



FACULTADE DE CIENCIAS

GRAO EN BIOQUÍMICA

D./ D.^a ELISA ÁLVAREZ RIESGO

**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL CALCIO EN LA
ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA
INFLAMATORIA**

TRABALLO FIN DE GRAO
XUÑO 2025

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	3
RESUMO	4
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	5
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Inflamación	7
1.2. Papel de los macrófagos en la respuesta inflamatoria	10
1.3. Homeostasis del calcio intracelular y su participación en la respuesta inflamatoria	13
1.4. Papel del calcio en el metabolismo energético	20
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAL Y MÉTODOS	25
3.1. Materiales y reactivos.....	25
3.2. Composición de disoluciones	25
3.3. Cultivo celular.....	25
3.4. Tratamientos	25
3.5. Ensayo de viabilidad celular	26
3.6. Cuantificación del factor de necrosis tumoral α mediante ELISA	26
3.7. Medición del calcio citosólico libre.....	26
3.8. Cuantificación de la producción de ATP	27
3.9. Análisis estadístico	28
4. RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	29
4.1. Resultados.....	29
4.1.1. Ensayo de viabilidad con saponina	29
4.1.2. Ensayo de viabilidad con tapsigargina.....	30
4.1.3. Liberación del factor de necrosis tumoral α	31
4.1.4. Medición del efecto de la tapsigargina sobre el calcio citosólico libre.....	32
4.1.5. Cuantificación del ATP tras el tratamiento con tapsigargina.....	33
4.2. Discusión	35
6. CONCLUSIONES.....	40
BIBLIOGRAFÍA	41

RESUMEN

El calcio es un segundo mensajero crucial en numerosos procesos celulares como el metabolismo energético o la activación del sistema inmune. La comunicación que se establece entre la mitocondria y el retículo endoplasmático (RE) para regular sus niveles intracelulares es esencial para el correcto funcionamiento celular y se altera en situaciones de estrés como la inflamación. En este Trabajo Fin de Grado se estudió el papel del calcio en la activación de la respuesta inflamatoria mediante su modulación con tapsigargina (Tg), un compuesto inhibidor irreversible y selectivo de la bomba Ca^{2+} -ATPasa del RE. Inicialmente, se analizó el efecto de la Tg sobre la viabilidad celular en macrófagos de la línea celular RAW 264.7, obteniéndose una concentración inhibitoria 50 de 0,1 μM tras 24 h de tratamiento. A continuación, se cuantificó la liberación del factor de necrosis tumoral α tras 24 h de tratamiento con Tg, obteniéndose una liberación significativa a concentraciones de 0,1 y 0,01 μM . Seguidamente, se analizó el efecto de este fármaco sobre los niveles de calcio citosólico libre mediante el indicador fluorescente Fura-2AM. Se observó un incremento inicial de calcio citosólico correspondiente con el vaciamiento del RE que causa la Tg, seguido de un leve descenso provocado por la recaptación mitocondrial de Ca^{2+} y después un aumento debido a la apertura de los canales de calcio dependientes de reservorio. Por último, se evaluó el efecto de la Tg sobre el metabolismo energético, observándose una reducción significativa de la producción del ATP total debido a la disrupción mitocondrial por la sobrecarga de calcio. Además, se detectaron indicios de recuperación celular, asociados a la activación de la glucólisis anaerobia como mecanismo compensatorio. Estos resultados confirman que la modulación del calcio en macrófagos provoca una activación de la respuesta inflamatoria y afecta al metabolismo energético, especialmente a la función mitocondrial.

Palabras clave: calcio, inflamación, tapsigargina, retículo endoplasmático, mitocondria, macrófagos.

