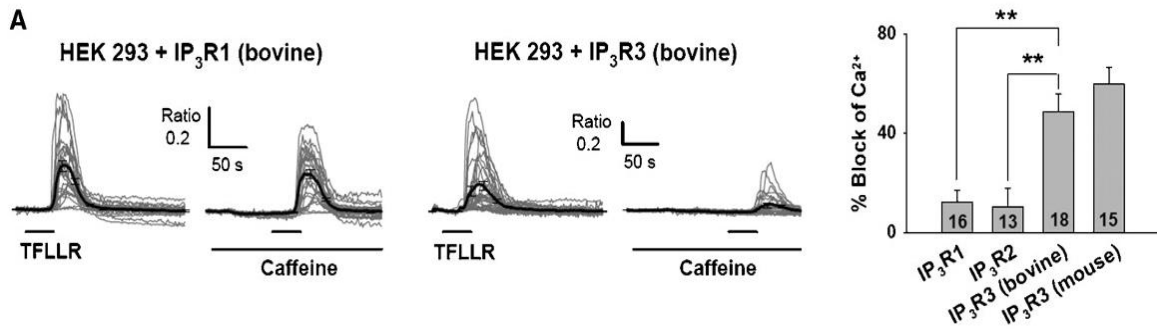


Figura 2.6. El RIP₃-3 es el más sensible a la inhibición por cafeína. En células HEK 293T se sobreexpresan las tres isoformas del RIP₃ y el porcentaje de inhibición en la respuesta de Ca²⁺ del agonista en aquellas en las que se sobreexpresó el RIP₃ tipo 3 fue mayor. Tomado de Kang y colaboradores; 2010.

La expresión de RyR en HeLa no está totalmente esclarecido, ya que a pesar de estar presente el mensajero en este tipo celular, la proteína no muestra las características farmacológicas convencionales presentes en las células excitables. Las células HeLa son PCR positivas para el RyR2 y en un ensayo de unión empleando rianodina marcada se muestra que hay unión a la proteína, aunque muy baja en comparación a células excitables de cerebro de conejo como se muestra en la figura 2.7 (Bennett *et al.*, 1996).

El RyR en estas células no excitables no muestra las mismas características farmacológicas que en células excitables convencionales ya que no responden a estímulos de cafeína. En los experimentos que se muestran en la Figura 2.9 se utilizaron concentraciones de 2 a 40 mM de cafeína y no se observó respuestas de Ca²⁺ en estas células. La liberación de Ca²⁺ en respuesta a la aplicación de histamina descarta que se deba al vaciamiento del depósito.

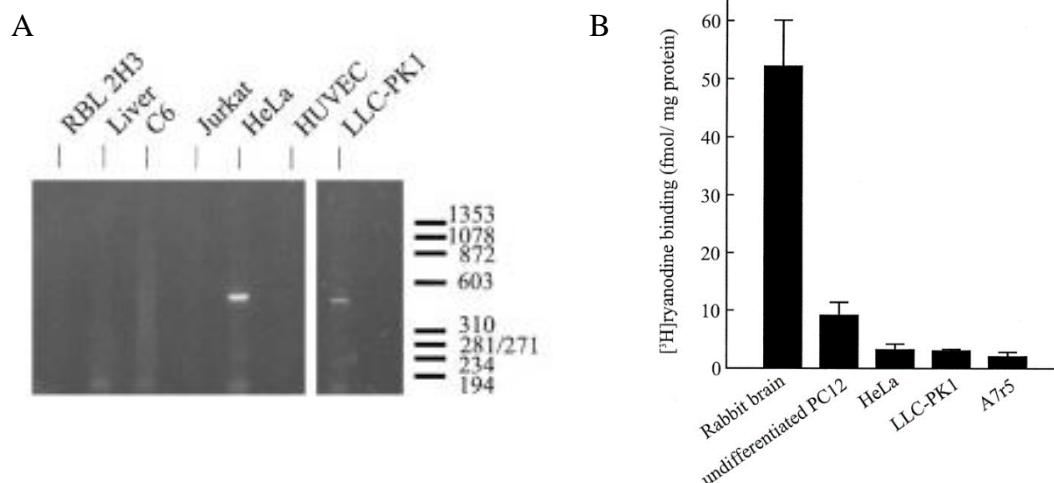


Figura 2.7. El mensajero de RyR2 está presente en células HeLa. A. En la evaluación de la expresión de RyR en diferentes modelos celulares no excitables solo fue posible observar su presencia en células HeLa y LLC-PK1. **B.** Un ensayo de unión a rianodina muestra que si hay presencia de RyR en células HeLa. Tomado de Bennett y colaboradores; 1996.

Con la finalidad de identificar las isoformas del receptor de Ryanodina que se estarían expresando a nivel ARN mensajero (ARNm) en células HeLa cultivadas en nuestro laboratorio, el Dr. Leonardo Gallegos realizó ensayos de RT-PCR (Figura 2.8). En el caso del RyR1 se observa otra banda, lo que parece indicar que los oligonucleótidos empleados no eran lo suficientemente específicos, pero los datos sugieren que efectivamente las células HeLa expresan la versión truncada de los RyRs, particularmente de la isoforma 3, esto fue confirmado por ensayos de restricción enzimática. La posible explicación es que aquellos investigadores que realizan PCR con oligonucleótidos de la región N-terminal o central no observan la presencia de ARNm, mientras que al emplear oligonucleótidos de la región C-terminal hay amplificación.

Sin embargo, según Bennett y colaboradores, la rianodina tiene un efecto en estas células como se muestra en el experimento de la figura 2.9 B, donde se estimularon a las células HeLa con ATP de forma repetitiva en ausencia o presencia de rianodina. Fue posible observar que aquellas en las que estaba presente la rianodina presentaban respuestas de Ca^{2+} disminuidas (Bennett *et al.*, 1996).

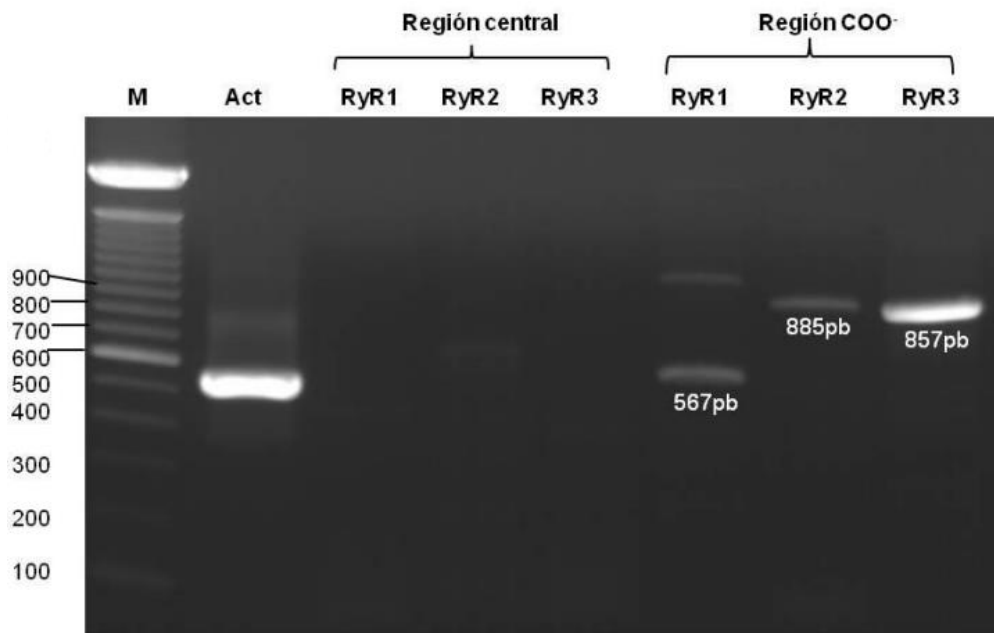


Figura 2.8. Identificación y verificación de la isoforma de RyR presente en células HeLa. Se muestran los productos amplificados esperados de 567, 885 y 857 pb para RyR1, 2 y 3, respectivamente pero sólo del canal truncado (Región COO⁻). No se detectó amplicones utilizando oligos de la región central, RyR1 (378 pb), RyR2 (584 pb) y RyR3 (797 pb). Control de actina (Act; 539 pb). Tomado de la tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias del Dr. Leonardo M. Gallegos; 2013.

En células embrionarias de la médula suprarrenal PC12 se ha observado que la bradicinina (BK, por sus siglas en inglés), produce una sensibilización que provoca el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ por la posterior estimulación con EGF. En este modelo se ha evaluado la participación de 2-APB y rianodina en la respuesta de EGF, y las conclusiones de los autores son que la rianodina no afecta la liberación de Ca^{2+} inducida por este factor de crecimiento, pero sí el 2-APB (Figura 2.10), aunque es una baja concentración de rianodina la empleada por estos autores. Como mostramos anteriormente en nuestros antecedentes, este último provoca el vaciamiento de RE por su acción en el canal Orai3, aunque los autores lo emplean como un inhibidor del RIP_3 (Hur *et al.*, 2005).

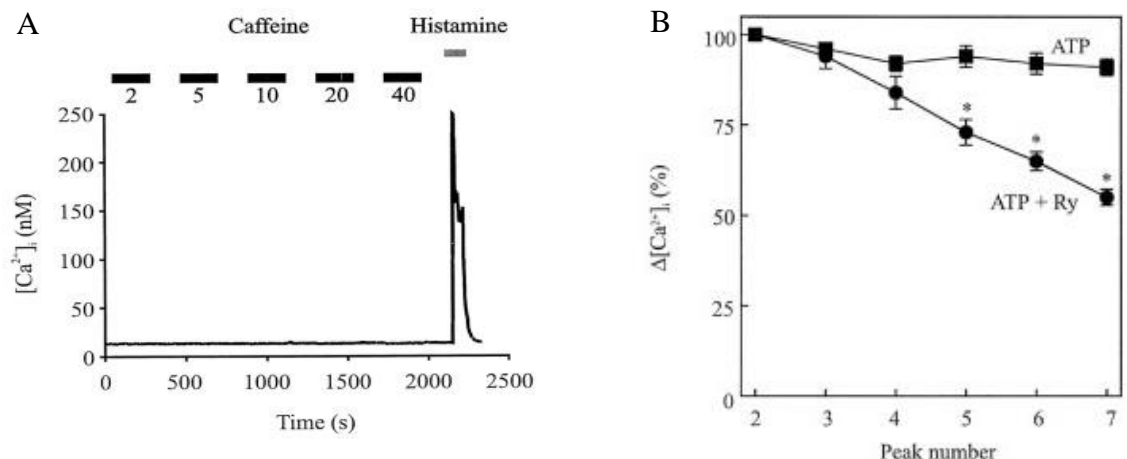


Figura 2.9. El RyR2 presente en células HeLa no tiene las propiedades farmacológicas convencionales. **A.** Empleando cinco concentraciones de cafeína (2, 5, 10, 20, 40 mM) no fue posible observar respuesta de Ca^{2+} citosólico en células HeLa, pero la aplicación de Histamina (100 μM) provoca liberación de Ca^{2+} del RE. **B.** El empleo de rianodina (10 μM) atenúa las respuestas de Ca^{2+} citosólico ante la estimulación repetitiva con ATP (100 μM). Tomado de Bennett y colaboradores; 1996.

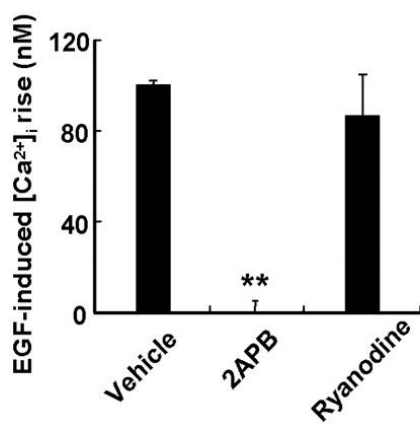


Figura 2.10. Efectos del 2-APB y la rianodina en la sensibilización de las células PC12. Las células PC12 cargadas del indicador Fura-2 se estimularon con BK (1 μM), seguidas de incubación con 2-APB (75 μM) o rianodina (1 μM) durante 3 min, y finalmente se estimularon con EGF (20 nM). Se midió la amplitud máxima del aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por EGF y es apreciable que la rianodina no afecta las respuestas de EGF, pero sí el 2-APB. Tomado de Hur E. y colaboradores; 2005.

Actualmente, no existe una caracterización de la respuesta de Ca^{2+} citosólico de EGF y se vuelve muy importante esclarecer los mecanismos involucrados en la misma. Todos estos datos mostrados anteriormente nos conducen a las preguntas: ¿Es universal que el canal Orai3

está involucrado en la respuesta de Ca^{2+} que producen los factores de crecimiento? ¿La respuesta de hEGF implica Ca^{2+} proveniente de depósitos intracelulares como RE, donde se encuentra Orai3? ¿Están involucrados en estas respuestas de Ca^{2+} los canales de liberación clásicos RIP_3 y RyR? Teniendo en cuenta estas interrogantes se desarrolló el presente trabajo.

3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 JUSTIFICACIÓN

El EGF induce incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ en diferentes modelos celulares que expresan su receptor de membrana, el EGFR. Estos incrementos se deben a la activación de canales de Ca^{2+} ya sea de la membrana plasmática o de los depósitos intracelulares. En el caso de las células HeLa, el hEGF induce un incremento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ en ausencia de Ca^{2+} externo. Esto sugiere que hEGF libera Ca^{2+} de compartimentos intracelulares. El proyecto contempla caracterizar dicha respuesta, así como dilucidar los canales de liberación implicados en este modelo celular (RIP₃, RyR u Orai3).

3.2 HIPÓTESIS

El incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la estimulación con hEGF en células HeLa se debe a la activación de la PLC γ , producción de IP₃ y la subsecuente activación del RIP₃.

3.3 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por hEGF en células HeLa y estudiar la fuente de Ca^{2+} involucrada y la participación de diferentes canales de liberación en dicha respuesta.

3.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por hEGF en diferentes condiciones de amortiguamiento de Ca^{2+} citosólico (250 nM y 2 μ M de Fura-2 AM) en células HeLa.
2. Caracterizar la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por hEGF empleando taspigargina en combinación con histamina para provocar el vaciamiento del RE en ausencia de Ca^{2+} externo en células HeLa.
3. Comparar la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por hEGF con la inducida por agonistas como la histamina en células HeLa.

4. Evaluar la participación de PLC γ en la liberación de Ca²⁺ inducida por hEGF empleando un inhibidor (U73122) y su análogo inactivo (U73343), de forma aguda y pre-incubada.
5. Estandarizar las condiciones de transfección empleando el agente PEI y evaluar el efecto del canal no funcional Orai3 E81A (dominante negativa) en las respuestas de [Ca²⁺]_i inducida por hEGF.
6. Utilizar inhibidores permeantes del RIP₃ en la liberación de Ca²⁺ inducida por hEGF como son la cafeína o Xestospongina.
7. Evaluar la participación del RyR en el mecanismo de liberación de Ca²⁺ provocado por la estimulación con hEGF en este modelo celular.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Soluciones y reactivos

La histamina (His), tapsigargina (Tg), factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) y cafeína se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El indicador de Ca^{2+} Fura-2/AM fue comprado a la compañía Invitrogen (Molecular Probes). El inhibidor de PLC U73122 y su análogo inactivo U73343 fueron obtenidos de Biomol Research Lab. La Histamina fue disuelta en agua MiliQ, el hEGF en ácido acético 10 mM y los compuestos hidrófobicos en dimetil sulfóxido (DMSO) anhidro. La cafeína fue diluida en solución salina con 1.8 mM de Ca^{2+} . Los compuestos que fueron añadidos durante un registro se prepararon a una concentración mil veces mayor que las concentraciones experimentales finales que se describen. En el caso de hEGF la solución concentrada fue de 12.5 μM .

4.2 Cultivo celular.

Se utilizó como modelo la línea celular HeLa CCL-2 (células tumorales derivadas de cáncer cervicouterino humano) obtenidas de ATCC. Las células se cultivaron en cajas petri de 60 mm x 15 mm (Corning). Se empleó medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's) con alta Glucosa, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 0.5% de antibiótico (100 unidades/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina). Las células se crecieron a 37°C, con 5% de CO_2 en una incubadora Nuair.

Para el pase celular se siguió el protocolo que se describe a continuación. Las células se observaron al microscopio óptico y una vez alcanzado el 90% de confluencia, se retiró el medio de cultivo y se lavaron con 1 mL de PBS 1X. Posteriormente, se empleó tripsina al 0.05%, durante 1 minuto (min) a 37°C para despegar las células de la caja petri empleando el flujo de medio fresco. Éstas se sembraron en una nueva caja que contenía 5 mL del medio DMEM suplementado con 10% SFB y 0.5% de antibiótico, teniendo en cuenta que las células se duplican en 24 horas.

4.3 Transfección de células HeLa empleando los agentes Lipofectamina[®]2000, FuGENE HD[®] y PEI (1X)

Lipofectamina[®]2000

Para llevar a cabo la transfección con agentes de naturaleza lipídica se utilizó Lipofectamine[®] 2000 de la empresa Thermo Fisher Scientific, esta lipofectamina es un reactivo compatible con Opti-MEM[®], reactivo que permite optimizar la transfección. En dos tubos (A y B) de microcentrífuga se colocan 100 μ L de Opti-MEM[®]. En el tubo “A” se adicionan 8 μ L de lipofectamina y 300 μ L de Opti-MEM[®]. En el tubo “B” se adicionan 4 μ g de los plásmidos problema y 300 μ L de Opti-MEM. Se le aplicó por tres segundos una ligera homogeneización con la micropipeta. En este caso los plásmidos de interés fueron Orai3 nativo y Orai3 DN (dominante negativa, E81A). Posteriormente el contenido de “B” se adicionó a “A” y se homogenizó con ligeros reflujos realizados con la pipeta. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Una vez que el cultivo de células HeLa alcanzó el 80% de confluencia celular, se retiró el medio DMEM (suplementado como fue descrito anteriormente) de las cajas y se añaden 3 mL de Opti-MEM. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla se adicionó a la caja de cultivo y se homogenizó con ligeros movimientos circulares. Posteriormente, la caja se incubó a 37 °C, en una atmósfera de 95% aire / 5% CO₂ durante 6 h y se cambió el medio Opti-MEM a medio DMEM suplementado. Una vez transcurridas las 48 h post-transfección, se llevaron a cabo los registros de Ca²⁺ correspondientes, como se describirá en las secciones siguientes.

FuGENE HD[®]

Debido a que la Lipofectamina 2000 es citostática, el otro agente de naturaleza lipídica que se utilizó fue FuGENE HD[®] de la empresa Promega. Para realizar la transfección, con una relación 1:3, se colocaron 100 μ L de medio DMEM libre (sin suplementar) y 4 μ g de Orai3 DN en un tubo de microcentrífuga. Se le aplicó por tres segundos una ligera homogeneización con la micropipeta. Luego se añadió 12 μ L del agente FuGENE HD[®]. Posteriormente, se mezcló gentilmente con la micropipeta y la mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez que el cultivo de células HeLa alcanzó el 80% de confluencia celular, se retiró el medio DMEM (suplementado como fue descrito anteriormente) de las cajas y se

añadió 3 mL de medio DMEM sin suero. Una vez transcurrido el tiempo de incubación del plásmido y FuGENE, la mezcla se adicionó a la caja de cultivo y se homogenizó con ligeros movimientos circulares. Posteriormente, la caja se incubó a 37 °C, en una atmósfera de 95% aire / 5% CO₂ durante 6 h y se cambió el medio a medio DMEM suplementado. Una vez transcurridas las 24 h, se llevaron a cabo los registros de Ca²⁺ correspondientes.