ABSTRACT

Calcium is a crucial second messenger in numerous cellular processes, such as energy metabolism and immune system activation. The communication between mitochondria and the endoplasmic reticulum (ER) to regulate its intracellular levels is essential for proper cell function and is disrupted under stressful situations like inflammation. This Final Degree Project studied the role of calcium in the activation of the inflammatory response through its modulation with thapsigargin (Tg), an irreversible and selective inhibitor of the ER- Ca^{2+} -ATPase pump. Initially, the effect of Tg on cell viability was analyzed in macrophages from RAW 264.7 cell line, obtaining a half inhibitory concentration of 0.1 μM after 24 h of treatment. Next, the release of tumor necrosis factor α was quantified after 24 h of treatment with Tg, obtaining a significant release at concentrations of 0.1 and 0.01 μM . The effect of this drug on free cytosolic calcium levels was then analyzed using the fluorescent indicator Fura-2AM. An initial increase in

cytosolic calcium was observed, corresponding to the ER emptying caused by Tg, followed by a slight decrease caused by mitochondrial Ca^{2+} reuptake and then an increase due to the opening of store-operated channels. Finally, the effect of Tg on energy metabolism was evaluated, revealing a significant reduction in total ATP production due to the mitochondrial disruption caused by calcium overload. Furthermore, signs of cellular recovery were detected, associated to the activation of anaerobic glycolysis as a compensatory mechanism. These results confirm that calcium modulation in macrophages triggers an activation of the inflammatory response and affects energy metabolism, particularly mitochondrial function.

Keywords: calcium, inflammation, thapsigargin, endoplasmic reticulum, mitochondria, macrophages.

RESUMO

O calcio é un segundo mensaxeiro crucial en numerosos procesos celulares, como o metabolismo enerxético e a activación do sistema inmunitario. A comunicación entre as mitocondrias e o retículo endoplasmático (RE) para regular os seus niveis intracelulares é esencial para o correcto funcionamento celular e vese alterada en situacións de estrés como a inflamación. Este Traballo Fin de Grao estuda o papel do calcio na activación da resposta inflamatoria a través da súa modulación con tapsigarxina (Tg), un inhibidor irreversible e selectivo da bomba de Ca^{2+} -ATPasa do RE. Inicialmente, analizouse o efecto da Tg sobre a viabilidade celular en macrófagos da liña celular RAW 264.7, obtendo unha concentración inhibitoria 50 de 0,1 μM despois de 24 h de tratamento. A continuación, cuantificouse a liberación do factor de necrose tumoral α despois de 24 h de tratamento con Tg, obtendo unha liberación significativa a concentracións de 0,1 e 0,01 μM . Analizouse entón o efecto deste fármaco sobre os niveis de calcio citosólico libre utilizando o indicador fluorescente Fura-2AM. Observouse un aumento inicial do calcio citosólico, correspondente ao baleirado do RE causado pola Tg, seguido dunha lixeira diminución causada pola recaptación de Ca^{2+} mitocondrial e, a continuación, un aumento debido á apertura dos canais de calcio regulados por reservorio. Finalmente, avalíouse o efecto da Tg no metabolismo enerxético, revelando unha redución significativa na produción total de ATP debido á disrupción mitocondrial causada pola sobrecarga de calcio. Ademais, detectáronse signos de recuperación celular, asociados á activación da glicólise anaerobia como mecanismo compensatorio. Estes resultados confirman que a modulación do calcio nos macrófagos desencadea unha activación da resposta inflamatoria e afecta ao metabolismo enerxético, en particular á función mitocondrial.

Palabras chave: calcio, inflamación, tapsigarxina, retículo endoplasmático, mitocondria, macrófagos.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADP – adenosín difosfato

α -KGDH – α -cetoglutarato deshidrogenasa (del inglés *α -ketoglutarate dehydrogenase*)

ASC – proteína tipo *Speck* asociada a la apoptosis con dominio CARD (del inglés *apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*)

ATP – adenosín trifosfato

CARD – dominio de reclutamiento de caspasas (del inglés *caspase recruitment domain*)

DAMPs – patrones moleculares asociados al daño (del inglés *damage-associated molecular pattern molecules*)

DMEM – medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (del inglés *Dulbecco's modified eagle medium*)

ELISA – ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*)

FADH₂ – flavín adenín dinucleótido reducido

GRP78 – proteína regulada por glucosa de 78 kDa

IC₅₀ – concentración inhibitoria 50 (IC₅₀, del inglés *inhibitory concentration 50*)

IDH – isocitrato deshidrogenasa (del inglés *isocitrate dehydrogenase*)

IFN- γ – interferón γ (del inglés *interferon γ*)

IL – interleucina

iNOS – óxido nítrico sintasa inducible (del inglés *inducible nitric oxide synthase*)

IP₃ – inositol trifosfato

IP₃R – receptor de inositol trifosfato (IP₃R, del inglés *IP₃ receptor*)

IRE1 α – proteína 1 α dependiente de inositol (del inglés *inositol-requiring enzyme 1 α*)

MAMs – membranas asociadas a mitocondrias (del inglés *mitochondria-associated membranes*)

MAPK – proteína quinasa activada por mitógenos (del inglés *mitogen-activated protein kinase*)

MAVS – proteína de señalización antiviral mitocondrial (del inglés *mitochondrial antiviral signaling protein*)

mCU – uniportador de calcio mitocondrial (del inglés *mitochondrial calcium uniporter*)

Mfn2 – mitofusina 2

mPTP – poro de transición de permeabilidad mitocondrial (del inglés *mitochondrial permeability transition pore*)

NADH – nicotín adenín dinucleótido reducido

NF- κ B – factor nuclear κ B (del inglés *nuclear factor κ B*)

NLRP – receptor tipo NOD con dominio pirina (del inglés *NOD-like receptor pyrin domain-containing*)

PAMPs – patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés *pathogen-associated molecular pattern molecules*)

PDH – piruvato deshidrogenasa (del inglés *pyruvate dehydrogenase*)

PERK – quinasa activada por ARN bicatenario (PKR) similar a la quinasa del retículo endoplasmático (del inglés *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*)

PRRs – receptores de reconocimiento de patrón (del inglés *Pattern recognition receptors*)

RE – retículo sarco/endoplasmático (del inglés *endoplasmic reticulum*)

ROS – especies reactivas de oxígeno (del inglés *reactive oxygen species*)

ROCC – canal de calcio operador por receptor (del inglés *receptor-operated calcium channels*)

RyR – receptor de rianodina (del inglés *ryanodine receptor*)

SAP – saponina

SERCA – Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarco/endoplasmático (del inglés *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*)

SMOC – canal de calcio activado por segundos mensajeros (del inglés *second messenger operated channel*)

SOC – canal de calcio dependiente de reservorio (del inglés *store-operated calcium channels*)

STIM – moléculas interactuadoras de estroma (del inglés *stromal interaction molecules*)

TCA – ciclo del ácido tricarboxílico (del inglés *tricarboxylic acid cycle*)

Tg – tapsigargina

TGF- β – factor de crecimiento transformante β (del inglés *transforming growth factor β*)

TLR – receptor tipo Toll (del inglés *Toll-like receptor*)

TNF- α – factor de necrosis tumoral α (del inglés *tumoral necrosis factor α*)

TRP – canal de potencial receptor transitorio (del inglés *transient receptor potential*)

UPR – respuesta a proteínas mal plegadas (del inglés *unfolded protein response*)

VDAC – canales aniónicos dependientes de voltaje (del inglés *voltage-dependent anion channels*)

VOCC – canales de calcio operados por voltaje (del inglés *voltage-operated calcium channels*)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Inflamación

La inflamación es una respuesta del sistema inmune innato que se produce ante diversos estímulos como daño en el tejido, infección, patógenos o componentes tóxicos. Esta respuesta es un mecanismo de defensa cuyo objetivo es eliminar el material extraño y restaurar la homeostasis reparando la lesión. Así, factores como una infección o daños en el tejido inducen una respuesta inflamatoria aguda, caracterizada por la liberación de plasma y leucocitos desde el torrente sanguíneo hasta el lugar de la infección o herida, acompañado de la producción de citoquinas proinflamatorias (L. Chen et al., 2017). Sin embargo, si la inflamación aguda falla en la eliminación del estímulo dañino, el proceso inflamatorio permanece activo y adquiere nuevas características en un segundo intento de eliminar el patógeno. Si ello no resulta suficiente, se activa una respuesta inflamatoria crónica, caracterizada por la atracción de macrófagos y linfocitos hacia el foco inflamatorio, así como por la proliferación y formación de nuevos vasos sanguíneos y tejido conectivo. Esta inflamación crónica está presente en la patogénesis de muchas enfermedades crónicas, como la diabetes o la artritis (Medzhitov, 2008).