PEI (1X)

La polietilenimina lineal (PEI) es un polímero ampliamente utilizado para empaquetar ADN en partículas de tamaño nanométrico para su posterior endocitosis por la célula blanco. El polímero lineal está formado por aminas cuaternarias separadas por grupos etileno:(Curtis *et al.*, 2016)



El PEI fue gentilmente donado por el Dr. Juan Carlos Gómora Martínez del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Para realizar la transfección (relación 1:3) se emplearon dos tubos (A y B) de microcentrífuga. En el tubo “A” se adicionó 4 µg de plásmido Orai3 DN y 4 µg del plásmido vacío, llevándolo a un volumen final de 250 µL de NaCl (150 mM). En el tubo “B” se adicionó 24 µL de PEI, a un volumen final de 250 µL de NaCl (150 mM). Ambos tubos se homogeneizaron con vórtex y spin durante 1 s. Posteriormente se agregó la mezcla del tubo “B” al “A” y se volvieron a homogeneizar con vórtex y spin. La mezcla se incubó durante 25 minutos a temperatura ambiente. Una vez el cultivo de células HeLa alcanzó el 80% de confluencia celular, se retiró el medio DMEM (suplementado como fue descrito anteriormente) de las cajas y se añadió medio DMEM sin suero ni antibiótico. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla se adicionó a la caja de cultivo y se homogenizó con ligeros movimientos circulares. Posteriormente, la caja se incubó a 37 °C, en una atmósfera de 95% aire / 5% CO₂ durante 6 h y se cambió el medio a medio DMEM suplementado. Una vez transcurridas las 24 h, se llevaron a cabo los registros de Ca²⁺ correspondientes. En el caso del experimento control (Mock), se llevó a cabo de manera similar el procedimiento, sólo que, en este caso, se adicionó 8 µg del vector vacío.

4.4 Registros de Ca^{2+} citosólico empleando el indicador Fura 2-AM

Las células se tripsinizaron y colectaron en 1 mL de medio fresco en un tubo Eppendorf de 1.6 mL. Éstas se centrifugaron a 400xg durante 3 min a temperatura ambiente, posteriormente se desechó el sobrenadante y se colectó la pastilla, la cual se resuspendió en Solución Salina (SS): 121 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgCl_2 , 1.8 mM CaCl_2 , 6 mM NaHCO_3 , 25 mM HEPES y 5.5 mM de glucosa, pH 7.3, temperatura ambiente. La viabilidad celular se comprobó mediante un ensayo de exclusión de azul de tripano, empleando una dilución 1:10 con azul de tripano al 0.4% en solución de registro, siendo siempre superior al 95% la supervivencia celular. Las células se contaron en cámara de Neubauer y se ajustó su densidad a 1 millón de células por mL de solución de registro. Se añadió el indicador Fura-2 AM a las concentraciones de 250 nM, 1 μM y 2 μM , como se describirá para cada experimento y se incubaron las células protegidas de la luz durante una hora a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron nuevamente a 400 g durante 3 min a temperatura ambiente para eliminar el exceso de indicador y se colocaron en un volumen final de 2.5 mL de SS. Los registros de fluorescencia se realizaron empleando como longitudes de excitación del Fura-2, 340 nm, 360 nm y 380 nm, y empleando como longitud de emisión, 510 nm. Estos registros se hicieron en el espectrofluorómetro DeltaRAM V PTI.

Para los registros se emplearon las siguientes concentraciones finales de los reactivos indicados que se utilizaron añadiendo 2.5 μL de una solución concentrada 1000x: 80 ng/mL de hEGF, 1 μM de Tg, 100 μM de Histamina, 5 μM de U73122, 5 μM de U73343, 3 mM xestospongina. En el caso de 20 mM de cafeína sola o con 50 μM de rianodina se disolvieron en la SS ya que su límite de solubilidad no nos permite añadirla concentrada.

4.5 Calibración de Fura-2 AM

Como se describió previamente en este documento el Fura-2 AM es un indicador sintético de cociente que puede medir $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Para la calibración de este indicador, luego de culminado el experimento y ya aplicados los estímulos de interés, se añadió digitonina al 0.01%, un detergente que permeabiliza las células y nos permite que el Ca^{2+} acceda al Fura-2 y así obtener la saturación del mismo. Posteriormente se añadió 10 mM de EGTA, lo que permite determinar la fluorescencia en ausencia de calcio, y finalmente, para apagar la

fluorescencia del indicador y determinar la autofluorescencia se empleó 11 mM de Manganeso (Figura 4.1).

Para obtener las concentraciones de calcio libre en el citoplasma, primeramente, se restó el fondo (valores que se obtienen al emplear manganeso) a los valores de fluorescencia obtenidos en el registro para las diferentes longitudes de onda. Los cocientes de fluorescencia se determinaron a partir de la fluorescencia obtenida al añadir digitonina (R_{max}) y EGTA (R_{min}). Finalmente, se utilizó la ecuación de Grynkiewicz:

$$\text{Calcio (nM)} = \frac{Kd * \beta * (R - R_{min})}{R_{max} - R}$$

Donde los parámetros representan:

Kd : Constante de disociación del Fura-2 (200 nM)

β : Cociente de fluorescencia F380 en ausencia de calcio y F380 en condiciones de saturación del indicador

R_{min} : Cociente de fluorescencia F340/F380 en ausencia de calcio

R_{max} : Cociente de fluorescencia F340/380 en condiciones de saturación del indicador

R : Cociente de fluorescencia F340/F380 en el registro

En el caso de los parámetros R_{min} y R_{max} fueron multiplicados por la constante 0.75, el cual representa una constante de viscosidad del medio y se obtuvo al realizar experimentos midiendo la variación de la fluorescencia para $\lambda=340$ y $\lambda=380$ dentro y fuera de la célula (Poenie, 1990).

4.6 Ajuste de la respuesta de hEGF a una ecuación biexponencial

Se realizó el ajuste de la respuesta de hEGF a una ecuación biexponencial en los protocolos de registro EGTA-hEGF-Histamina o EGTA-Histamina-hEGF, o sea cuando este fue el primer o el segundo estímulo. Para ello se empleó el software Microsoft Excel® Professional Plus 2019.

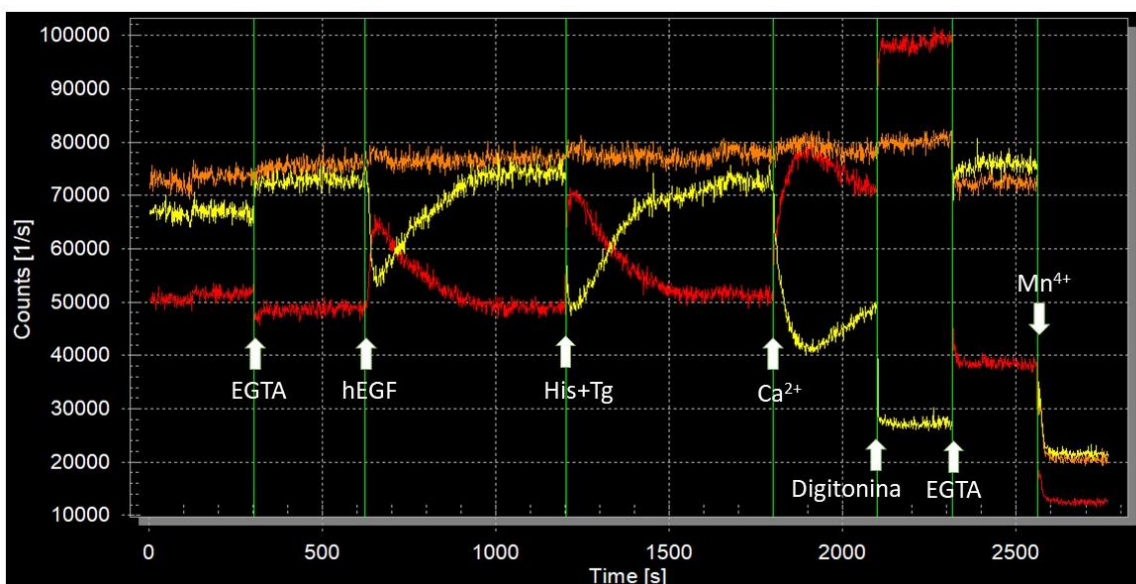


Figura 4.1. Registro de células HeLa CCL2 empleando 500 nM de Fura-2 AM. Se muestran representados con flechas blancas los momentos en los que se aplicaron los estímulos añadidos durante el registro. Se empleó 2 mM de EGTA al inicio, posteriormente se aplicó 80 ng/mL de hEGF, ATP (10 μ M) en combinación con Tg (1 μ M), CaCl_2 (2 mM), Digitonina al 0.01%, EGTA (10 mM) y Manganeseo (11 mM). Se muestran las longitudes de excitación del Fura-2 (λ_{exc} 340 nm, en rojo; λ_{exc} 360 nm, en naranja; λ_{exc} 380 nm, en amarillo).

Se tomaron 100 puntos que representan mediciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el tiempo de la respuesta de hEGF, tanto en presencia o ausencia de histamina. Estas mediciones se ajustaron a la ecuación biexponencial que se presenta a continuación:

$$A = A_0 \left(1 - e^{(-t+b) \cdot \frac{\ln(2)}{t_1}} \right) * e^{(-t+b) \cdot \frac{\ln(2)}{t_2}} + C$$

Donde los parámetros representan:

A_0 : Máxima respuesta de calcio en ausencia de remoción (nM)

t: tiempo (segundos)

b: tiempo inicial (segundos)

t_1 : tiempo medio de liberación de calcio (segundos)

t_2 : tiempo medio de remoción de calcio (segundos)

C: $[Ca^{2+}]_i$ a tiempo infinito o en estado estacionario final (nM)

Finalmente se calculó el cuadrado de la diferencia entre el dato (se usó un mínimo de 100 datos) y el valor de la ecuación para ese tiempo y la suma total del cuadrado de las diferencias. Teniendo en cuenta este valor se utilizó la Herramienta Solver para minimizar la suma de cuadrados y así tener los valores que mejor ajustan las variables A_0 , b , t_1 , t_2 y C. La idea de utilizar tiempos medios en vez de constantes cinéticas es que estos valores se pueden verificar fácilmente en el gráfico del ajuste.

4.7 Evaluación del amortiguamiento de Fura-2 en la respuesta inducida por hEGF

En estos ensayos se evaluaron dos condiciones de amortiguamiento por el indicador Fura-2: bajo y alto. Se emplearon 250 nM y 2 μ M respectivamente. Para comparar las respuestas de $[Ca^{2+}]_i$ se determinó el área bajo la curva (ABC) durante los 120 segundos de dichas respuestas y descontando la $[Ca^{2+}]_i$ basal promedio. La amplitud se determinó como la diferencia entre la $[Ca^{2+}]_i$ basal y el promedio de los siete puntos con la máxima respuesta.

4.8 Ensayos con el inhibidor U73122 y su análogo inactivo U73343

En estos ensayos las células se registraron empleando dos protocolos diferentes. En uno de ellos el inhibidor y el análogo inactivo se aplicaron en agudo (durante el registro), en el otro se aplicaron de forma pre-incubada (se incubaron las células por 1 hora junto con el Fura-2/AM). En ambos casos se aplicaron 5 μ M de U73122 y de U73343. Posteriormente, las células se lavaron y se colocaron en SS. Los registros se realizaron como se detalla en la sección 4.3.

4.9 Ensayos en Solución Salina con cafeína

Para el ensayo se emplearon células control, las cuales se registraron en la SS como se describe en la sección 4.3. Para la condición en estudio las células, luego de lavado el exceso de indicador, se colocaron en solución de cafeína: 121 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM $MgCl_2$, 1.8 mM $CaCl_2$, 6 mM $NaHCO_3$, 25 mM HEPES y 5.5 mM de glucosa, pH 7.3, temperatura ambiente y 20 mM de cafeína. Se realizó el registro de fluorescencia en un volumen final de 2.5 mL de solución salina con cafeína.

4.10 Ensayos de participación del RyR

Las células se lavaron del exceso de indicador y se pre-incubaron durante 10 minutos en una solución de cafeína 20 mM, en el caso de las células control. En el caso de las células problema, se añadió solución de cafeína 20 mM y 50 μ M de rianodina. Las células se lavaron y se colocaron en SS sin cafeína ni rianodina para los registros de fluorescencia.

4.11 Análisis estadístico de los resultados

Todos los resultados representan al menos tres experimentos independientes. Los gráficos representativos y el análisis estadístico se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 5.01. Los promedios se expresan como media \pm error estándar de la media (n, número de experimentos independientes). Se realizaron las pruebas de normalidad D'Agostino y Pearson y Shapiro-Wilk, y luego de comprobar que había una distribución normal, los datos fueron analizados por la prueba-t de Student ya sea pareado o no pareado, según se indique, donde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ son estadísticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Registros de Ca^{2+} citosólico en respuesta a hEGF en células HeLa y efecto de dos concentraciones diferentes de Fura-2 AM

Ya que está descrito que EGF no es un gran productor de IP_3 (Matsuda *et al.*, 2001), nos propusimos encontrar las condiciones adecuadas para medir la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por hEGF, evaluando dos concentraciones diferentes del indicador Fura-2 AM, ya que estaría modificando la capacidad amortiguadora de Ca^{2+} del citoplasma y esto dificultaría observar una respuesta. Para ello, se incubaron las células con 250 nM y 2 μM de Fura-2 AM, para determinar si un menor amortiguamiento (250 nM) facilitaría observar las respuestas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a EGF. Comprobamos que las concentraciones de Ca^{2+} intracelular eran mayores en la condición de 2 μM de indicador comparando las cuentas/segundos correspondientes a la longitud de onda de 360 nm, que se obtienen en los registros en bruto (Datos mostrados en Anexos). Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) en las cuentas/segundos de 360 nm en el caso de bajo amortiguamiento (18170 ± 1119 cuentas/segundos) respecto a alto amortiguamiento con Fura-2 (55840 ± 2932 cuentas/segundos).

En la Figura 5.1 se muestran los trazos representativos y los gráficos de los experimentos realizados. Los estímulos se aplicaron en ausencia de calcio externo ya que se adicionó EGTA (2 mM) al tiempo indicado en el trazo. En el primer protocolo se añadió hEGF (80 ng/mL, que equivale a una concentración molar estimada de 12.5 nM), histamina (100 μM) en combinación con Tg (1 μM), para provocar el vaciamiento del RE, y al final Ca^{2+} (2 mM) para observar SOCE. El otro protocolo se realizó a la inversa, se aplicó primeramente el estímulo con Histamina más Tg y posteriormente hEGF, culminando con la adición de Ca^{2+} .

Un primer análisis fue comparar las respuestas de hEGF e histamina combinada con Tg como los primeros estímulos. Pudimos apreciar que las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basales fueron significativamente ($p < 0.01$) mayores con 250 nM de Fura-2 AM (102.80 ± 4.76 nM, $n=16$) con respecto a 2 μM (82.32 ± 4.37 nM, $n=16$).

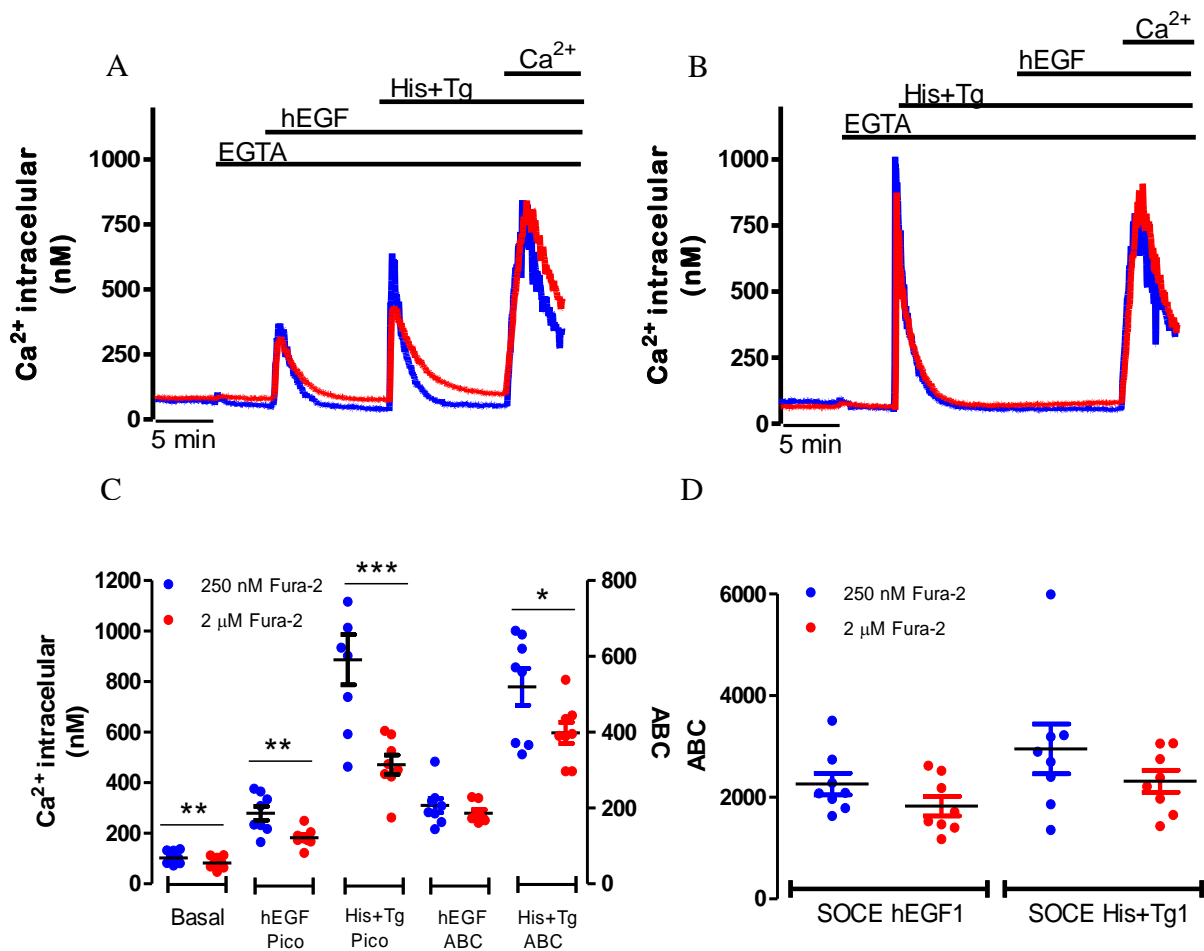


Figura 5.1. Registro de Ca^{2+} citosólico en células HeLa CCL2 empleando 250 nM y 2 μ M de Fura-2 AM. A y B. Se muestran trazos representativos de los registros de la $[Ca^{2+}]_i$ en los que se empleó un millón de células incubadas previamente con 250 nM (línea azul) ó 2 μ M (línea roja) del indicador Fura-2 AM. En A se aplicó una concentración final de 2 mM de EGTA donde se indica, posteriormente se añadió 80 ng/mL de hEGF, seguido de Histamina (100 μ M) en combinación con Tg (1 μ M) y de $CaCl_2$ (2 mM). En B se empleó 2 mM de EGTA al inicio, posteriormente se aplicó Histamina (100 μ M) en combinación con Tg (1 μ M), 80 ng/mL de hEGF y $CaCl_2$ (2 mM). C. Gráficos mostrando los valores promedio de la $[Ca^{2+}]_i$ basal (nM) y las amplitudes de las respuestas de $[Ca^{2+}]_i$ (nM) (eje y izquierdo) y el ABC (eje y derecho) cuando las respuestas a hEGF o a Histamina+Tg son los primeros estímulos. D. Efecto de las diferentes concentraciones de Fura-2/AM en el ABC de SOCE según los protocolos aplicados. n=8, $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ y $p^{***} < 0.001$.

No hallamos diferencias al determinar la estadística del ABC en la respuesta de hEGF utilizando estas dos concentraciones de Fura-2, y se observaron diferencias significativas en las respuestas de histamina+Tg entre 250 nM (519.60 ± 48.61 nM·min) y 2 μ M ($398.40 \pm$

27.96 nM·min). También, en las amplitudes máximas de las respuestas de hEGF entre menor (279.20 ± 27.34 nM) y mayor (182.70 ± 12.66 nM) amortiguamiento de indicador. También, observamos diferencias en las respuestas máximas de histamina+Tg en 250 nM (886.90 ± 99.77 nM) comparado con 2 μ M (471.20 ± 38.48 nM) de Fura-2/AM. La entrada de Ca^{2+} debida a SOCE no se vio afectada por la concentración de Fura-2/AM.

5.2 Efecto del vaciamiento del RE empleando un agonista productor de IP_3 y Tg en la respuesta de hEGF

La respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por hEGF se observó en ausencia de Ca^{2+} externo, lo que indica que el ion proviene de compartimentos intracelulares. Para determinar la naturaleza del depósito se vació el RE con la combinación de histamina+Tg. En este caso las respuestas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ representan la liberación irreversible de Ca^{2+} por la combinación del RIP_3 activado por histamina y la inhibición de la bomba SERCA con Tg del RE (Figura 5.2A).

El ABC de las respuestas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidas por histamina+Tg sugiere que el hEGF no produce un vaciamiento sostenido del RE. Sin embargo, la amplitud de la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ debida a histamina+Tg sí se vio afectada por la presencia de hEGF puesto que la primera respuesta (886.90 ± 99.77 nM) fue mayor que la observada después de hEGF (643.90 ± 78.28 nM) en 250 nM de Fura-2/AM y para 2 μ M se observó también la reducción entre la primera (471.20 ± 38.48 nM) y la segunda respuesta (339.40 ± 24.82 nM), aunque mostró una mayor significancia debido a una menor variabilidad con alto Fura-2/AM (Figura 5.2D).

La estadística del ABC de la respuesta de Ca^{2+} producida por la adición de hEGF mostró de forma reproducible la completa inhibición cuando fue el segundo estímulo añadido al minuto 20 (9.10 ± 0.88 nM·min), respecto a cuando fue el primero (206.80 ± 19.05 nM·min) para 250 nM; y para 2 μ M de Fura-2/AM (186.60 ± 9.26 y 5.59 ± 0.55 nM·min; respectivamente; Figura 5.2C). En el caso del pico de la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se observó el mismo comportamiento que en las ABC, mostrando diferencias significativas para las diferentes condiciones de amortiguamiento de 250 nM (4.04 ± 1.71 nM y 279.20 ± 27.34 nM) y para 2 μ M (0.66 ± 0.51 nM y 182.70 ± 12.66 nM). Esto nos permite concluir que hEGF está liberando Ca^{2+} del RE.

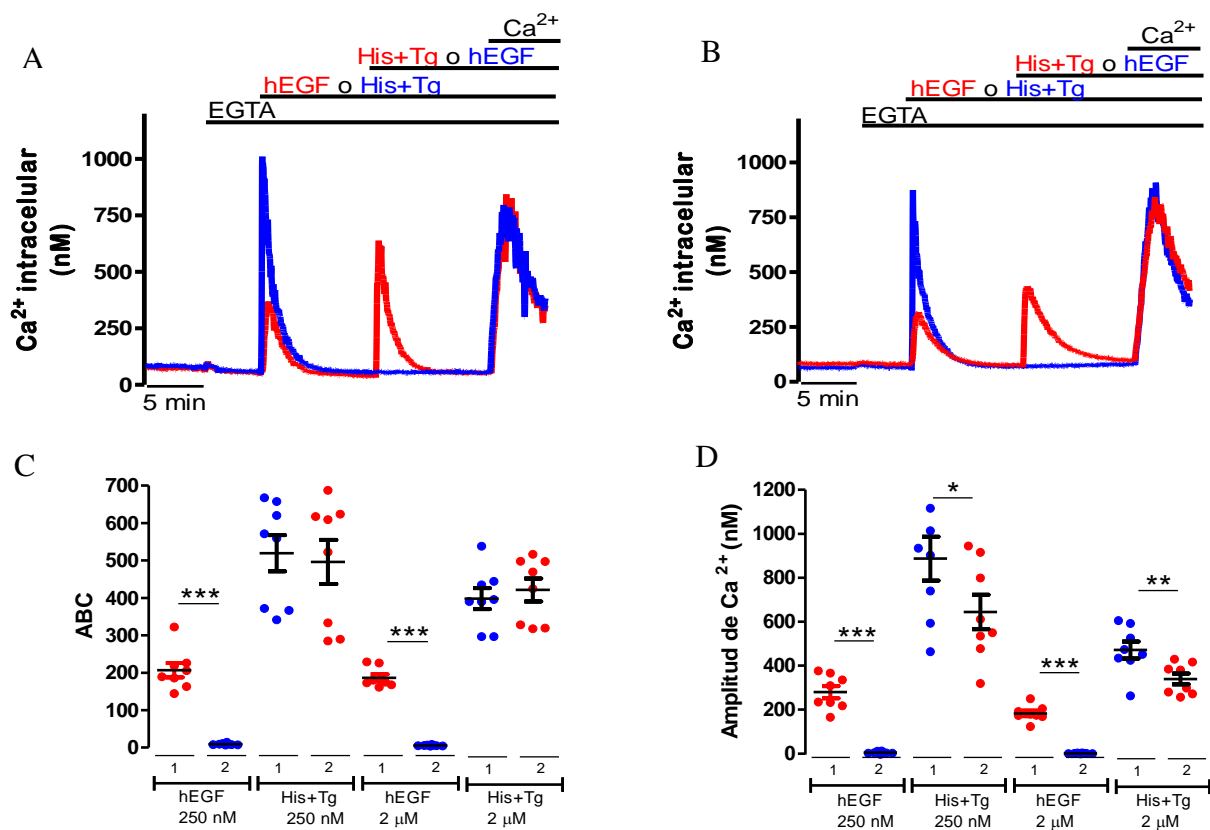


Figura 5.2. Efecto del vaciamiento del RE en el incremento de Ca^{2+} citosólico inducido por hEGF en células HeLa CCL2 empleando 250 nM y 2 μM de Fura-2 AM. **A** Se muestran trazos representativos de los registros con 250 nM del indicador Fura-2/AM. **y B.** Se muestran trazos representativos de los registros con 2 μM del indicador Fura-2/AM. **C.** Se muestra la estadística del ABC para las respuestas de hEGF e Histamina+Tg cuando eran el primer o segundo estímulo (Mostrado como 1 y 2) en presencia de 250 nM y 2 μM de Fura-2. **D.** Estadística de la Amplitud de Ca^{2+} para las respuestas de hEGF e Histamina+Tg cuando eran el primer o segundo estímulo. $n=8$, $p^* < 0.05$, $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$.

A raíz de estos experimentos, decidimos utilizar 1 μM de Fura-2/AM ya que no se observó una amplificación de la respuesta con bajo Fura-2, además que bajas concentraciones de este indicador producen más variabilidad en las respuestas inducidas por agonistas. Adicionalmente, en el laboratorio, aunque son datos no publicados, se ha evaluado que no hay diferencia entre el uso de 1 ó 2 μM de Fura-2.

5.3 Comparación de las respuestas de $[Ca^{2+}]_i$ a la adición de hEGF e histamina en ausencia de Ca^{2+} externo.

Ya que hEGF libera Ca^{2+} del RE al igual que histamina, decidimos corroborar si hubiese desensibilización heteróloga entre estos dos agonistas. Para ello seguimos dos protocolos en ausencia de Ca^{2+} externo. En el primer protocolo, se aplicó hEGF seguido de histamina, y en el segundo, se invirtió el orden de los agonistas (Figura 5.3A). En este caso, solamente realizamos la estadística de ABC pues la amplitud máxima mostró muy pocos puntos para que fuera confiable.

Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas, mediante una prueba-t de Student no pareada, en ABC debida a hEGF si éste era el primer (279.00 ± 33.77 nM·min) o segundo estímulo (186.80 ± 26.56 nM·min). Sin embargo, el ABC de histamina no se afectó por la presencia de este factor de crecimiento a pesar de que el ABC de hEGF es similar al de histamina (Figura 5.3B). Estos experimentos nos permiten concluir que hEGF e histamina comparten el mismo depósito intracelular en el que provocan la liberación de Ca^{2+} .

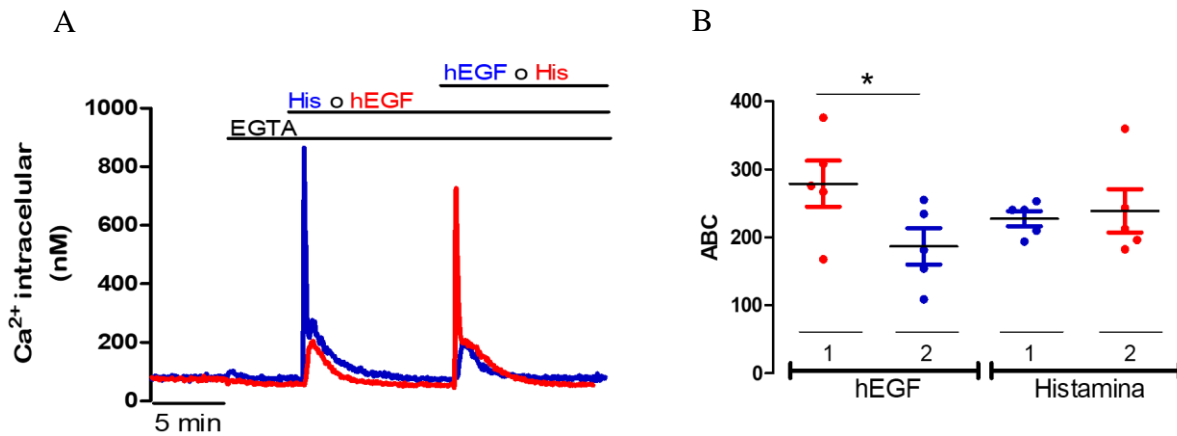


Figura 5.3. La estimulación con histamina reduce la respuesta de hEGF pero el hEGF no afecta la respuesta de histamina. A. Se muestran los trazos representativos de los registros en los que se aplicó EGTA (2mM), Histamina (100 μ M) y hEGF (80 ng/mL) (línea azul) y EGTA (2 mM), hEGF (80 ng/mL) e Histamina (100 μ M) (línea roja) en presencia de 1 μ M del indicador Fura-2 AM. **B.** Estadística del ABC para las respuestas de hEGF e Histamina cuando eran el primer o segundo estímulo (1 y 2). n=5, $p^* < 0.05$.

5.4 La histamina no afecta la cinética de liberación de Ca^{2+} inducida por el hEGF pero sí su amplitud.

Ya que la histamina redujo la respuesta de hEGF decidimos hacer un ajuste no lineal para determinar si había un cambio en las constantes cinéticas o en el tamaño del depósito al cual accede el hEGF. Se realizó la determinación de los parámetros cinéticos correspondientes mediante el ajuste a una ecuación biexponencial como se describió en la sección de Materiales y Métodos (Figura 5.4A, B).

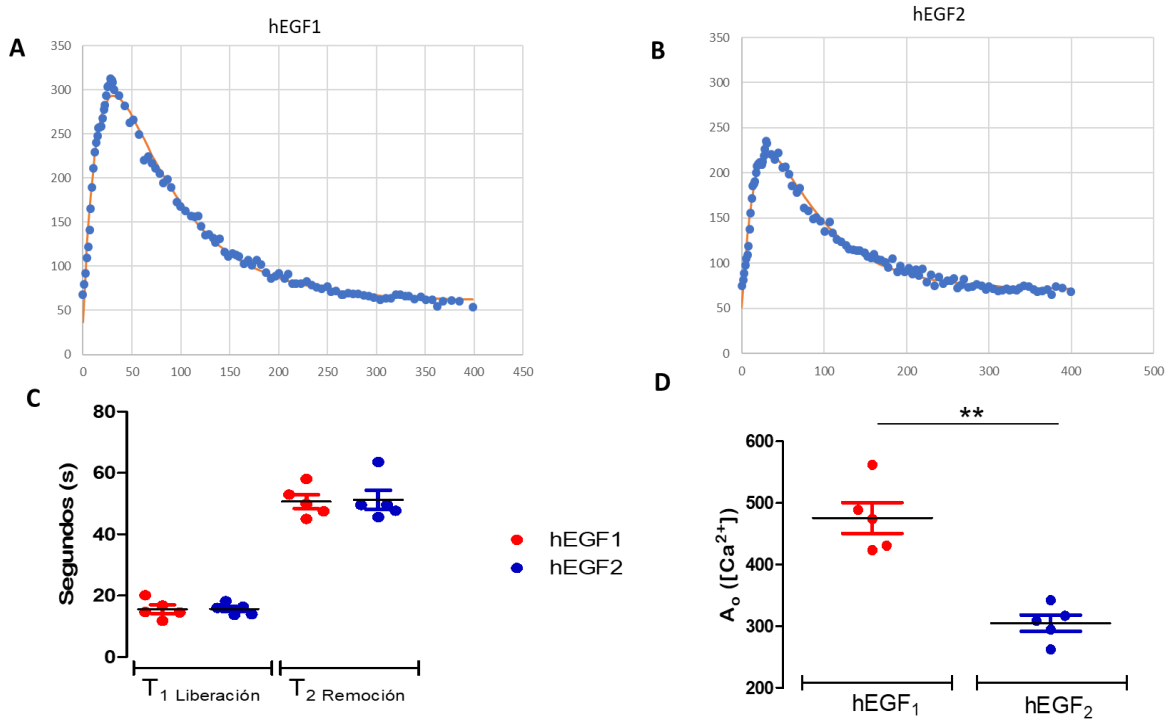


Figura 5.4. La disminución en la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por hEGF en presencia de histamina no se debe a cambios en los parámetros cinéticos. **A.** Ajuste a la ecuación biexponencial de la respuesta de hEGF como primer estímulo. **B.** Ajuste a la ecuación biexponencial de la respuesta de hEGF como segundo estímulo. **C.** Estadística de los tiempos medios de liberación (t_1) y remoción (t_2) para las respuestas de hEGF cuando era el primer (puntos rojos) o segundo estímulo (puntos azules). **D.** Estadística de la máxima respuesta de calcio en ausencia de remoción para las respuestas de hEGF cuando era el primer (puntos rojos) o segundo estímulo (puntos azules). $n=5$, $**p<0.01$.

Al determinar los tiempos medios de liberación (t_1), que corresponde a la primera fase de la respuesta, o de remoción (t_2), que corresponde a la segunda fase de la respuesta, no se

encontraron diferencias cuando hEGF fue el primer o segundo estímulo (Figura 5.4C). Podemos entonces concluir que histamina disminuye la respuesta de hEGF sin cambios en la cinética de liberación y remoción de Ca^{2+} inducidos por hEGF.

Sin embargo, el parámetro que representa el tamaño (A_0) del RE que está liberando el hEGF, sí fue significativamente menor después de histamina (Figura 5.4D). Esto sugiere que sólo la histamina produce un vaciamiento parcial del RE que se refleja en una menor respuesta a hEGF.

5.5 Efecto del U73122, un inhibidor selectivo de PLC, aplicado de forma aguda y pre-incubado en la respuesta de hEGF

Posteriormente, evaluamos la participación de PLC γ en la respuesta de Ca^{2+} inducida por hEGF. Para ello, empleamos un inhibidor de PLC (U73122) y su análogo inactivo U73343 como control. Se utilizaron dos protocolos en los que se añadieron estos reactivos de forma pre-incubada (1 h, Figura 5.5A) o aguda (5 min, Figura 5.6A) en el experimento con la secuencia siguiente, EGTA (2 mM), histamina (100 μM) y hEGF (80 ng/mL).

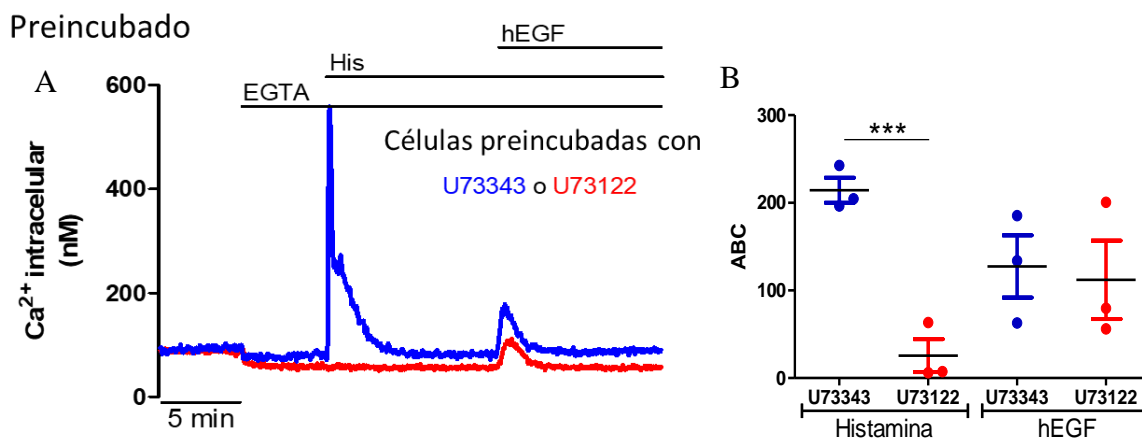


Figura 5.5. Efecto del inhibidor de PLC U73122 aplicado de forma pre-incubada en la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por hEGF e histamina. **A.** Trazos representativos de registros de células incubadas durante 1 h con 5 μM de U73122 (trazo azul) y células incubadas durante el mismo tiempo con 5 μM de U73343 (trazo rojo). **B.** Estadística de las ABC de las respuestas de Ca^{2+} de histamina y hEGF en presencia del análogo inactivo U73343 (azul) y el inhibidor de PLC U73122 (rojo) añadidos de forma pre-incubada, $n=3$. *** $p<0.001$.

El añadir U73122 de forma pre-incubada (Figura 5.5B) o aguda (Figura 5.6B) resultó en una inhibición de la respuesta de histamina pero no en aquellas incubadas con U73343. A pesar de que esto indica que U73122 está funcionando correctamente, no logramos observar efectos de éste en la respuesta de Ca^{2+} de hEGF.

Es importante mencionar que no podemos incrementar la concentración de estos inhibidores puesto que, al ser de naturaleza lipofílica, el análogo inactivo U73343 disminuye el ABC debido al hEGF. Realizamos la comparación entre las células nativas sin fármacos adicionales y en aquellas pre-incubadas con U73343 y con U73122 y encontramos que los ABC fueron estadísticamente menores debido a la presencia de los reactivos (Figura 10.3, Anexo). Esto concuerda con el hecho de que la respuesta a hEGF es poco robusta y sensible a daños en la membrana plasmática.

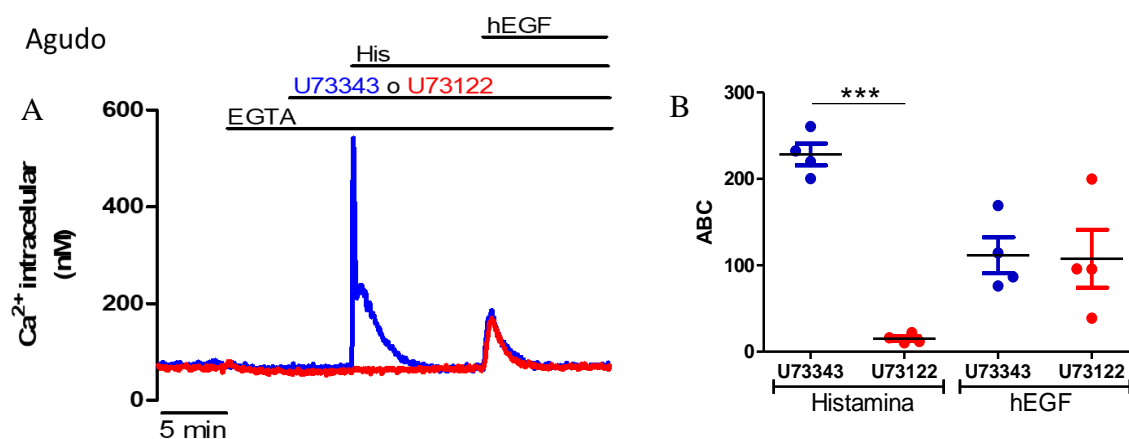


Figura 5.6. El inhibidor de PLC U73122 no requiere una preincubación prolongada para inhibir la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por histamina. **A.** Trazos representativos de registros de células en las que se aplicó en el tiempo indicado 5 μM de U73122 ó 5 μM de U73343. **B.** Estadística de las ABC de las respuestas de Ca^{2+} de histamina y hEGF en presencia del análogo inactivo U73343 (azul) y el inhibidor de PLC U73122 (rojo) añadidos de forma aguda, $n=4$, $***p<0.001$.