Todo este proceso comienza con el reconocimiento de la infección a través de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen-associated molecular pattern molecules*) mediante los receptores de reconocimiento de patrón (PRRs, del inglés *pattern recognition receptors*) del sistema inmune innato, como los receptores tipo Toll (TLRs, del inglés *Toll-like receptors*). Además, también son capaces de reconocer patrones moleculares asociados al daño (DAMPs, del inglés *damage-associated molecular pattern molecules*), que desencadenan una respuesta inflamatoria no infecciosa (Xu et al., 2024). Este reconocimiento inicial está regulado por los macrófagos y otras células centinela, que cuentan con los PRRs. Así, estos receptores desencadenan cascadas intracelulares como la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés *mitogen-activated protein kinase*), la vía del factor nuclear κ B (NF- κ B, del inglés *nuclear factor κ B*) y la vía de la quinasa Janus/transductor de señales y activador de la transcripción (JAK/STAT, del inglés *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*), que culminan en la translocación nuclear de factores de transcripción para la expresión de mediadores proinflamatorios. A su vez, las células epiteliales dañadas por la inflamación retroalimentan positivamente estas vías, pues liberan citoquinas proinflamatorias que se unen a los PRRs produciendo una amplificación de la inflamación (L. Chen et al., 2017). Algunas de las citoquinas inflamatorias más importantes son la interleucina-1 (IL-1), la IL-6 y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α , del inglés *tumoral necrosis factor α*). Estas citoquinas ejercen un papel clave en la respuesta inmune a la inflamación y su regulación, pues provocan el exudado de fluidos plasmáticos y la migración de leucocitos, principalmente neutrófilos, al lugar de la infección (Turner et al., 2014). De esta manera, se produce la liberación de glóbulos blancos hacia el foco inflamatorio, donde primero se atraen los neutrófilos y después los monocitos, que maduran a macrófagos, linfocitos NK, linfocitos T y células B.

Los neutrófilos se activan al entrar en contacto con los patógenos o gracias a las citoquinas y comienzan a liberar sus gránulos, que contienen enzimas y otras sustancias antibacterianas como especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*), proteinasa 3 o catepsina G (Medzhitov, 2008). Además, actúan como células presentadoras de antígenos para activar los linfocitos T y reclutan a los monocitos y las células dendríticas (L. Chen et al., 2017). Por otro lado, los monocitos maduran a macrófagos, que son primordiales en el proceso de inflamación pues son células fagocíticas y presentadoras de antígenos y pueden regular la respuesta inflamatoria mediante la producción de citoquinas y factores de crecimiento (Mamilos et al., 2023).

Por lo tanto, la inflamación aguda actúa para recuperar la homeostasis, al eliminar los patógenos y regresar al estado basal. No obstante, si el estrés inducido por dichas moléculas patogénicas o dañinas es superior a lo que la respuesta inflamatoria puede combatir, se induce la apoptosis, e incluso la necroptosis si dicho estímulo es aún mayor (Medzhitov, 2008).

Aparte de las citoquinas inflamatorias, existen otros reguladores del proceso de inflamación que actúan como sensores que detectan el daño producido y desencadenan la respuesta del sistema inmune innato. Uno de los sensores más importantes es el inflamasoma, un complejo multiproteico que se ensambla ante situaciones inflamatorias al reconocer daños y lesiones. La formación del inflamasoma implica la transducción intracelular de señales que convergen en proteínas receptor tipo NOD con dominio pirina (NLRP, del inglés *NOD-like receptor pyrin domain-containing*), quienes escinden a la procaspasa-1, activándola a caspasa-1. Esta proteína es responsable de la activación y secreción de las citoquinas IL-1 β e IL-18 y gasdermina D (Namgaladze et al., 2019). Además, la caspasa-1 también puede inducir la piroptosis, un tipo de muerte celular inflamatoria caracterizada por la liberación de la IL-1 α , aunque ésta no necesita ser activada por la caspasa-1, pues ya se encuentra en su forma activa. Esta muerte celular es clave en la eliminación de células infectadas (Q. Zheng et al., 2025).