5.6 Participación del canal Orai3 en la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por hEGF

El canal Orai3 participa en la respuesta a VEGF (Li *et al.*, 2015) y además este canal puede liberar Ca^{2+} del RE (Leon-Aparicio, *et al.*, 2017), por lo cual decidimos explorar su posible participación en la liberación de Ca^{2+} citosólico inducida por hEGF. Inicialmente se realizó

la transfección de las células con Lipofectamina-2000, después se utilizó FUGENE y por último se implementó el uso de PEI como se indicó en la sección de Materiales y Métodos.

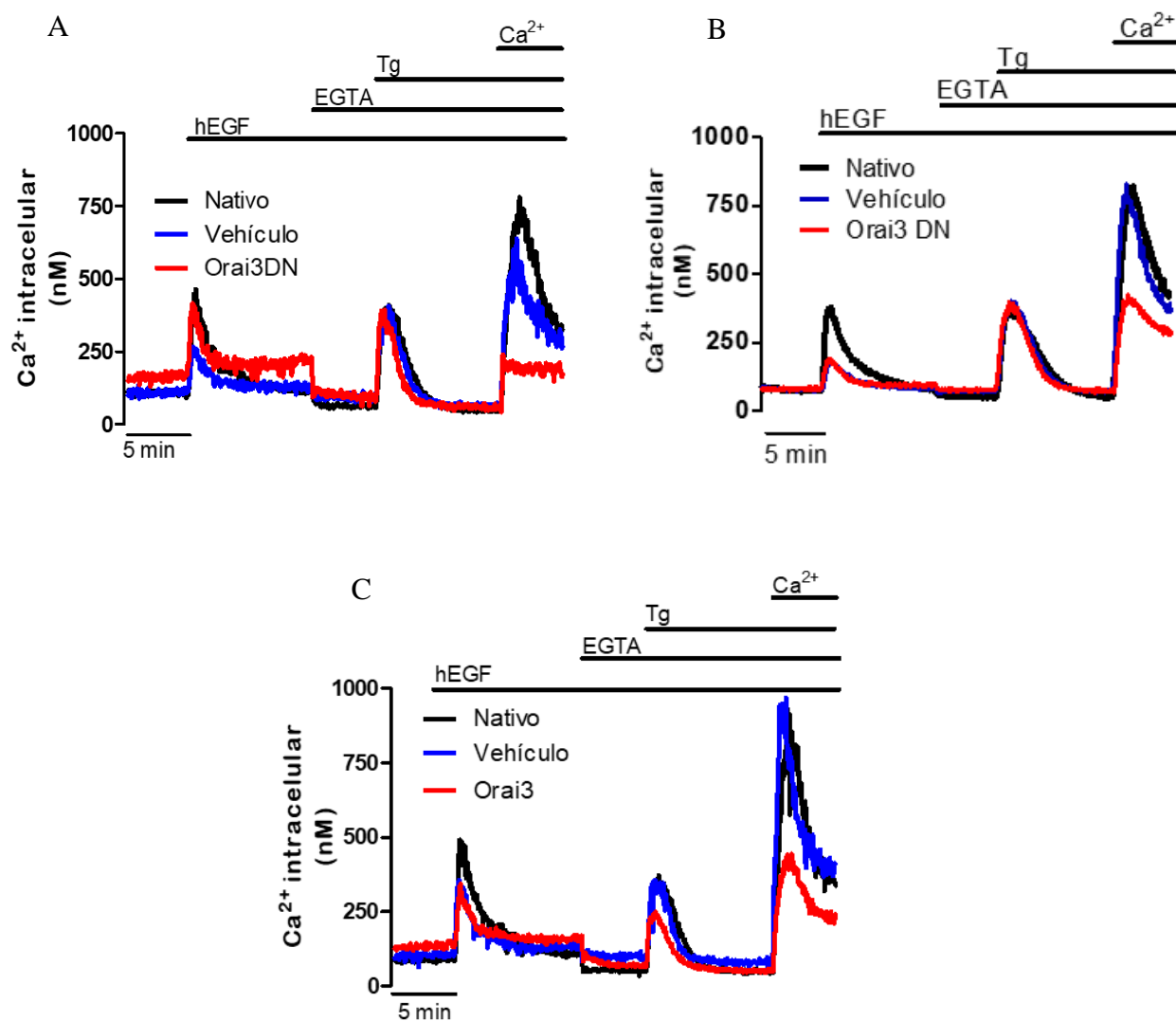


Figura 5.7. Agentes de transfección de naturaleza lipídica afectan la respuesta nativa de hEGF en células HeLa. A. Se observan trazos representativos de registros de células HeLa CCL-2 nativas (línea negra), células transfectadas con el plásmido vacío (línea azul) y células transfectadas con Orai3 DN (línea roja) empleando el agente Lipofectamina-2000 **B.** Se observan trazos representativos de registros de células HeLa CCL-2 nativas (línea negra), células transfectadas con el plásmido vacío (línea azul) y células transfectadas con Orai3 DN (línea roja) empleando el agente de transfección FuGENE. **C.** Se observa la gráfica representativa de registros de células HeLa CCL-2 nativas (línea negra), células transfectadas con el plásmido vacío (línea azul) y células transfectadas con el plásmido que codifica para el canal Orai3 (línea roja) empleando el agente Lipofectamina-2000 n=1.

En estos experimentos se empleó Orai3 DN (E81A) que es una mutante con actividad nula de canal y al mismo tiempo un fuerte inhibidor de SOCE. Esto último nos permite utilizar la inhibición de SOCE como un indicador de la eficiencia de transfección. Cuando el vehículo de transfección fue de naturaleza lipídica, la exposición a hEGF fue en presencia de Ca^{2+} externo. En todos los casos se empleó 80 ng/mL de hEGF, se aplicó 1 μM de Tg y 2 mM de Ca^{2+} para evaluar SOCE. Se observó que los agentes de transfección inhibieron la respuesta a hEGF en comparación con las células no transfectadas (nativo), aun así, no parece haber un efecto de la sobreexpresión de Orai3 o Orai3 DN respecto al plásmido vacío (Figura 5.7).

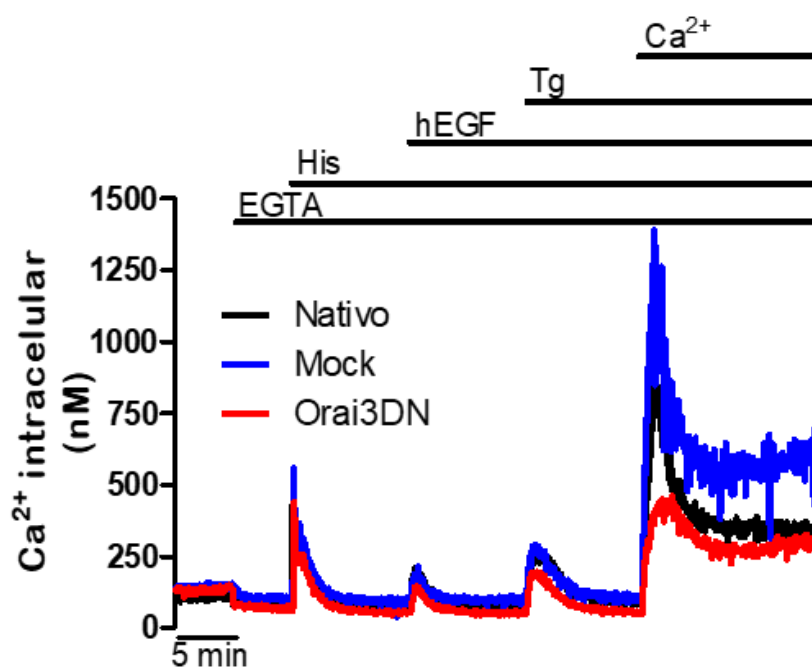


Figura 5.8. La transfección de células HeLa CCL-2 con el polímero catiónico polietilenimina permite observar repuestas de Ca^{2+} de hEGF iguales en células nativas y células transfectadas. Se observan los trazos representativos de registros de células HeLa CCL-2 nativas (línea negra), células transfectadas con el vehículo vacío (línea azul) y células transfectadas con Orai3 DN (línea roja) empleando el agente PEI. n=1.

Fue necesario estandarizar las condiciones de transfección con el agente PEI (polietilenimina no lipídica). Logramos estandarizar un protocolo que permitió observar respuestas iguales a las nativas. En estos experimentos ya no hay inhibición de la respuesta con el plásmido vacío en comparación con la nativa y sin embargo a pesar de que sí tenemos evidencia de transfección de O3DN, no se inhibió de forma significativa la respuesta a hEGF. Estos

experimentos junto con los anteriores sugieren que el canal Orai3 no tiene una participación importante en la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por hEGF (Figura 5.8.).

5.7 Efecto de la cafeína en la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por los agonistas histamina y hEGF

Aunque la ausencia de efecto del inhibidor de PLC U73122 sugiere que la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por hEGF no requiere un incremento de IP_3 , aún queda por evaluar la participación del RIP_3 en esta respuesta. Como mostramos en nuestros antecedentes, Kang y colaboradores sugieren que el fármaco cafeína es un inhibidor del receptor de IP_3 tipo 3. En nuestros experimentos empleamos el mismo protocolo utilizado hasta el momento, pero esta vez las células fueron registradas en una solución SS que contenía 20 mM de cafeína (Figura 5.9A).

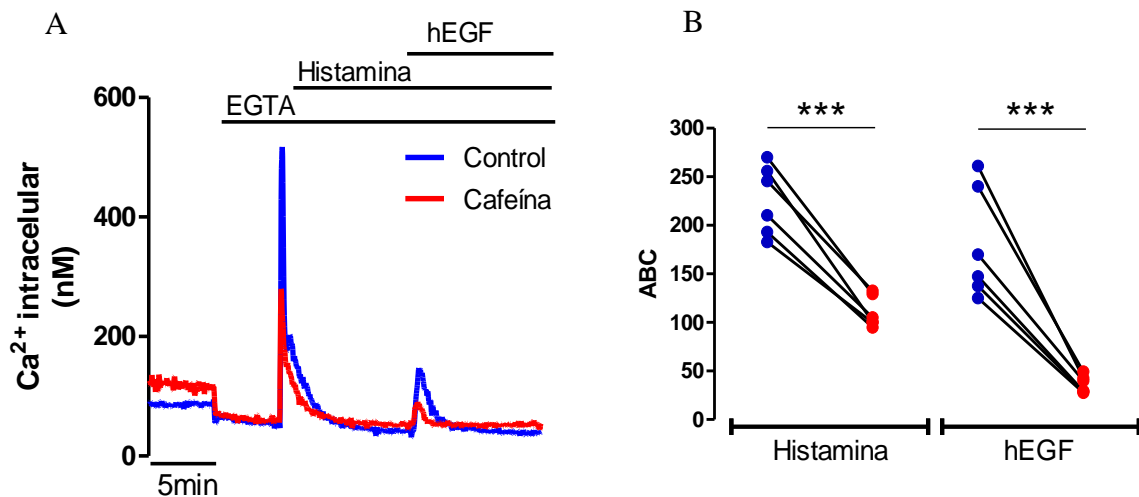


Figura 5.9. Efecto de cafeína en la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por hEGF e Histamina. A. Trazos representativos de registros de células en SS (línea azul) o SS conteniendo 20 mM de cafeína (línea roja). B. Estadística de las ABC de las respuestas de Ca^{2+} de histamina y hEGF en solución control (azul) y en presencia de 20 mM de cafeína (rojo), $n=6$, $***p<0.001$.

Pudimos observar mediante una prueba-t de Student no pareada que la cafeína reduce de forma significativa las respuestas de histamina (136.33 ± 3.67 nM·min) respecto al control (226.30 ± 14.60 nM·min). También las respuestas de hEGF disminuyeron de 180.20 ± 23.20 nM·min a 39.90 ± 6.461 nM·min como se muestra en la figura 5.9B. Debido a la diferencia en los efectos que observamos de U73122 en la respuesta de Ca^{2+} citosólico de histamina y hEGF nos preguntamos si los efectos de cafeína eran similares para ambos agonistas.

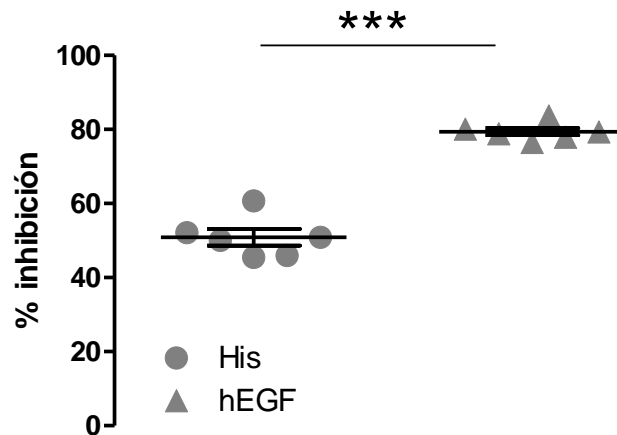


Figura 5.10. Inhibición de las respuestas de Ca^{2+} citosólico de los agonistas histamina y hEGF. Gráfica representativa del porcentaje de inhibición de las respuestas de Ca^{2+} citosólico de Histamina (círculos) y hEGF (triángulos) en células registradas en solución con 20 mM de cafeína respecto a células que fueron registradas en SS normal como control, $n=6$, $***p<0.001$.

Realizamos un análisis del porcentaje de inhibición de ambas respuestas, notando que la cafeína inhibió la respuesta a histamina en $50.85 \pm 2.25\%$ ($n=6$), mientras que la respuesta de hEGF presentó una mayor inhibición ($79.42 \pm 1.0\%$) como se observa en la Figura 5.10.

Por otra parte, pudimos observar que el empleo de cafeína producía efectos en la señal del Fura-2. Primeramente, realizamos la estadística del basal y del EGTA para las células control y aquellas registradas en solución con cafeína. En el software PTI se obtuvieron los promedios basales y del EGTA durante los 5 min de cada una de estas mediciones. Fue posible observar diferencias estadísticamente significativas para los basales entre células control (88.76 ± 7.20 nM) y registradas en cafeína (116.00 ± 4.40 nM). También pudimos observar diferencias en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observada en presencia de EGTA en células control (59.32 ± 5.70 nM) y registradas en cafeína (76.86 ± 6.30 nM) como se muestran en la Figura 5.11A.

Notamos que los parámetros de la ecuación de Grynkiewicz: R_{max} , R_{min} y β también se ven modificados por la presencia de cafeína. Se realizó la estadística de la variación del parámetro $R_{\text{máx}}$ entre las células control (12.03 ± 0.67) y las células registradas en solución con cafeína (7.54 ± 0.48), y pudimos apreciar diferencias significativas, al igual que en R_{min} entre el

control (0.350 ± 0.003) y la condición evaluada (0.310 ± 0.007), véase figura 5.11B. Esto permite decir que sí existe un efecto de cafeína en las señales de fluorescencia del Fura-2 en nuestras condiciones de registro. Estos datos sugieren que la cafeína reduce la fluorescencia de 340, por lo que decidimos verificar si el parámetro β también estaba disminuido (Figura 5.11C). Ya que el parámetro β también se redujo podemos decir que cafeína modifica la sensibilidad a Ca^{2+} del Fura-2, pero esto no lo podemos corregir por lo que se usó la misma K_d de 200 nM.

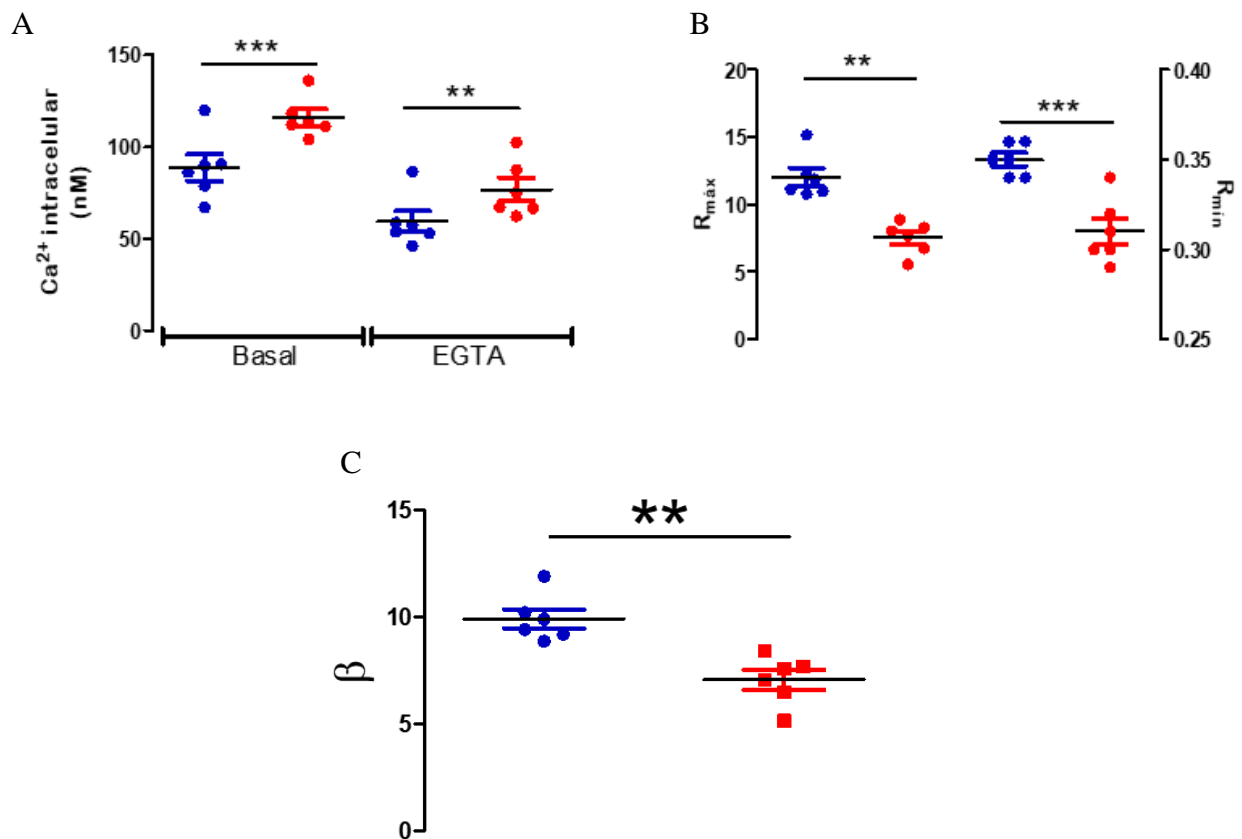


Figura 5.11. Efectos de cafeína en los parámetros de la ecuación de Grynkiwicz: R_{max} , R_{min} y β . **A.** Gráfica representativa del promedio basal de Ca^{2+} citosólico y del estado estacionario alcanzado con EGTA en células control (azul) y células registradas en solución de cafeína 20 mM (rojo). **B.** Gráfica representativa de los parámetros R_{max} (eje y izquierdo) y R_{min} (eje y derecho) en células control (azul) y células registradas en solución de cafeína 20 mM (rojo) **C.** Gráfica representativa del parámetro β en células control (azul) y células registradas en solución de cafeína 20 mM (rojo). $n=6$, $p^* < 0.05$, $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$.

5.8 Participación del RyR en la respuesta de Ca^{2+} citosólico provocada por la estimulación con hEGF

Con el objetivo de evaluar la participación del RyR en la respuesta de hEGF diseñamos un control, en el que el primer grupo de células se incubaron durante 10 min previos al registro en SS con cafeína 20 mM y el segundo grupo de células se incubaron en SS con cafeína 20 mM y rianodina (50 μM) y en ambos casos las células se lavaron antes de someterse al registro de fluorescencia en SS (Figura 5.12A). La rianodina ($\text{IC}_{50} = 10 \text{ nM}$, para el RyR1 de músculo esquelético) actúa uniéndose al estado abierto de los receptores de rianodina. Este alcaloide se une a la región del poro cuando se abre e impide su cierre, a concentraciones submicromolares deja al canal en un estado subconductante continuo, mientras que, en concentraciones más altas, la rianodina bloquea el paso de iones, aunque el canal esté en estado abierto (Ujváry, 2010).

Este protocolo nos permitiría ver que, si el RyR está presente de forma funcional y participa en la respuesta de hEGF, entonces la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ debería verse inhibida completamente (Gómez-Viquez *et al.*, 2005). Nuestros resultados fueron consistentes con las conclusiones de Hur y colaboradores en 2005, los cuales mostramos en nuestros antecedentes, y que no presentan efectos de la rianodina en la respuesta de hEGF en células PC12. En nuestro caso, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las dos condiciones evaluadas, por lo que pensamos que puede que no exista participación del RyR en este mecanismo o pudiese que no exista en células HeLa un RyR con las mismas propiedades farmacológicas que las presentes en células excitables, también teniendo en cuenta que se ha reportado la existencia de receptores de rianodina truncados en diferentes tipos celulares (Figura 5.12B).

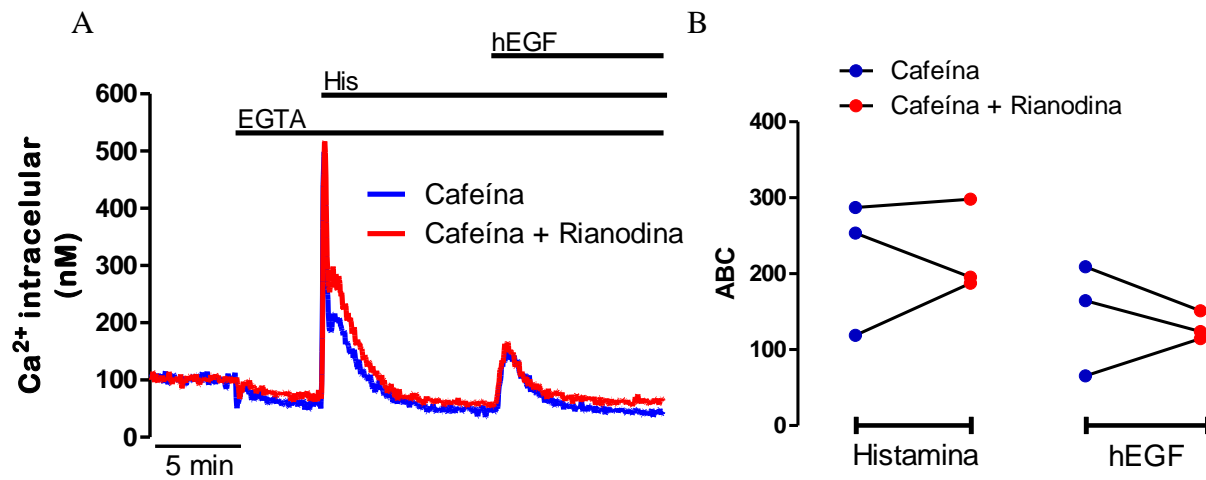


Figura 5.12. El RyR no parece estar involucrado en la respuesta de hEGF en células HeLa. A. Trazos representativos de registros de células preincubadas durante 10 minutos en SS con 20 mM de cafeína (línea azul) o células pre-incubadas en SS con 20 mM de cafeína y 50 μ M de rianodina (línea roja). **B.** Estadística de las ABC de las respuestas de Ca²⁺ de hEGF en condiciones control, donde las células se preincubaron con cafeína y sin rianodina y en presencia de 50 μ M de rianodina (rojo), n=3.

6. DISCUSIÓN

El EGF produce incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ en diferentes tipos de células (Fu *et al.*, 1994; Bryant *et al.*, 2004; Uyemura *et al.*, 2005); sin embargo, esta respuesta no es tan robusta como la de otros agonistas productores de IP_3 . El argumento para dicha afirmación es que la respuesta inducida por este factor de crecimiento se inhibe de forma inespecífica con facilidad. En nuestro laboratorio intentamos observar respuestas poblacionales de hEGF en células HEK293T sin éxito o resultaron muy pequeñas. Otro grupo de investigación, empleando el indicador B-GECO1 en células HeLa individuales observaron dos poblaciones: un grupo que presenta respuestas de Ca^{2+} y otra población que no genera estas señales; sin embargo, cuando los autores utilizan diferentes biosensores que miden la actividad de diferentes cinasas como Lyn y ERK se logra observar señalización, la cual existe independientemente de la respuesta de Ca^{2+} generada (Mehta *et al.*, 2018). Esto apoya el hecho de que EGF no produce respuestas de Ca^{2+} robustas ya que no todas las células llegan al umbral que dispara la onda de $[Ca^{2+}]_i$ global.

Además, en nuestro laboratorio observamos que la transfección de células HeLa con agentes como FUGENE o Lipofectamina-2000 disminuían la respuesta de hEGF respecto a aquellas no transfectadas (incluso transfectando un vector vacío), probablemente por la acción de estos agentes de naturaleza lipídica en la membrana plasmática, donde se encuentra el EGFR. Estos datos apoyan la idea de que es una señal muy frágil. Queda pendiente la interrogante: ¿Por qué los laboratorios que evalúan señalización no observan estas afectaciones al transfectar? Aunque sí se conoce que para observar un efecto de hEGF en el aumento del $[Ca^{2+}]_i$ se requieren concentraciones mucho mayores que para determinar efectos en la señalización; por ejemplo, otros investigadores han observado activación de $PKC\gamma$ al estimular células HeLa con 10 ng/mL de EGF sin que existan efectos en la $[Ca^{2+}]_i$ (Sawano *et al.*, 2002), lo cual resulta interesante pues la $PKC\gamma$ es de las clásicas que necesitan Ca^{2+} y DAG para activarse. En nuestros experimentos empleamos altas concentraciones de hEGF (80 ng/mL), teniendo en cuenta que otros autores mediante BRET (Transferencia de Energía por Resonancia de Bioluminiscencia) han determinado que utilizando estas concentraciones

del factor de crecimiento la asociación del EGFR a proteínas de andamiaje y su señalización se encuentran saturadas (Schiffer *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta las características descritas anteriormente, nos preguntamos si era posible visualizar una respuesta mayor provocada por la estimulación con hEGF en células HeLa y para ello evaluamos las condiciones de bajo y alto amortiguamiento con Fura-2/AM (250 nM y 2 μ M, respectivamente), datos que se muestran en la Figura 5.1. Es difícil determinar la concentración intracelular de Ca^{2+} exacta y si se mantiene la relación de ocho veces más concentración de Fura-2 en el caso de alto amortiguamiento, aunque si tenemos en cuenta una relación lineal entre fluorescencia y cuentas/segundos, de acuerdo a los datos que mostramos en los anexos para ambas condiciones, solo hay una cantidad 3 veces mayor de Fura-2 intracelular en la condición de alto amortiguamiento. Sin embargo, podemos decir que hay una mayor concentración intracelular de Fura-2 en aquellas células incubadas con 2 μ M del indicador, teniendo en cuenta que en los registros en bruto se aprecia que las cuentas/segundos de la longitud de onda de 360 nm son mayores. Es importante tener en cuenta que los indicadores de Ca^{2+} como este tetracarboxilato, debido a la cantidad que se necesita dentro de la célula para tener una señal adecuada, se convierten en amortiguadores exógenos que compiten con los endógenos, mientras que los procesos lentos como es el secuestro de Ca^{2+} por el RE rivalizan con la difusión del Ca^{2+} y los indicadores (Pérez, 2016). Efectivamente, pudimos observar una mayor amplitud máxima de la respuesta de hEGF con baja cantidad de Fura-2/AM, la masa total de Ca^{2+} , que corresponde al ABC, obtenida con dichas concentraciones de Fura-2 no presentó diferencias. El hecho de que observamos la misma ABC y diferente amplitud de Ca^{2+} significa que con las dos condiciones de amortiguamiento observamos la misma masa neta de Ca^{2+} , pero probablemente la cinética de liberación o remoción, o ambas, sea diferente entre ambas condiciones. Finalmente, decidimos trabajar con 1 μ M de Fura-2/AM para el resto de los experimentos, ya que observamos la misma ABC ante la estimulación con hEGF y menos variabilidad empleando alto amortiguamiento con Fura-2.

Un aspecto importante en la caracterización de la respuesta de hEGF fue observar la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en ausencia de Ca^{2+} externo lo que sugiere que hEGF libera Ca^{2+} de un depósito

intracelular. Para conocer la naturaleza de dicho depósito evaluamos el efecto de Tg, inhibidor de la bomba SERCA, en combinación con histamina, un agonista productor de IP₃. Los receptores de histamina que se conocen (H1, H2, H3 y H4) son todos miembros de la familia GPCR y transducen señales extracelulares a través de las proteínas G: Gq, Gs y Gi/o. En nuestro laboratorio se ha trabajado previamente empleando la histamina para estimular células de músculo liso de la vejiga del cobayo (Rueda *et al.*, 2002). También, las células HeLa expresan el receptor H1, la histamina provoca la salida de Ca²⁺ del RE debido a la activación de la PLCβ, que incrementa los niveles de IP₃ y esto a su vez activa al RIP₃ (Aguilar-Maldonado *et al.*, 2003).

La aplicación de 80 ng/ml de hEGF no mostró ningún efecto inhibitorio en la posterior respuesta de [Ca²⁺]_i inducida por histamina y Tg, mientras que si se añadió primero histamina y Tg se inhibió completamente el aumento de [Ca²⁺]_i debido al hEGF en células HeLa (Figura 5.2). En nuestro laboratorio empleamos también la combinación ATP (10 μM) con Tg (1 μM) y en estas condiciones también observamos la completa inhibición de la respuesta de hEGF posterior a la aplicación en agudo de estas sustancias. El vaciamiento del RE con una estrategia diferente, como es el uso de 200 μM de 2-APB, un fármaco que provoca la fuga de Ca²⁺ debido a la activación del canal Orai3, resultó en la completa inhibición de la respuesta de [Ca²⁺]_i inducida por hEGF. Podemos concluir que en nuestras condiciones de registro el hEGF libera Ca²⁺ del RE y no pudimos detectar la participación del Ca²⁺ extracelular. Esto concuerda con lo observado en células de hepatoma humano BEL-7404 (Fu *et al.*, 1994) también se ha propuesto que el RE es la principal fuente de liberación de Ca²⁺ por hEGF.

En estos experimentos pareciera que el depósito sensible a la combinación de histamina y Tg tiene un mayor tamaño que el depósito de hEGF, o una segunda hipótesis sería que el RE no es homogéneo y se accede al Ca²⁺ almacenado de forma diferente. En un experimento similar, donde otros autores emplearon un protocolo en el que añadieron ATP, un agonista productor de IP₃ que actúa sobre receptores purinérgicos, y Tg (en este orden o viceversa) pudieron comprobar que el vaciamiento del depósito con Tg inhibía la respuesta de ATP sin que la estimulación previa con ATP afectara la respuesta obtenida con Tg. Esto resulta similar a lo

que observamos en nuestros experimentos. El otro elemento importante, es que un primer pulso con ATP inhibe la respuesta de una segunda estimulación con este agonista (Sabala *et al.*, 1997). En este sentido coincidimos con que una posibilidad es que en presencia de hEGF, el RE agotado por la estimulación con el agonista, puede ser rellenado de nuevo por la acción de la bomba SERCA, mientras que la adición de Tg bloquea esta enzima y vaciará completamente las reservas de Ca^{2+} . La otra hipótesis defiende que existen diferentes regiones en el RE, uno sensible y otro insensible a IP_3 , los cuales pueden agotarse por la acción del inhibidor de SERCA, lo cual implicaría una heterogeneidad de este compartimento intracelular. En nuestro laboratorio mediante experimentos de microscopía confocal se han reportado zonas de alto y bajo Ca^{2+} , a pesar de que no hay barreras de difusión, lo que apoya la idea de que el RE tiene determinada heterogeneidad (Sánchez-Vázquez *et al.*, 2023).

Decidimos realizar experimentos en los que pudiéramos evaluar el efecto de un agonista productor de IP_3 en la respuesta de hEGF, ya que deseábamos estudiar si dichas respuestas podrían afectarse mutuamente o no (Figura 5.3). El empleo de histamina para estos experimentos se debe a que es una respuesta ampliamente caracterizada en el modelo de células HeLa desde el siglo pasado (Bootman *et al.*, 1992; Sauvi *et al.*, 1991). Además, este agonista ha sido frecuentemente utilizado en nuestro laboratorio y además resulta interesante que, en contraste con hEGF, produce IP_3 vía $\text{PLC}\beta$. Lo que reportamos en este trabajo es que la respuesta de histamina disminuye el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que produce hEGF sin que suceda a la inversa, ya que la estimulación previa con hEGF no disminuye la respuesta de Ca^{2+} de histamina. De estos experimentos podemos concluir que estos agonistas comparten el depósito de Ca^{2+} . Nuestros datos sugieren que la histamina mantiene reducido el Ca^{2+} luminal en ausencia de Ca^{2+} externo, lo cual hemos corroborado con indicadores de Ca^{2+} dirigidos al RE y esto puede explicar que la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por hEGF sea afectada en presencia de histamina. Por otro lado, como hEGF no afecta la respuesta de histamina, sugiere que el RE se recupera su nivel original de Ca^{2+} probablemente debido al cierre del RIP_3 activado por hEGF, esto no lo podíamos verificar debido a que los agentes de transfección afectaban la respuesta de hEGF, pero ahora con PEI se puede verificar que hEGF no vacía el RE aún en ausencia de Ca^{2+} externo, utilizando indicadores codificados genéticamente dirigidos al RE. No se probaron dos pulsos consecutivos de hEGF debido a

que la internalización del receptor puede ser un elemento que impida la respuesta de Ca^{2+} ante el segundo pulso.

La respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por hEGF se caracteriza por ser transitoria y bifásica. Para determinar los parámetros cinéticos realizamos el ajuste a una ecuación biexponencial como describimos previamente en Materiales y Métodos (Figura 5.4). El hecho de que no existen diferencias estadísticamente significativas en los tiempos medios de liberación y remoción cuando hEGF es el primer o segundo estímulo implica que la histamina no modifica la forma como hEGF libera Ca^{2+} del RE. Lo que sí afectó la histamina fue el tamaño del RE al cual tiene acceso el hEGF; la diferencia en el parámetro A_0 cuando hEGF es el primer o segundo estímulo es indicativa de que la reducción que apreciamos se debe a que se accede a menos Ca^{2+} . Esto concuerda con la idea de que histamina no permite la recuperación del RE en ausencia de Ca^{2+} externo, debido a que vemos la afectación de la respuesta de hEGF como segundo estímulo.

Parte fundamental de la caracterización de la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por hEGF es determinar la contribución de la $\text{PLC}\gamma$ en este mecanismo. El mecanismo de inhibición de PLC por U73122 implica la alquilación de residuos de Cys (Klein *et al.*, 2011) y por eso U73343 no funciona como inhibidor pues no tiene el doble enlace involucrado en la alquilación de los residuos de cisteína. U73122 inhibió varios procesos dependientes de PLC con valores de IC_{50} entre 0.1 y 10 μM , y la inhibición de la respuesta de 100 μM de histamina por una concentración de 10 μM del inhibidor de PLC U73122 ya ha sido previamente reportada en neuronas (Nicolson *et al.*, 2002). También ha sido reportado en diferentes trabajos el efecto inhibitorio de U73122 en la $\text{PLC}\gamma$ al afectar procesos estimulados por hEGF, como sería la migración celular en células MSIE (Polk, 1998) y la movilización a la periferia de la proteína β -quimerina por un proceso dependiente de DAG en células HeLa (Wang *et al.*, 2006).

Los efectos de este inhibidor en $\text{PLC}\gamma$ también han sido descritos como mostré previamente en los antecedentes, y también por otros autores que demuestran la inhibición de las oscilaciones de Ca^{2+} provocadas por el EGF en células individuales (Kim *et al.*, 2020).

Nuestra expectativa era ver un efecto inhibitorio de U73122 en las respuestas tanto de histamina como de hEGF; sin embargo, lo que observamos nos resultó bastante sorprendente. Si bien estábamos buscando la participación de un nuevo mecanismo de liberación de Ca^{2+} por hEGF, nunca esperamos que no hubiese diferencias significativas entre las células control y en aquellas con U73122 en lo referente al incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por hEGF (Figura 5.5 y Figura 5.6).

El motivo por el que no logramos observar la inhibición de la respuesta de Ca^{2+} de hEGF en nuestras condiciones resulta difícil de explicar, ya que incluso en el experimento que mostramos en nuestros antecedentes, se ven sus efectos inhibitorios en la respuesta de Ca^{2+} de EGF en otro tipo celular. También se ha mostrado su efecto en modelos de células de glioma tanto *in vitro* como *in vivo*. En este caso se empleó con fines terapéuticos U73122 (5 μM), la misma concentración que utilizamos en nuestros experimentos, observándose efectos supresores en el tumor y promotores de la apoptosis (Li *et al.*, 2022). La estimulación con EGF, aunque efectivamente recluta a la $\text{PLC}\gamma_1$ al complejo con el EGFR, no es necesaria su actividad catalítica, pero sí su presencia, para observar los efectos de EGF en proliferación (Xie *et al.*, 2010). Además, aunque se recluta $\text{PLC}\gamma_1$ al receptor de EGF, se ha demostrado que no se hidroliza PIP_2 , al menos no lo suficiente para tener una señal de reducción de PIP_2 como sí sucede con histamina o con otros agonistas de GPCRs (Matsuda *et al.*, 2001). Aunque, ya existen trabajos como el realizado por el grupo de Hille en 2013, en el que se demuestra empleando indicadores de hidrólisis de PIP_2 mediante FRET que aunque no se detecte la hidrólisis de PIP_2 , el agonista sí induce una respuesta de Ca^{2+} aunque dicha respuesta está muy retardada pues ese tiempo es necesario para llegar al umbral de IP_3 que dispara un proceso de CICR y la onda de Ca^{2+} global. Además, hay que considerar la presencia de mecanismos de sensibilización del RIP_3 (Dickson *et al.*, 2013) que pueden estar participando en la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por hEGF ya que ésta no presenta un retardo importante a pesar de producir poco IP_3 .

Aunque nuestros resultados son diferentes a lo reportado por otros autores, son reproducibles y robustos, ya que tenemos como control la respuesta de histamina, la cual es totalmente inhibida empleando la concentración señalada del inhibidor. Tampoco encontramos en la

literatura ningún reporte en el que se indique una mayor selectividad del inhibidor para PLC β comparando con PLC γ . Adicionalmente, la IC₅₀ que se conoce para diferentes experimentos empleando U73122, así como los experimentos realizados por otros autores, nos permiten concluir que estamos utilizando una concentración adecuada del inhibidor. De cualquier modo, el efecto diferencial del inhibidor de PLC en las respuestas de histamina y hEGF queda muy claro en nuestros experimentos. Respecto a los efectos inespecíficos del inhibidor, a pesar de que se han reportado otros efectos (Leitner *et al.*, 2016; Neacsu *et al.*, 2020), el hecho de la aplicación aguda disminuye el tiempo de exposición a U73122 y por tanto estas consecuencias no deseadas, pero el control en la respuesta de histamina sigue contrastando con la de hEGF.

Exploramos la posibilidad de que el canal Orai3 fuera parte del mecanismo de liberación de Ca²⁺ inducido por el hEGF. Inicialmente, fue difícil encontrar las condiciones en las que la respuesta de hEGF no se viese afectada por el plásmido vacío. Al transfectar las células con agentes de naturaleza lipídica como Lipofectamina-2000 y FuGENE, no permitieron visualizar una respuesta de hEGF fiel a la nativa, incluso con el plásmido vacío (Figura 5.7). En todos los casos, el control de la transfección fue el empleo de Orai3 DN, que presenta la mutación E81A, e inhibe la entrada de Ca²⁺ por SOCE (Motiani *et al.*, 2013); de esta forma se comprobó que las células sí estaban transfectadas. Aun así, no observamos diferencias en los experimentos realizados en aquellas células transfectadas con el vehículo o Orai3DN. Además, la sobreexpresión de Orai3 tampoco parece tener los efectos que esperábamos en la respuesta de hEGF de participar este canal en el incremento de Ca²⁺ que provoca el factor de crecimiento. En conclusión, no tenemos ninguna evidencia de la participación del canal Orai3 en la liberación de Ca²⁺ inducida por hEGF.