Hay varias clases de inflamasomas, pero el más estudiado y relevante para este estudio es el inflamasoma NLPR3, conocido por responder ante una gran variedad de estímulos, como variaciones en el calcio intracelular o alteraciones en la mitocondria, entre otros. Este complejo multimolecular está compuesto por varios oligómeros NLRP3, que cuentan con 3 dominios en su estructura: un dominio amino terminal con repeticiones ricas en leucina (LRR, del inglés *leucine-rich repeat*), un dominio pirina y un dominio de unión a nucleótidos y oligomerización (NACHT, del inglés *NAIP, CIITA, HET-E, TPI domain*). Junto a estas proteínas, se encuentra unida la proteína adaptadora de tipo *Speck* asociada a la apoptosis, que contiene un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD, del inglés *caspase recruitment domain*) llamada proteína ASC (del inglés *apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*) y la procaspasa-1, que es reclutada y activada gracias a este dominio CARD (He et al., 2016).

El primer evento necesario para la activación del inflamasoma NLRP3 se conoce como fase de cebado. Como se muestra en la Figura 1, implica la estimulación de los TLRs mediante el reconocimiento de DAMPs o PAMPs, de manera que incrementen la producción de los componentes del inflamasoma, NLRP3, pro-IL1 β y pro-IL18, mediante

la vía NF- κ B (He et al., 2016). El segundo evento, donde se produce la activación y el ensamblaje del inflamasoma, depende de diversos estímulos que aún no se han dilucidado por completo, aunque diversos estudios sugieren varias hipótesis con estímulos comunes. Se sospecha que varios estímulos como la producción de ROS, el daño mitocondrial y lisosomal, cristales y flujos iónicos de K^+ , Ca^{2+} y ATP extracelular están implicados en la activación del inflamasoma NLRP3 (Figura 1). Sin embargo, en este Trabajo Fin de Grado se abordarán aquellos que impliquen la participación del calcio intracelular, por ser el objetivo de este estudio su participación en la regulación de la inflamación.