Debido a los problemas que enfrentamos con agentes de naturaleza lipídica decidimos emplear el polímero catiónico PEI para nuestras transfecciones en células HeLa en las que queríamos evaluar la respuesta de hEGF. PEI es un polímero catiónico que en 1995 se convirtió en un agente de transfección no viral utilizado para transfectar ácidos nucleicos a las células. Debido a la capacidad de transfección de los poliplexos del PEI también se ha investigado en vacunas de ADN en la prevención de varias infecciones y cánceres, esto por

su baja citotoxicidad y su capacidad para aumentar la eficiencia de la transfección (Sabin *et al.*, 2022). Este agente resultó ser una opción atractiva para remediar la pérdida de la respuesta de hEGF y en efecto se logró estandarizar con un protocolo de transfección que nos permitió ver una respuesta del plásmido vacío igual a la de células no transfectadas con eficiencia en la transfección (Figura 5.8). En estos experimentos no parecía haber diferencias entre células con el vehículo y con Orai3 DN. Entonces, no hay evidencias que respalden la posible participación de Orai3 en el mecanismo de liberación de Ca^{2+} de hEGF, y creemos, de acuerdo a nuestros resultados, que resulta más atractiva la posible sensibilización del RIP_3 .

A pesar de nuestros resultados empleando U73122, estos experimentos no descartan la participación del RIP_3 en el mecanismo de liberación de Ca^{2+} de hEGF. Desde la década del 90 del siglo pasado se ha descrito que la cafeína inhibe la liberación de Ca^{2+} mediada por el RIP_3 en diferentes modelos celulares como ovocitos de xenopus (Parker y Ivorra, 1991), hepatocitos (Missiaen *et al.*, 1992) y también en microsomas de cerebelo (Brown *et al.*, 1992). Estos efectos han podido demostrarse empleando diferentes técnicas como patch clamp, que permite realizar mediciones de corrientes de Ca^{2+} , o bien empleando indicadores de Ca^{2+} en presencia de este fármaco. Por otra parte, como se mostró en los antecedentes de este trabajo, el estudio de Kang y colaboradores demuestra la inhibición de la respuesta de EGF, un factor asociado al crecimiento y proliferación, por cafeína, en el que propone un mecanismo de inhibición de cafeína específico para el RIP_3 tipo 3 en células de glioma. Se ha demostrado que la isoforma 3 del RIP_3 funciona como una unidad anti-oscilatoria de Ca^{2+} en las células DT-40 (Tomoya *et al.*, 1999) y en las células HeLa y COS-7 (Hattori *et al.*, 2004). Podría ser que debido a que la estructura del RIP_3 tipo 3 tiene un lazo cargado con aminoácidos negativos en el sitio de unión de IP_3 esté relacionado a la menor afinidad por este mensajero de la isoforma 3 y también con la disminución de las oscilaciones (Azumaya *et al.*, 2020).

Como se ha mencionado previamente en este trabajo, la isoforma 3 del RIP_3 tiene propiedades diferentes a los RIP_3 tipo 1 y tipo 2. Además de sus diferencias en afinidad por IP_3 y en su capacidad para sostener oscilaciones, se ha determinado que el RIP_3 -1 y el RIP_3 -2 presentan efectos pro-apoptóticos (Lencesova *et al.*, 2013), mientras, para el RIP_3 -3 se han

documentado efectos contrarios. El RIP₃-3 se ha correlacionado con la agresividad del carcinoma colorrectal (Shibao *et al.*, 2010), mayor capacidad de migración celular (Mound *et al.*, 2017), e invasión y supervivencia de células de glioblastoma (Kang *et al.*, 2010). Los efectos antiapoptóticos y proliferativos de esta isoforma han sido bien descritos anteriormente por el grupo de Krizanova y colaboradores en el 2019 en líneas de células de adenocarcinoma de colon humano (Rezuchova *et al.*, 2019). No sería raro que la isoforma 3 del RIP₃ de alguna forma estuviera regulado y tuviera una participación diferencial en la respuesta de un factor de crecimiento altamente asociado a patologías de cáncer como es el EGF. Sin embargo, los mecanismos de regulación diferenciales que se han descrito hasta el momento para el RIP₃-3 y que tienen un papel en sus propiedades antiapoptóticas, no explican los resultados obtenidos en este proyecto. El trabajo de Pinton y colaboradores demuestra que Akt ejerce preferentemente su papel antiapoptótico a través de la inhibición de la liberación de Ca²⁺ por el RIP₃-3 en células COS7. Sin embargo, los cambios en esta liberación no suelen ser tan bruscos, aunque estos autores demuestran que en células SH-SY 5Y, otro modelo celular deficiente de esta isoforma del receptor existe insensibilidad a la actividad típica de supervivencia mediada por Akt (Marchi *et al.*, 2012). Resulta interesante encontrar un mecanismo diferencial de regulación del RIP₃-3 respecto a las otras isoformas del receptor, y sugiere que es posible que existan otras formas diferenciales de regulación. Aunque, en el caso de nuestros resultados, solo se explicarían por un mecanismo de sensibilización del RIP₃-3, que incrementara la liberación de Ca²⁺ no dependiente de IP₃ ante la estimulación con hEGF, a diferencia de la actividad de Akt sobre esta isoforma.

Existen diferentes ejemplos de la regulación de la liberación de Ca²⁺ mediada por el RIP₃ mediante fosforilación y desfosforilación por cinasas y fosfatasas. Se ha reportado que el RIP₃-1 puede ser regulado por cinasas como PKC, Akt, Rho, ERK1/2 y algunas cinasas de tirosinas como son Src y Fyn; además, su actividad puede estar regulada por otras proteínas como Bcl-2 (Vanderheyden *et al.*, 2009). También se ha demostrado mediante co-inmunoprecipitación que la PKA y las fosfatasas PP1 y PP2 se asocian al RIP₃-1, formando un multicomplejo (Desouza *et al.*, 2002). PKA puede fosforilar dos sitios distintos en RIP₃-1 (S¹⁵⁸⁸ y S¹⁷⁵⁵), ambos ubicados en la región reguladora del receptor y se ha demostrado de manera concluyente que la fosforilación mediada por PKA conduce a un aumento directo en

la sensibilidad de RIP₃-1 por IP₃ sin modificar su sensibilidad a Ca²⁺ (Vanderheyden *et al.*, 2009). Por el contrario, respecto a la fosforilación de RIP₃-2 y RIP₃-3 los resultados han sido contradictorios; por ejemplo, para el RIP₃-3, se ha sugerido que la PKA tiene efectos estimulantes o inhibidores. Sin embargo, se han identificado tres sitios fosforilados por PKA en los residuos de Ser-916, Ser-934 y Ser-1832, que son asas peptídicas expuestas en la superficie del receptor (Soulsby y Wojcikiewicz, 2005).

Existen estudios que respaldan el papel regulador de PKA en la liberación de Ca²⁺ mediante el RIP₃ ante la estimulación con EGF en un modelo de células de insulinoma de rata RINm5F. En células RINm5F intactas incubadas en medio libre de Ca²⁺ externo, se demostró que la PKA mejora el transitorio de Ca²⁺ inducida por carbacol y por EGF, dos agonistas que regulan la formación de IP₃ a través de diferentes vías. Además, empleando un knockdown del RIP₃-1, indicaron que el efecto de la PKA se debía a la fosforilación del RIP₃ (Chaloux *et al.*, 2007). La cuestión es que este mecanismo de sensibilización del RIP₃ requiere de un tratamiento previo que provoque la estimulación de PKA. Otros mecanismos de sensibilización del receptor han sido propuestos; por ejemplo, el grupo de Kim y colaboradores en el 2005 observaron que en células PC-12 el EGF no provocaba incrementos en la [Ca²⁺]_i, y proponen un mecanismo en el que la estimulación con bradicinina (BK), provoca la fosforilación del receptor de RIP₃-1 por PKA y posteriormente al aplicar EGF, se puede observar una liberación de Ca²⁺ (Hur *et al.*, 2005). Aunque estos mecanismos de sensibilización proveen una posible perspectiva para este trabajo, que sería que PKA esté involucrado en la sensibilización del RIP₃-3. Esto tendría que demostrarse, aunque sí existen evidencias de que EGF puede activar a la PKA (usando indicadores fluorescentes de la actividad de PKA), no está claro que esto anteceda a la liberación de Ca²⁺ o que sea independiente de la misma.

Durante este trabajo, pudimos observar que cafeína alteraba la basal de aquellas células que se registraron en la solución que contenía 20 mM de este fármaco (Figura 5.11A). Anteriormente, el grupo de trabajo de Salzberg en 1999 proporcionó varias líneas de evidencia que indicaban que la cafeína interactúa con algunos indicadores en un sitio distinto del sitio de quelación de Ca²⁺. Este grupo mostró que indicadores como Mag-Fura-2 y Fura-

2 exhiben grandes cambios en sus propiedades de fluorescencia en respuesta a las concentraciones milimolares de cafeína en un experimento *in vitro*, aunque no observan el mismo comportamiento en el indicador como lo vemos nosotros, probablemente por sus condiciones experimentales (Muschol *et al.*, 1999). Lo que observamos durante nuestros experimentos mientras realizábamos la calibración de Fura-2, coincide con lo observado anteriormente por estos autores. Pudimos determinar que los parámetros de la ecuación de Grynkiewicz: R_{max} , R_{min} y β se encontraban disminuidos en presencia de 20 mM de cafeína (Figura 5.11B, C). No obstante, los efectos de cafeína en el RIP_3 están muy bien documentados y se aprecian claramente a pesar de sus efectos en el Fura-2, de hecho, esto implicaría que probablemente incluso estamos subestimando la inhibición de las respuestas. La interrogante es si los efectos que vemos en la $[Ca^{2+}]_i$ basal se deben a una posible variación en afinidad, o sea la K_d del Fura-2, en presencia de cafeína. Esto habría que investigarlo en el futuro o utilizar otros enfoques para eliminar la participación del RIP_3 .

Finalmente, el empleo de cafeína nos obligó a realizar controles que descarten la participación de RyR, o que permitan afirmar su participación en la respuesta de Ca^{2+} de hEGF (Figura 5.12). No pudimos apreciar diferencias significativas en nuestro control empleando cafeína o cafeína/rianodina. Esperábamos que, si el RyR participaba en este mecanismo, la presencia de su estimulador cafeína/rianodina, dejase al canal en una condición subconductante y observaríamos una disminución o la inhibición de la respuesta de hEGF. Sin embargo, el hecho de que existan formas truncadas, como se mostró en los antecedentes, significa que el RyR puede no tener las características farmacológicas convencionales y pudiéramos no estar estimulándolo con cafeína. Por este motivo intentamos realizar el control con hEGF y rianodina, ya que si este factor de crecimiento estuviera estimulando a RyR sería la misma idea de que rianodina afectaría su respuesta.

Sin embargo, cuando las células se pre-incubaron con hEGF durante 10 min, y se lavaron, resultó que la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por una segunda aplicación de hEGF no se pudo observar, sugiriendo que la internalización del EGFR no se recupera con este protocolo de lavado. Esto concuerda con lo descrito previamente de que una vez unido al ligando, el EGFR se endocita rápidamente a través de mecanismos dependientes e independientes de clatrina.

Luego, los complejos de EGFR pueden reciclarse de nuevo a la membrana plasmática desde endosomas tempranos, pero también se dirigen de manera eficiente a los lisosomas para su degradación (Kuriyan *et al.*, 2017). Nuestros resultados indican que aplicando 80 ng/ml de hEGF se requiere un tiempo mayor al que empleamos en nuestro experimento, ya que pensamos que el receptor sigue internalizado y esto impide una nueva respuesta al hEGF. Además, mediante un análisis empleando microscopía confocal se ha observado que los endosomas que contienen al EGFR pueden visualizarse en 15 min luego de añadir 100 ng/mL del ligando (Matsuda *et al.*, 2001), lo que respalda lo observado en nuestro laboratorio. Regresando al tema original, la presencia y propiedades de RyR en células HeLa no está bien caracterizado y requiere de otros estudios más contundentes, pero no parece estar involucrado en el mecanismo de la respuesta de Ca^{2+} de hEGF.

Teniendo en cuenta nuestros resultados, proponemos en la Figura 6.1 un modelo que incorpora los datos de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a hEGF en células HeLa. Según nuestros datos empleando el inhibidor U73122, la respuesta de hEGF, a diferencia de histamina, parece ser independiente de PLC. Proponemos que existe alguna cinasa en la ruta de activación del EGFR que está regulando al RIP_3 , posiblemente al RIP_{3-3} , y que pudiese estar sensibilizando a este receptor. La existencia del lazo propuesto como un péptido inhibitorio en esta isoforma, nos hace sugerir que la acción de la cinasa posiblemente provoca el desplazamiento del bucle y una mayor sensibilidad del receptor. También podría analizarse la posibilidad de una interacción directa entre el dominio de cinasa de tirosina del EGFR y el RIP_3 , considerando una temporalidad más rápida que la regulación por una cinasa, esto sustentado en que incluso se han observado dominios tripartitas (MP, RE y mitocondria) ante la estimulación con 100 ng/mL de EGF en células HeLa (Mesa *et al.*, 2024). Además, el modelo toma en consideración la ausencia de evidencias que apunten a la participación de Orai3 en el mecanismo de liberación de Ca^{2+} de hEGF.

Este proyecto deja muchísimas interrogantes abiertas para futuros trabajos. Estos resultados promueven las siguientes incógnitas: ¿Es posible que el RIP_{33} sea la isoforma que tiene una mayor contribución a la respuesta de hEGF? ¿Qué cinasa u otro mecanismo está involucrado

en la sensibilización del RIP_3 ? Tampoco hemos explorado el papel del Ca^{2+} extracelular en la señalización de este receptor.

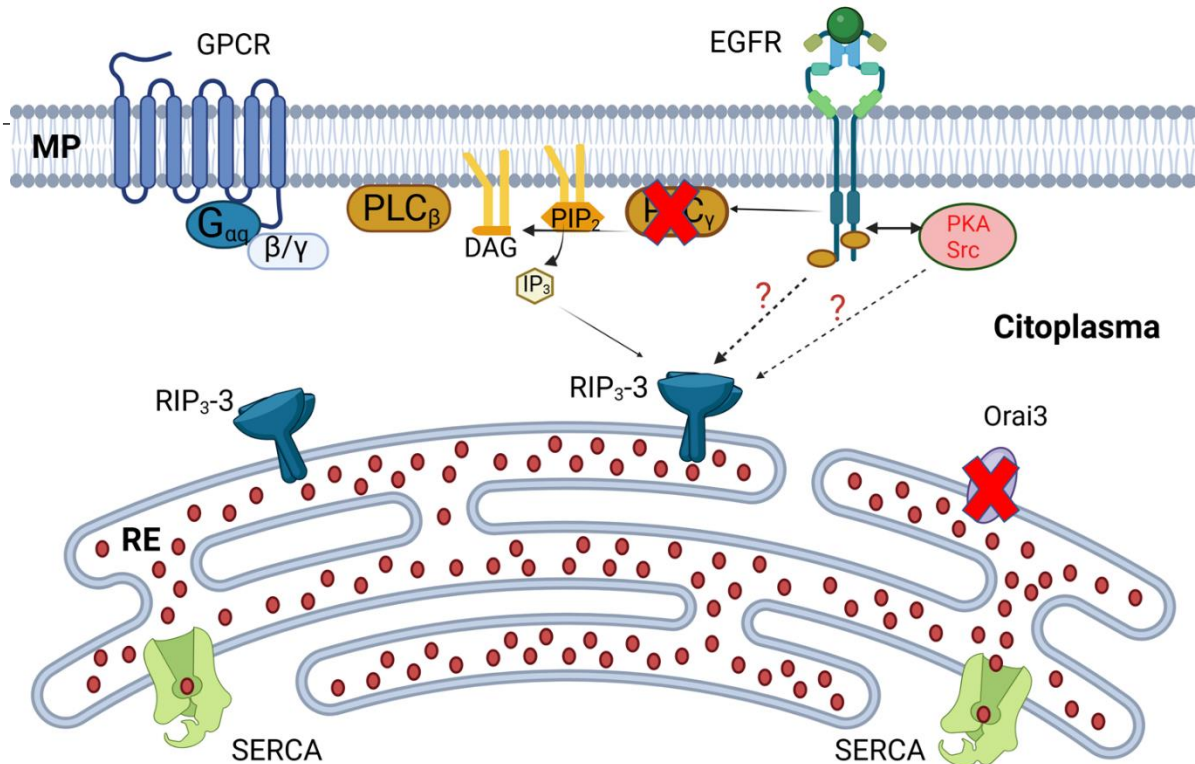


Figura 6.1. Modelo de los datos del trabajo: EGF libera Ca^{2+} del RE independientemente de la producción de IP_3 por un mecanismo de sensibilización del RIP_3 . Las flechas negras continuas () representan vías de señalización de forma secuencial. La flecha negra discontinua (----) representa posibles vías hipotéticas aún no confirmadas experimentalmente. La cruz roja representa que descartamos la posible participación de la entidad molecular en la vía. DAG, diacilglicerol; EGFR, Receptor del factor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en inglés); GPCR, Receptor acoplado a proteína G (por sus siglas en inglés); IP $_3$, 1,4,5-trifosfato de inositol; RIP_3 -3, Receptor de IP $_3$ tipo 3; MP, membrana plasmática; PIP $_2$, bifosfato de 4,5 fosfatidilinositol; PKA; cinasa A de proteínas (por sus siglas en inglés); PLC, fosfolipasa C (por sus siglas en inglés); RE: Retículo endoplásmico; Src, familia de cinasas de tirosinas Src; SERCA, ATPasa de Calcio del Retículo Sarcoendoplásmico (por sus siglas en inglés). Elaborado en BioRender.com.

7. CONCLUSIONES

El hEGF libera Ca^{2+} del RE mediante la activación del RIP_3 , probablemente por un mecanismo de sensibilización que no involucra la actividad de la $\text{PLC}\gamma$.

Los canales Orai3 o el RyR no participan en la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por el hEGF.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar el efecto del hEGF en la $[Ca^{2+}]_{RE}$ utilizando los indicadores de Ca^{2+} dirigidos a la luz del RE.
- Emplear inhibidores de cinasas como PKA, ERK y Src para evaluar la participación de diferentes vías de señalización en la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por hEGF.
- Emplear siRNAs de las diferentes isoformas del RIP_3 para evaluar la contribución individual del RIP_3 1 y del RIP_3 3 en la liberación de Ca^{2+} inducida por hEGF.
- Comprobar la participación de $PLC\gamma$ en la respuesta de hEGF empleando un sistema que presente PLC sin sitio catalítico.
- Evaluar la dinámica de señalización y de liberación de Ca^{2+} inducida por hEGF utilizando biosensores que permiten medir la actividad de diferentes cinasas.
- Determinar la participación de la mitocondria en la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por hEGF.

10. ANEXOS

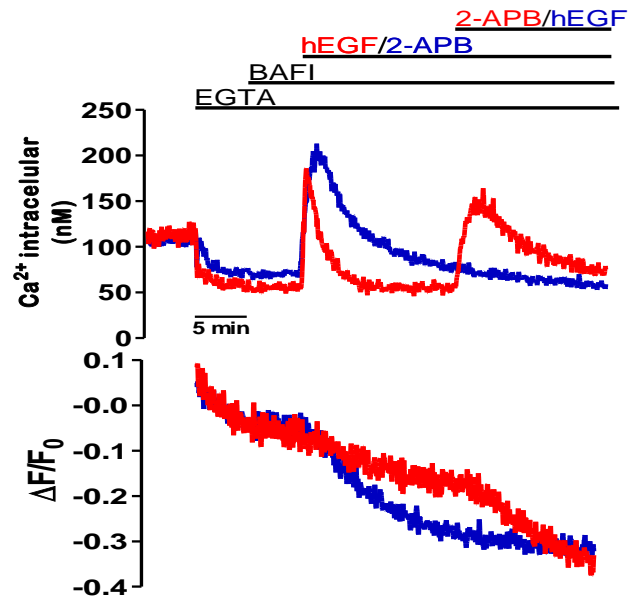


Figura 10.1. Registros en paralelo en las mismas células HeLa empleando Fura-2 y Mag-Fluo4.