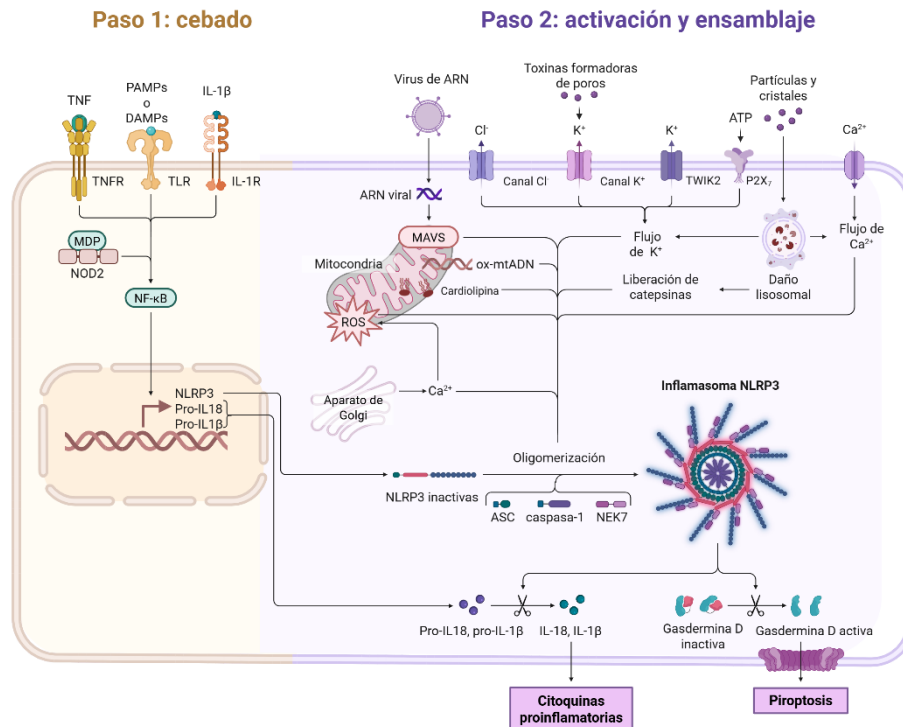


Figura 1. Fases de cebado y activación y ensamblaje del inflamasoma NLRP3. El primer paso de cebado (izquierda) se realiza a través de los receptores de TNF, IL-1 β o TLRs, que son capaces de reconocer TNF, IL-1 β , PAMPs o DAMPs, respectivamente y desencadenar la transcripción de las proteínas NLRP3 y las citoquinas proinflamatorias proIL-1 β y proIL-18 vía NF- κ B. El segundo paso de activación y ensamblaje (derecha), es inducido por varios PAMPs o DAMPs, como partículas y cristales, flujos de ATP, K^+ , de Cl^- y de Ca^{2+} , daño lisosomal, toxinas formadoras de poros, disrupción mitocondrial y la producción de mtROS y liberación de ADN mitocondrial y cardiolipina. Además, también puede activarse mediante ARN viral a través de las proteínas MAVS. El ensamblaje del inflamasoma NLRP3 provoca la activación de la caspasa-1, que escinde a proIL-1 β y proIL-18. Por último, la gasdermina D también es activada por la caspasa-1, insertándose en la membrana plasmática, causando poros y desencadenando así la piroptosis. Adaptado de plantilla de Biorender <https://BioRender.com>

Dado que la producción de ROS se considera uno de los estímulos activadores, la mitocondria se contempla como un orgánulo implicado en el proceso de ensamblaje del inflamasoma, ya que se cree que dicho proceso tiene lugar en ella. Esta hipótesis se apoya en la presencia de cardiolipina en la membrana mitocondrial interna que, tras la activación de los TLRs, se dirige hacia la membrana mitocondrial externa mediante un mecanismo aún desconocido. Allí, se incorpora a las proteínas NLRP3 y promueve la activación de la procaspasa-1. Se cree que el flujo de K^+ y el reclutamiento dependiente de Ca^{2+} de la

proteína adaptadora ASC hacia la mitocondria se lleva a cabo en el primer paso de activación del inflamasoma, pues esta proteína ASC se encuentra dispersa en el citoplasma en estado de reposo (Namgaladze et al., 2019). Además, la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS, del inglés *mitochondrial antiviral signaling protein*) y la mitofusina 2 (Mfn2), junto con la cardiolipina, se consideran proteínas que relacionan el inflamasoma NLRP3 con la mitocondria (X. Zheng et al., 2023). Además, estudios recientes sitúan el ensamblaje del inflamasoma en los sitios de contacto entre el retículo endoplasmático (RE, del inglés *endoplasmic reticulum*) y la mitocondria. En ellos, se comprobó el efecto de inhibidores de la fosfolipasa C, de los canales de calcio dependientes de reservorio (SOC, del inglés *store-operated calcium channels*) y de los receptores de IP₃ (IP₃R, del inglés *IP₃ receptor*), entre otros, que bloquearon el aumento de calcio citosólico, la secreción de IL-1 β , la producción de ROS mitocondrial y la liberación de ADN mitocondrial al citosol (Namgaladze et al., 2019). Esto respalda la idea de la participación del flujo de Ca²⁺ desde el RE a la mitocondria, pues es necesaria su sobrecarga para inducir estrés y producir ROS. Así, se baraja el aumento del flujo de Ca²⁺ hacia la mitocondria en niveles elevados como causa de sobrecarga mitocondrial, originando la producción de ROS debido al desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones y la inducción de la apertura del poro de transición mitocondrial (mPTP, del inglés *mitochondrial permeability transition pore*) (X. Zheng et al., 2023).