Se aplicaron al momento que se indica 2 mM de EGTA, 100 nM de BAFI, 80 ng/mL de hEGF y 200 μ M de 2-APB. **A.** Registro de Ca²⁺ citosólico empleando Fura-2 que muestra que el vaciamiento del RE con 2-APB impide la liberación de Ca²⁺ por hEGF en células HeLa. **B.** Registros realizados en las mismas células utilizando Mag-Fluo-4 que muestra el vaciamiento del RE por la estimulación con hEGF y 2-APB. Además, estos registros sugieren que el hEGF produce una reducción de la [Ca²⁺]_{RE} muy pequeña que se necesitará verificar con indicadores luminales del RE con una menor afinidad por Ca²⁺ que el Mag-fluo-4

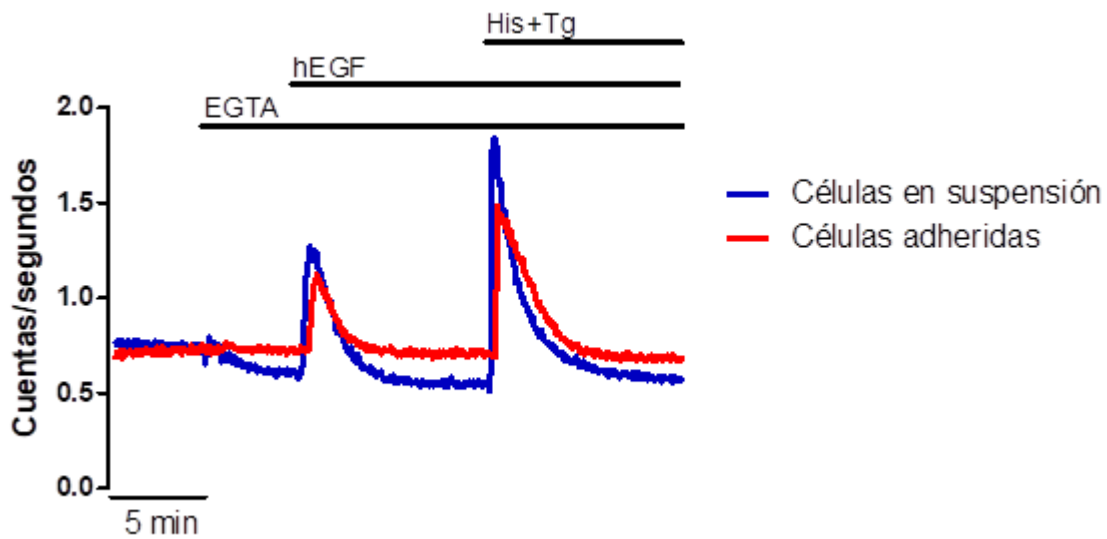


Figura 10.2. Estimulación con EGF en células adheridas y en células en suspensión. Se empleó ACLAR para realizar los registros en células adheridas. Se estimularon las células con 80 ng/mL de hEGF y con la combinación de 100 μ M de Histamina y 1 μ M de Tg. El registro muestra que puede observarse respuesta de hEGF de igual forma en células adheridas y en células en suspensión.

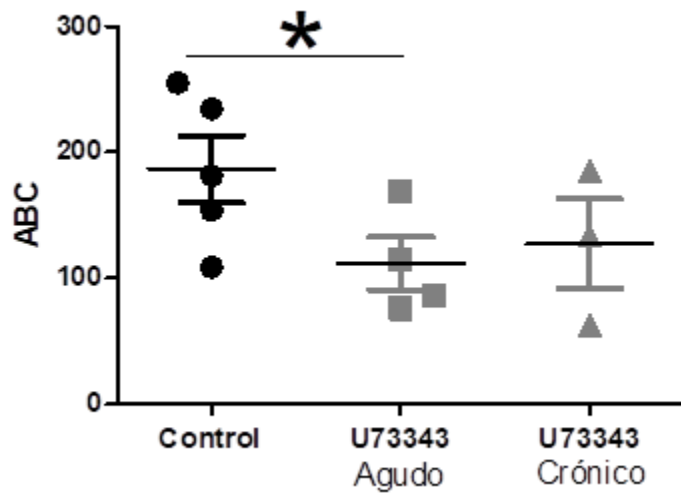


Figura 10.3. U73343, análogo inactivo de U73122, afecta la respuesta de hEGF. La gráfica muestra la estadística para el ABC de las respuestas de hEGF control (como segundo estímulo luego de la aplicación de histamina) y en células en las que se aplicó U73343 de forma aguda y pre-incubada (1h). $p^* < 0.05$

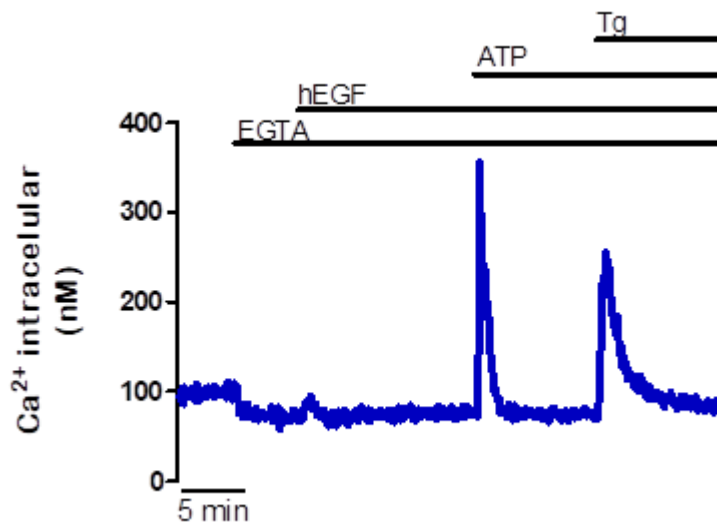


Figura 10.4. Registros de Ca²⁺ citosólico empleando Fura-2 en células HEK293T. Nuestro registro muestra una baja respuesta a 80 ng/mL de hEGF en este modelo celular.

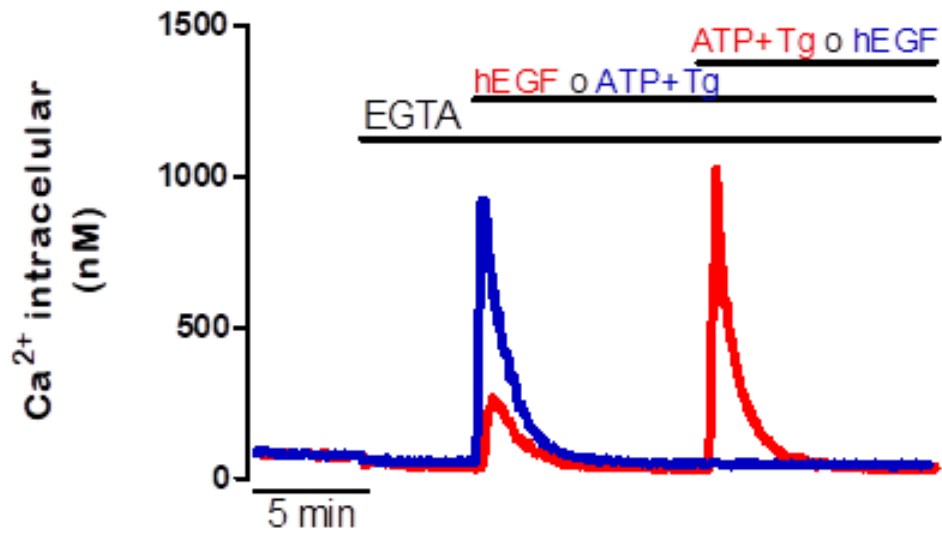


Figura 10.5. Registros de Ca²⁺ citosólico empleando Fura-2 en células HeLa. Se aplicaron al momento que se indica 2 mM de EGTA, 80 ng/mL de hEGF y la combinación de 10 μM de ATP y 1 μM de Tg. Se aprecia que el vaciamiento del RE mediante esta combinación de ATP y Tg inhibe la respuesta de hEGF al igual que Histamina y Tg.

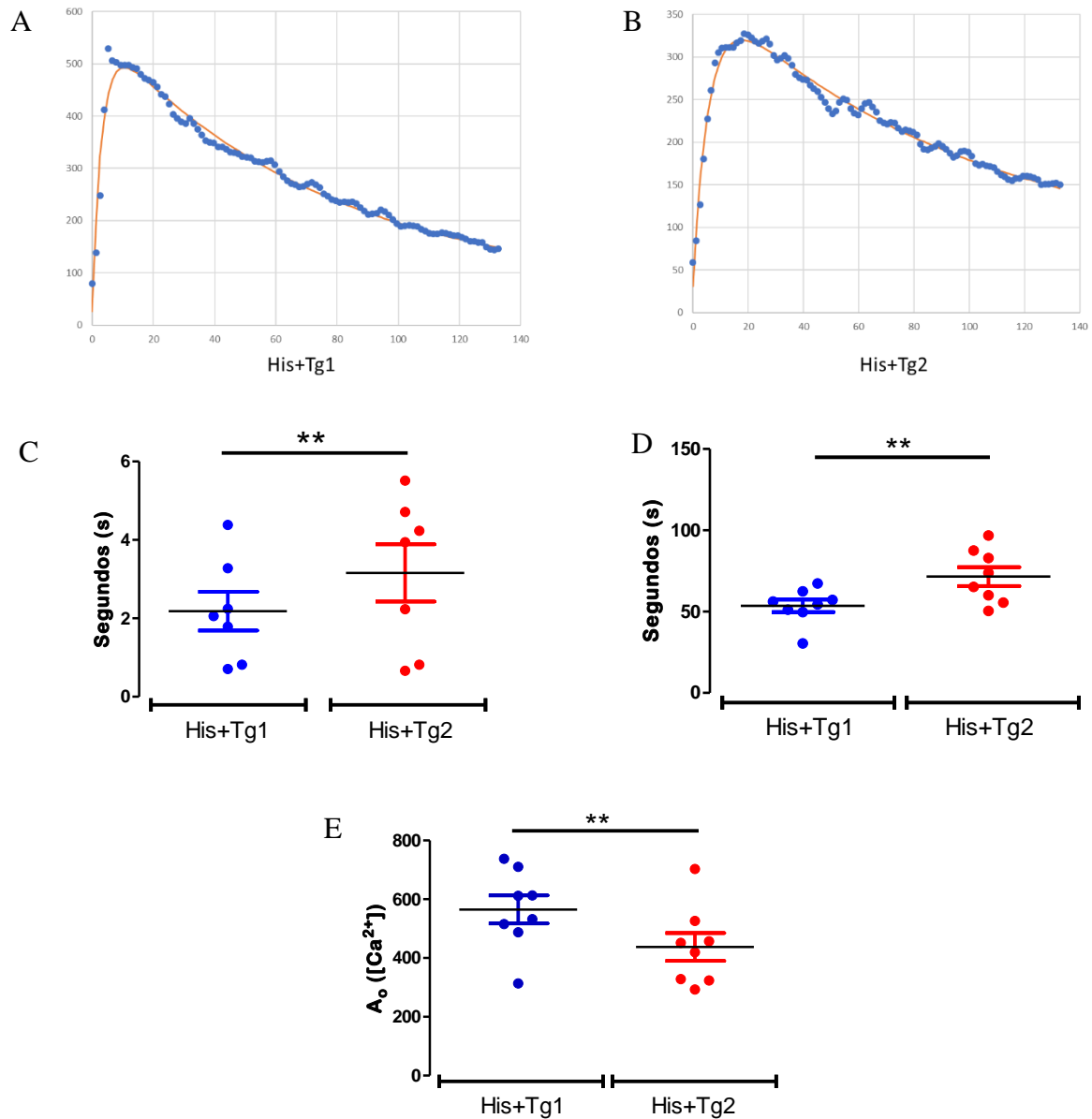


Figura 10.6. La disminución en la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por His+Tg en presencia de hEGF se debe a cambios en los parámetros cinéticos. Se tomaron 400 segundos de la respuesta de His+Tg cuando fue el primer o segundo estímulo en la condición de $2 \mu M$ de Fura-2 en el protocolo descrito en el capítulo 5.1. El ajuste bi-exponencial se realizó empleando la fórmula que se describe en el capítulo 4.6. **A.** Ajuste a la ecuación biexponencial de la respuesta de His+Tg como primer estímulo. **B.** Ajuste a la ecuación biexponencial de la respuesta de His+Tg como segundo estímulo. **C y D.** Estadística de los tiempos medios de liberación (t_1 ; C) y remoción (t_2 ; D) para las respuestas de His +Tg cuando era el primer (puntos azules) o segundo estímulo (puntos rojos). **E.** Estadística de la máxima respuesta de calcio en ausencia de remoción para las respuestas de hEGF cuando era el primer (puntos azules) o segundo estímulo (puntos rojos). $n=8$, $**p<0.01$.

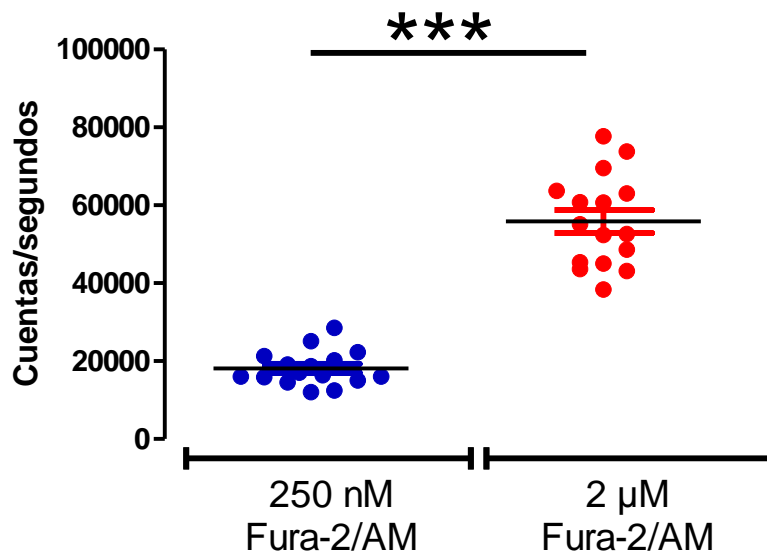


Figura 10.7. La fluorescencia del Fura-2 insensible a la $[Ca^{2+}]_i$ fue mayor en la incubación con 2 μ M de Fura-2/AM con respecto a 250 nM. Se compararon las cuentas/segundos en ambas condiciones de bajo (250 nM Fura-2/AM) y alto (2 μ M de Fura-2/AM) amortiguamiento empleando la longitud de onda insensible al calcio de 360 nm del Fura-2. Para ello se tomaron los datos en condiciones de reposo en los 300 segundos iniciales del registro y se restó el promedio de la fluorescencia del fluoróforo apagado con manganeso. Se muestra la estadística para aquellas células incubadas con 250 nM de Fura-2/AM (puntos azules) o con 2 μ M de Fura-2/AM (puntos rojos). n=16, ***p<0.001.

11. REFERENCIAS

- Aguilar-Maldonado, B., Gómez-Viquez, L., García, L., Del Angel, R. M., Arias-Montaño, J. A., & Guerrero-Hernández, A. (2003). Histamine potentiates IP₃-mediated Ca²⁺ release via thapsigargin-sensitive Ca²⁺ pumps. *Cellular Signalling*, *15*(7), 689–697. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(03\)00012-3](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(03)00012-3)
- Alzayady, K. J., Wang, L., Chandrasekhar, R., Wagner, L. E., Van Petegem, F., & Yule, D. I. (2016). Defining the stoichiometry of inositol 1,4,5-trisphosphate binding required to initiate Ca²⁺ release. *Science Signaling*, *9*(422). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad6281>
- Azumaya, C. M., Linton, E. A., Risener, C. J., Nakagawa, T., & Karakas, E. (2020). Cryo-EM structure of human type-3 inositol triphosphate receptor reveals the presence of a self-binding peptide that acts as an antagonist. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(6), 1743–1753. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011570>
- Bennett, D. L., Cheek, T. R., Berridge, M. J., De Smedt, H., Parys, J. B., Missiaen, L., & Bootman, M. D. (1996). Expression and Function of Ryanodine Receptors in Nonexcitable Cells. *JBC*, *271*(11), 6356–6362.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *4*(7), 517–529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Berridge M, Lipp P, & Bootman M. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, *1*(1), 11–21.
- Bezprozvanny, I. (2005). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium*, *38*(3–4), 261–272. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.030>
- Bootman, M. D., Berridge, M. J., & Taylor, C. W. (1992). All-or-nothing Ca²⁺ mobilization from the intracellular stores of single histamine-stimulated HeLa cells. *Journal of Physiology*, *450*, 163–178.
- Bootman, M. D., & Bultynck, G. (2020). Fundamentals of cellular calcium signaling: A primer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *12*(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038802>

- Brown, G. R., Sayers, L. G., Kirk, C. J., Michell, R. H., & Michelangeli, F. (1992). The opening of the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} channel in rat cerebellum is inhibited by caffeine. *Biochem. J*, *282*, 309–312.
- Bryant, J. A., Finn, R. S., Slamon, D. J., Cloughesy, T. F., & Charles, A. C. (2004). EGF activates intracellular and intercellular calcium signaling by distinct pathways in tumor cells. *Cancer Biology and Therapy*, *3*(12), 1243–1249. <https://doi.org/10.4161/cbt.3.12.1233>
- Carpenter, G., & Cohen, S. (1979). Epidermal Growth Factor. *Annu Rev Biochem*, *48*, 193–206.
- Chaloux, B., Caron, A. Z., & Guillemette, G. (2007). Protein kinase A increases the binding affinity and the Ca^{2+} release activity of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 in RINm5F cells. *Biology of the Cell*, *99*(7), 379–388. <https://doi.org/10.1042/bc20060121>
- Clapham, D. E. (2007). Calcium Signaling. *Cell*, *131*(6), 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Curtis, K. A., Miller, D., Millard, P., Basu, S., Horkay, F., & Chandran, P. L. (2016). Unusual salt and pH induced changes in polyethylenimine solutions. *PLoS ONE*, *11*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158147>
- Desouza, N., Reiken, S., Ondrias, K., Yang, Y. M., Matkovich, S., & Marks, A. R. (2002). Protein kinase A and two phosphatases are components of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor macromolecular signaling complex. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(42), 39397–39400. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207059200>
- Dickson, E. J., Falkenburger, B. H., & Hille, B. (2013). Quantitative properties and receptor reserve of the IP_3 and calcium branch of Gq-coupled receptor signaling. *Journal of General Physiology*, *141*(5), 521–535. <https://doi.org/10.1085/jgp.201210886>
- Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J. M., & Venkatachalam, M. A. (2006). Calcium in cell injury and death. *Annual Review of Pathology*, *1*, 405–434. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100218>
- Emrich, S. M., Yoast, R. E., & Trebak, M. (2021). Physiological Functions of CRAC Channels. *Annual Review of Physiology*, *84*, 355–379. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-052521>

- Fernandez Garcia, E., Paudel, U., Noji, M. C., Bowman, C. E., Rustgi, A. K., Pitarresi, J. R., Wellen, K. E., Arany, Z., Weissenrieder, J. S., & Foskett, J. K. (2023). The mitochondrial Ca^{2+} channel MCU is critical for tumor growth by supporting cell cycle progression and proliferation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1082213>
- Fu Tao, Xu Yonghua, Jiang Wanli, Zhang Hongyu, Zhu Peihong, & Wu Jun. (1994). EGF receptor-mediated intracellular calcium increase in human hepatoma BEL-7404 cells 1. *Cell Research*, *4*, 145–153.
- Gómez-Viquez, L., Rueda, A., García, U., & Guerrero-Hernández, A. (2005). Complex effects of ryanodine on the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} levels in smooth muscle cells. *Cell Calcium*, *38*(2), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.002>
- Guerrero Agustín, Gallegos Martín, Martínez Ericka, Sánchez Víctor, & Contreras Rodrigo. (2023). Señalización por calcio intracelular. In Olivares Jesús & Rueda Angélica (Eds.), *Nuevas tendencias de investigación en la señalización celular en la era post-COVID* (1ra Edición).
- Hakamata Yasuhiro, Nishimura Seiichiro, Nakai Junichi, Nakashima Yasuyo, Kita Toru, & Imoto Keiji. (1994). Involvement of the brain type of ryanodine receptor in T-cell proliferation. *Federation of European Biochemical Societies*, *352*(2), 206–210.
- Han, K. S., Mannaioni, G., Hamill, C. E., Lee, J., Junge, C. E., Lee, C. J., & Traynelis, S. F. (2011). Activation of protease activated receptor 1 increases the excitability of the dentate granule neurons of hippocampus. *Molecular Brain*, *4*, 32. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-32>
- Hattori, M., Suzuki, A. Z., Higo, T., Miyauchi, H., Michikawa, T., Nakamura, T., Inoue, T., & Mikoshiba, K. (2004). Distinct Roles of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Types 1 and 3 in Ca^{2+} Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(12), 11967–11975. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311456200>
- Hur, E. M., Park, Y. S., Yang, H. H., Seung, H. Y., Woo, K. C., Choi, B. H., & Kim, K. T. (2005). Junctional membrane inositol 1,4,5-trisphosphate receptor complex coordinates sensitization of the silent EGF-induced Ca^{2+} -signaling. *Journal of Cell Biology*, *169*(4), 657–667. <https://doi.org/10.1083/jcb.200411034>