Con todo ello, resulta innegable considerar a la mitocondria como un orgánulo clave en la respuesta inmune innata, pues además de su participación en el ensamblaje del inflamasoma como inductor y como plataforma junto con el RE para dicho proceso, también es una fuente de producción de DAMPs debido a su incremento en la permeabilidad en la membrana mitocondrial externa. Así, cuando está bajo estrés o sufre un daño, libera moléculas dañinas como ADN mitocondrial, ROS, ATP, citocromo c o cardiolipina, estimulando la respuesta inmune innata. Además, dicho orgánulo participa en la vía intrínseca de la apoptosis activando la muerte celular programada cuando el daño inducido es irreparable (Xu et al., 2024).

1.2. Papel de los macrófagos en la respuesta inflamatoria

En la respuesta inflamatoria intervienen gran cantidad de células del sistema inmune innato, entre las que se encuentran los macrófagos. Estas células desempeñan un papel clave en la defensa del cuerpo contra patógenos, gracias a la fagocitosis, un proceso en el que los macrófagos son capaces de engullir y eliminar partículas dañinas. Además, estos glóbulos blancos también participan en la regulación de la respuesta inflamatoria y la reparación de tejidos y en el proceso de autofagia (S. Chen et al., 2023).

Tradicionalmente, se creía que los macrófagos provenían únicamente de los monocitos, ya que, durante la inflamación, estas células que se encuentran en la sangre responden a diversos estímulos como el daño tisular y migran hacia el foco inflamatorio, donde se diferencian en macrófagos. Sin embargo, se ha demostrado que éste no es el único origen de los macrófagos, pues también tienen un origen embrionario, conocidos como macrófagos residentes o tisulares (Zhang et al., 2021).

Los macrófagos son conocidos por su gran plasticidad, pues son células que adaptan su fenotipo para responder a los diversos estímulos ambientales. De esta manera, son capaces de polarizarse hacia un fenotipo u otro, convirtiéndose en macrófagos M1 o M2 (Figura 2), característica que se ha evidenciado tanto *in vivo* como *in vitro* e *in vivo*.