- Jeffs, G. J., Meloni, B. P., Bakker, A. J., & Knuckey, N. W. (2007). The role of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) in neurons following ischaemia. *Journal of Clinical Neuroscience*, *14*(6), 507–514. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2006.07.013>
- Kang, S. S., Han, K. S., Ku, B. M., Lee, Y. K., Hong, J., Shin, H. Y., Almonte, A. G., Woo, D. H., Brat, D. J., Hwang, E. M., Yoo, S. H., Chung, C. K., Park, S. H., Paek, S. H., Roh, E. J., Lee, S. J., Park, J. Y., Traynelis, S. F., & Lee, C. J. (2010). Caffeine-mediated inhibition of calcium release channel inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtype 3 blocks glioblastoma invasion and extends survival. *Cancer Research*, *70*(3), 1173–1183. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2886>
- Kim, M. S., Kim, S. H., Yang, S. H., & Kim, M. S. (2020). Restricting extracellular Ca²⁺ on gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cells reverses altered epidermal growth factor-mediated Ca²⁺ response, which consequently enhances gefitinib sensitivity. *PLoS ONE*, *15*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238155>
- Klein, R. R., Bourdon, D. M., Costales, C. L., Wagner, C. D., White, W. L., Williams, J. D., Hicks, S. N., Sondek, J., & Thakker, D. R. (2011). Direct activation of human phospholipase C by its well known inhibitor U73122. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(14), 12407–12416. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.191783>
- Krebs, J. (2022). Structure, Function and Regulation of the Plasma Membrane Calcium Pump in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1027. <https://doi.org/10.3390/ijms23031027>
- Kumari, S., Depoil, D., Martinelli, R., Judokusumo, E., Carmona, G., Gertler, F. B., Kam, L. C., Carman, C. V., Burkhardt, J. K., Irvine, D. J., & Dustin, M. L. (2015). Actin foci facilitate activation of the phospholipase C- γ in primary T lymphocytes via the WASP pathway. *ELife*, *4*. <https://doi.org/10.7554/eLife.04953.001>
- Laporte, R., Hui, A., & Laher, I. (2004). Pharmacological modulation of sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Pharmacological Reviews*, *56*(4), 439–513. <https://doi.org/10.1124/pr.56.4.1>
- Leitner, M. G., Michel, N., Behrendt, M., Dierich, M., Dembla, S., Wilke, B. U., Konrad, M., Lindner, M., Oberwinkler, J., & Oliver, D. (2016). Direct modulation of TRPM4 and TRPM3 channels by the phospholipase C inhibitor U73122. *British Journal of Pharmacology*, *173*(16), 2555–2569. <https://doi.org/10.1111/bph.13538>

- Lencesova, L., Hudecova, S., Csaderova, L., Markova, J., Soltysova, A., Pastorek, M., Sedlak, J., Wood, M. E., Whiteman, M., Ondrias, K., & Krizanova, O. (2013). Sulphide signalling potentiates apoptosis through the up-regulation of IP₃ receptor types 1 and 2. *Acta Physiologica*, *208*(4), 350–361. <https://doi.org/10.1111/apha.12105>
- Leon-Aparicio, D., Chavez-Reyes, J., & Guerrero-Hernandez, A. (2017). Activation of endoplasmic reticulum calcium leak by 2-APB depends on the luminal calcium concentration. *Cell Calcium*, *65*, 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.01.013>
- Leon-Aparicio, D., Pacheco, J., Chavez-Reyes, J., Galindo, J. M., Valdes, J., Vaca, L., & Guerrero-Hernandez, A. (2017). Orai3 channel is the 2-APB-induced endoplasmic reticulum calcium leak. *Cell Calcium*, *65*, 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.01.012>
- Levantini, E., Maroni, G., Del Re, M., & Tenen, D. G. (2022). EGFR signaling pathway as therapeutic target in human cancers. *Seminars in Cancer Biology*, *85*, 253–275. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.04.002>
- Li, J., Bruns, A. F., Hou, B., Rode, B., Webster, P. J., Bailey, M. A., Appleby, H. L., Moss, N. K., Ritchie, J. E., Yuldasheva, N. Y., Tumova, S., Quinney, M., Mckeown, L., Taylor, H., Prasad, K. R., Burke, D., O'Regan, D., Porter, K. E., Foster, R., ... Beech, D. J. (2015). Orai3 surface accumulation and calcium entry evoked by vascular endothelial growth factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *35*(9), 1987–1994. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.305969>
- Li, T., Yang, Z., Li, H., Zhu, J., Wang, Y., Tang, Q., & Shi, Z. (2022). Phospholipase Cγ1 (PLCG1) overexpression is associated with tumor growth and poor survival in IDH wild-type lower-grade gliomas in adult patients. *Laboratory Investigation*, *102*(2), 143–153. <https://doi.org/10.1038/s41374-021-00682-7>
- Marchi, S., Marinello, M., Bononi, A., Bonora, M., Giorgi, C., Rimessi, A., & Pinton, P. (2012). Selective modulation of subtype III IP₃R by Akt regulates ER Ca²⁺ release and apoptosis. *Cell Death and Disease*, *3*(5). <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.45>
- Matsuda Miho, Paterson Hugh F., Rodriguez Rosie, Fensome Amanda C., Ellis Moira V., Swann Karl, & Katan Matilda. (2001). Real time fluorescence imaging of PLC gamma translocation and its interaction with the epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol*, *153*(3), 599–612.

- Mehta, S., Zhang, Y., Roth, R. H., Zhang, J. fan, Mo, A., Tenner, B., Hukanir, R. L., & Zhang, J. (2018). Single-fluorophore biosensors for sensitive and multiplexed detection of signalling activities. *Nature Cell Biology*, *20*(10), 1215–1225. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0200-6>
- Mesa, D., Barbieri, E., Raimondi, A., Freddi, S., Miloro, G., Jendrisek, G., Caldieri, G., Quarto, M., Schiano Lomoriello, I., Malabarba, M. G., Bresci, A., Manetti, F., Vernuccio, F., Abdo, H., Scita, G., Lanzetti, L., Polli, D., Tacchetti, C., Pinton, P., ... Sigismund, S. (2024). A tripartite organelle platform links growth factor receptor signaling to mitochondrial metabolism. *Nature Communications*, *15*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49543-z>
- Missiaen, L., Taylort, C. W., & Berridge, M. J. (1992). Luminal Ca²⁺ promoting spontaneous Ca²⁺ release from inositol triphosphate-sensitive stores in rat hepatocytes. *Journal of Physiology*, *455*, 623–640.
- Miyakawa Tomoya, Maeda Akito, Yamazawa Toshiko, Hirose Kenzo, Kurosaki Tomohiro, & Iino Masamitsu. (1999). Encoding of Ca²⁺ signals by differential expression of IP3 receptor subtypes. *EMBO*, *18*(5), 1303–1308.
- Motiani, R. K., Stolwijk, J. A., Newton, R. L., Zhang, X., & Trebak, M. (2013). Emerging roles of Orai3 in pathophysiology. *Channels*, *7*(5), 392–401. <https://doi.org/10.4161/chan.24960>
- Mound, A., Vautrin-Glabik, A., Foulon, A., Botia, B., Hague, F., Parys, J. B., Ouadid-Ahidouch, H., & Rodat-Despoix, L. (2017a). Downregulation of type 3 inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor decreases breast cancer cell migration through an oscillatory Ca²⁺ signal. *Oncotarget*, *8*(42), 72324–72341. www.impactjournals.com/oncotarget/
- Mound, A., Vautrin-Glabik, A., Foulon, A., Botia, B., Hague, F., Parys, J. B., Ouadid-Ahidouch, H., & Rodat-Despoix, L. (2017b). Downregulation of type 3 inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor decreases breast cancer cell migration through an oscillatory Ca²⁺ signal. In *Ion Channels in Breast Cancer* (Vol. 8, Issue 42). www.impactjournals.com/oncotarget/
- Muñoz, A., García, L., & Guerrero-Hernández, A. (1998). In situ characterization of the Ca²⁺ sensitivity of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels: Implications for their use

- as near-membrane Ca^{2+} indicators in smooth muscle cells. *Biophysical Journal*, 75(4), 1774–1782. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77619-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77619-2)
- Murayama, T., Ogawa, H., Kurebayashi, N., Ohno, S., Horie, M., & Sakurai, T. (2018). A tryptophan residue in the caffeine-binding site of the ryanodine receptor regulates Ca^{2+} sensitivity. *Communications Biology*, 1, 98. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0103-x>
- Muschol, M., Dasgupta, B. R., & Salzberg, B. M. (1999). Caffeine interaction with fluorescent calcium indicator dyes. *Biophysical Journal*, 77(1), 577–586. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)76914-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)76914-6)
- Neacsu, C., Sauer, S. K., Reeh, P. W., & Babes, A. (2020). The phospholipase C inhibitor U73122 is a potent agonist of the polymodal transient receptor potential ankyrin type 1 (TRPA1) receptor channel. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393(2), 177–189. <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01722-2>
- Nicolson, T. A., Bevan, S., & Richards, C. D. (2002). Characterisation of the calcium responses to histamine in capsaicin-sensitive and capsaicin-insensitive sensory neurones. *Neuroscience*, 110(2), 329–338. www.neuroscience-ibro.com
- Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukui, S., Yamanaka, M., Kim, J.-H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., & Yokoyama, S. (2002). Crystal Structure of the Complex of Human Epidermal Growth Factor and Receptor Extracellular Domains. *Cell*, 110(6), 775–787.
- Parker, I., & Ivorra, I. (1991). Caffeine inhibits inositol triphosphate-mediated liberation of intracellular calcium in *Xenopus* Oocytes. *Journal of Physiology*, 433, 229–240.
- Pérez Rosas, N. (2016). Análisis de la dinámica del ion calcio durante su liberación del retículo sarcoplásmico por medio de los receptores de rianodina: un enfoque de modelación matemática. CINVESTAV.
- Pinilla-Macua, I., Grassart, A., Duvvuri, U., Watkins, S. C., & Sorkin, A. (2017). EGF receptor signaling, phosphorylation, ubiquitylation and endocytosis in tumors in vivo. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.31993.001>
- Poenie, M. (1990). Alteration of intracellular Fura-fluorescence by viscosity: A simple correction. *Cell Calcium*, 11(2–3), 85–91.

- Polk, D. B. (1998). Epidermal Growth Factor Receptor-Stimulated Intestinal Epithelial Cell Migration Requires Phospholipase C Activity. *Gastroenterology*, *114*(3), 493–502.
- Prole, D. L., & Taylor, C. W. (2016). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and their protein partners as signalling hubs. *Journal of Physiology*, *594*(11), 2849–2866. <https://doi.org/10.1113/JP271139>
- Prole, D. L., & Taylor, C. W. (2019). Structure and function of IP₃ receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *11*(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035063>
- Raffaello, A., Mammucari, C., Gherardi, G., & Rizzuto, R. (2016). Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes. *Trends in Biochemical Sciences*, *41*(12), 1035–1049. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.001>
- Rezuchova, I., Hudecova, S., Soltysova, A., Matuskova, M., Durinikova, E., Chovancova, B., Zuzcak, M., Cihova, M., Burikova, M., Penesova, A., Lencesova, L., Breza, J., & Krizanova, O. (2019). Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor has antiapoptotic and proliferative role in cancer cells. *Cell Death and Disease*, *10*(3), 186. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1433-4>
- Roh, T. H., Chae, M. K., Ko, J. S., Kikkawa, D. O., Jang, S. Y., & Yoon, J. S. (2023). Phospholipase C- γ as a Potential Therapeutic Target for Graves' Orbitopathy. *Endocrinology and Metabolism*, *38*(6), 739–749. <https://doi.org/10.3803/EnM.2023.1780>
- Rueda, A., García, L., Soria-Jasso, L. E., Arias-Montaña, J. A., & Guerrero-Hernández, A. (2002). The initial inositol 1,4,5-trisphosphate response induced by histamine is strongly amplified by Ca²⁺ release from internal stores in smooth muscle. *Cell Calcium*, *31*(4), 161–173. <https://doi.org/10.1054/ceca.2002.0270>
- Russell, J. T. (2011). Themed Section: Imaging-the Interface with Pharmacology Imaging calcium signals *in vivo*: a powerful tool in physiology and pharmacology Correspondence Keywords calcium imaging; *in vivo* imaging; calcium indicators. *British Journal of Pharmacology*, *163*, 1605–1625. <https://doi.org/10.1111/bph.2011.163.issue-8>

- Sabala Pawel, Amler Evzen, & Baranska Jolanta. (1997). Intracellular Ca^{2+} signals induced by ATP and Thapsigargin in glioma C6 cells. Calcium pools sensitive to inositol triphosphate and Thapsigargin. *Neurochem. Int.*, *31*(1), 55–64.
- Sabin, J., Alatorre-Meda, M., Miñones, J., Domínguez-Arca, V., & Prieto, G. (2022). New insights on the mechanism of polyethylenimine transfection and their implications on gene therapy and DNA vaccines. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *210*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112219>
- Sánchez-Vázquez, V. H., Martínez-Martínez, E., Gallegos-Gómez, M. L., Arias, J. M., Pallafacchina, G., Rizzuto, R., & Guerrero-Hernández, A. (2023). Heterogeneity of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} store determines colocalization with mitochondria. *Cell Calcium*, *109*. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2022.102688>
- Santulli, G., Nakashima, R., Yuan, Q., & Marks, A. R. (2017). Intracellular calcium release channels: an update. *Journal of Physiology*, *595*(10), 3041–3051. <https://doi.org/10.1113/JP272781>
- Sauvé, R., Diarra, A., Chahine, M., Simoneau, C., Mower, N., & Roy, G. (1991). Ca^{2+} oscillations induced by histamine H1 receptor stimulation in HeLa cells: Fura-and patch clamp analysis. *Cell Calcium*, *12*(2–3), 165–176.
- Sawano, A., Hama, H., Saito, N., & Miyawaki, A. (2002). Multicolor Imaging of Ca^{2+} and Protein Kinase C Signals Using Novel Epifluorescence Microscopy. *Biophys J*, *82*(2), 1076–1085.
- Schiffer, H. H., Reding, E. C., Fuhs, S. R., Lu, Q., Piu, F., Wong, S., Littler, P. L. H., Weiner, D. M., Keefe, W., Tan, P. K., Nash, N. R., Knapp, A. E., Olsson, R., & Brann, M. R. (2007). Pharmacology and signaling properties of epidermal growth factor receptor isoforms studied by bioluminescence resonance energy transfer. *Molecular Pharmacology*, *71*(2), 508–518. <https://doi.org/10.1124/mol.106.027656>
- Schulte, A., & Blum, R. (2022). Shaped by leaky ER: Homeostatic Ca^{2+} fluxes. *Frontiers in Physiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.972104>
- Shibao, K., Fiedler, M. J., Nagata, J., Minagawa, N., Hirata, K., Nakayama, Y., Iwakiri, Y., Nathanson, M. H., & Yamaguchi, K. (2010). The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is associated with aggressiveness of colorectal carcinoma. *Cell Calcium*, *48*(6), 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.09.005>

- Soulsby, M. D., & Wojcikiewicz, R. J. H. (2005). The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase at three sites. *Biochemical Journal*, 392(3), 493–497. <https://doi.org/10.1042/BJ20051325>
- Tasia, A., Rahmana Emran, K., Tomohiko, O., & Daryono Hadi, T. (2022). Structural Insight and Development of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *Molecules*, 27(3), 819. <https://doi.org/10.3390/molecules27030819>
- Tiffner, A., & Derler, I. (2021). Isoform-specific properties of orai homologues in activation, downstream signaling, physiology and pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8020. <https://doi.org/10.3390/ijms22158020>
- Ujváry, I. (2010). Pest Control Agents from Natural Products. In *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology, Third Edition: Volume 1* (Vol. 1, pp. 119–229). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00003-3>
- Uribe, M. L., Marrocco, I., & Yarden, Y. (2021). EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance. *Cancers*, 13(11), 2748. <https://doi.org/10.3390/cancers>
- Uyemura, T., Takagi, H., Yanagida, T., & Sako, Y. (2005). Single-molecule analysis of epidermal growth factor signaling that leads to ultrasensitive calcium response. *Biophysical Journal*, 88(5), 3720–3730. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.053330>
- Valcarce, C., Björk, I., & Stenflo, J. (1999). The epidermal growth factor precursor. A calcium-binding, β -hydroxyasparagine containing modular protein present on the surface of platelets. *European Journal of Biochemistry*, 260(1), 200–207. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00156.x>
- Vanderheyden, V., Devogelaere, B., Missiaen, L., De Smedt, H., Bultynck, G., & Parys, J. B. (2009). Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release by reversible phosphorylation and dephosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(6), 959–970. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.12.003>
- Varadarajan, S., Tanaka, K., Smalley, J. L., Bampton, E. T. W., Pellicchia, M., Dinsdale, D., Willars, G. B., & Cohen, G. M. (2013). Endoplasmic Reticulum Membrane Reorganization Is Regulated by Ionic Homeostasis. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056603>

- Wang, H. Bin, Yang, C., Leskow, F. C., Sun, J., Canagarajah, B., Hurley, J. H., & Kazanietz, M. G. (2006). Phospholipase C γ /diacylglycerol-dependent activation of β 2-chimaerin restricts EGF-induced Rac signaling. *EMBO Journal*, *25*(10), 2062–2074. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601098>
- Wu, L., & Chen, J. (2023). Type 3 IP3 receptor: Its structure, functions, and related disease implications. *Channels*, *17*(1). <https://doi.org/10.1080/19336950.2023.2267416>
- Xie, Z., Chen, Y., Pennypacker, S. D., Zhou, Z., & Peng, D. (2010). The SH3 domain, but not the catalytic domain, is required for phospholipase C- γ 1 to mediate epidermal growth factor-induced mitogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *398*(4), 719–722. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.007>
- Xu, H., & Van Remmen, H. (2021). The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase (SERCA) pump: a potential target for intervention in aging and skeletal muscle pathologies. *Skeletal Muscle*, *11*(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s13395-021-00280-7>
- Yoast, R. E., Emrich, S. M., & Trebak, M. (2020). The anatomy of native CRAC channel(s). *Current Opinion in Physiology*, *17*, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2020.07.012>
- Zalk, R., Clarke, O. B., Georges, A. Des, Grassucci, R. A., Reiken, S., Mancina, F., Hendrickson, W. A., Frank, J., & Marks, A. R. (2015). Structure of a mammalian ryanodine receptor. *Nature*, *517*(7532), 44–49. <https://doi.org/10.1038/nature13950>
- Zhang, B. X., Ma, X., Yeh, C. K., Lifschitz, M. D., Zhu, M. X., & Katz, M. S. (2002). Epidermal growth factor-induced depletion of the intracellular Ca²⁺ store fails to activate capacitative Ca²⁺ entry in a human salivary cell line. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(50), 48165–48171. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208077200>
- Zhang, X., Xin, P., Yoast, R. E., Emrich, S. M., Johnson, M. T., Pathak, T., Benson, J. C., Azimi, I., Gill, D. L., Monteith, G. R., & Trebak, M. (2020). Distinct pharmacological profiles of ORAI1, ORAI2, and ORAI3 channels. *Cell Calcium*, *91*. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102281>