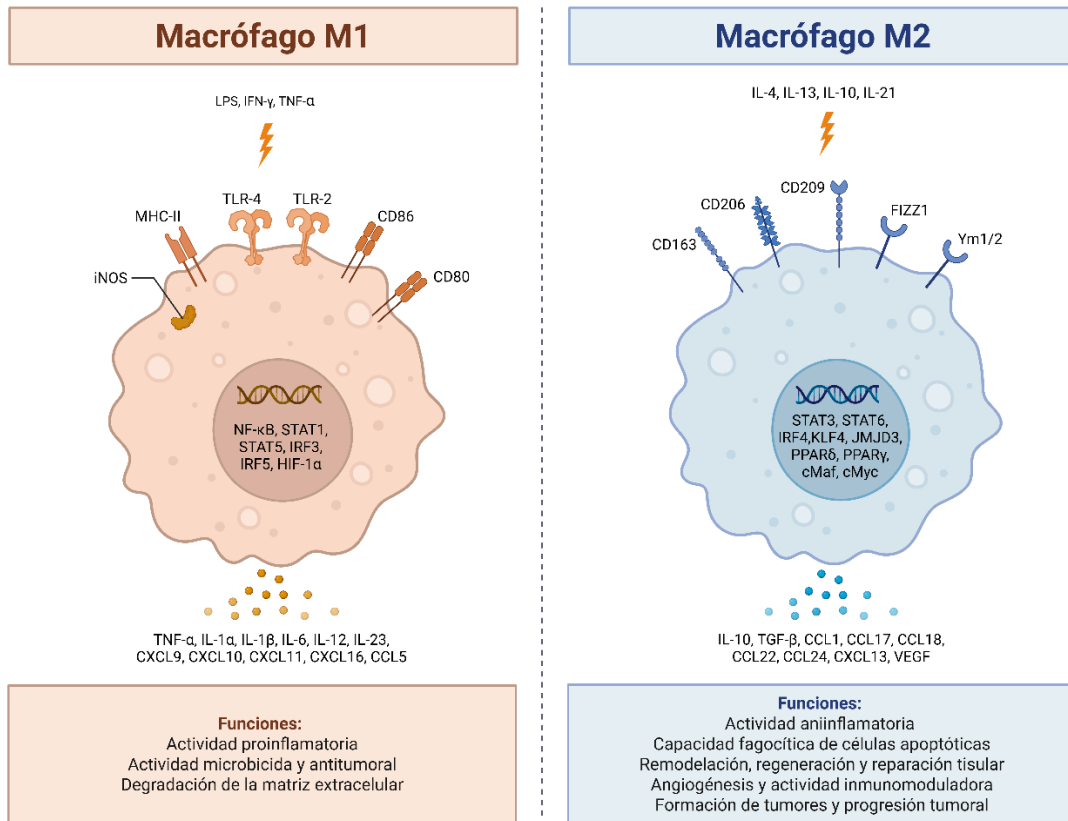


Figura 2. Comparación entre los macrófagos M1 y M2. Los macrófagos M1, en respuesta a señales proinflamatorias como lipopolisacárido (LPS), interferón- γ (IFN- γ) o TNF- α , producen la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α o IL-1 α . Además, se caracterizan por su actividad microbicida y antitumoral y proinflamatoria, así como por la expresión de moléculas como NO sintasa inducible (iNOS), TLRs o el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II), entre otros. En cambio, los macrófagos M2 son inducidos mediante citoquinas como IL-4 o IL-13 y su actividad es de carácter antiinflamatorio. Así, este fenotipo M2 libera citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y también secretan factores como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Asimismo, los macrófagos M2 están implicados en funciones de reparación tisular, fagocitosis de células apoptóticas y progresión tumoral y expresan diferentes marcadores característicos de su fenotipo, como CD163 o CD206. Adaptado de plantilla de Biorender <https://BioRender.com>

Los macrófagos activados de forma clásica o M1, descritos en la Figura 2, están mejor caracterizados, pues son las típicas células fagocíticas que participan en la respuesta inmune innata. Uno de los activadores principales de este fenotipo es el interferón γ (IFN- γ , del inglés *interferon γ*), una citoquina proinflamatoria sintetizada por linfocitos NK y T. Una vez estos macrófagos se activan, secretan a su vez citoquinas inflamatorias como TNF- α , que retroalimenta positivamente la polarización hacia el fenotipo M1, pues es un activador de macrófagos. Esta citoquina también participa en procesos inflamatorios y desencadena el inicio de la apoptosis (S. Chen et al., 2023). Este fenotipo M1 realiza numerosas funciones como la eliminación de patógenos y tumores o la síntesis de NO,

pues cuenta con la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, del inglés *inducible nitric oxide synthase*), que produce NO y citrulina a partir de arginina. Además, también son células presentadoras de antígenos y secretan varias citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 e indirectamente IL-17, estando esta última interleucina relacionada con la inducción del proceso de inflamación. De hecho, también participan en la destrucción de la matriz extracelular y la reorganización tisular del tejido dañado pues secretan enzimas degradadoras como las metaloproteinasas de la matriz extracelular (Mamilos et al., 2023; Yao et al., 2019).

Por otro lado, los macrófagos activados de forma alternativa o M2, descritos en la Figura 2, requieren la exposición a IL-4 o IL-13 para activarse, que antagonizan la acción de IFN- γ . Al contrario que el fenotipo M1, éstos participan en funciones antiinflamatorias, pues liberan citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y en funciones de reparación tisular, como la fagocitosis de células apoptóticas o restos celulares o la remodelación de la matriz extracelular mediante la secreción de factores de crecimiento y proteasas. Asimismo, también se encargan de realizar funciones inmunoreguladoras (S. Chen et al., 2023). A su vez, se dividen en cuatro subpoblaciones, los macrófagos alternativamente activados (M2a), M2b, M2c y M2d o macrófagos asociados a tumores. Los macrófagos M2a producen citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y los antagonistas de los receptores de IL-1, inhibiendo así la acción de IL-1, de carácter proinflamatorio. Además, son incapaces de producir NO, pues cuentan con la enzima arginasa, que genera urea y ornitina a partir de arginina, al contrario que la iNOS. Por otro lado, los macrófagos M2b son más similares a los M1 pues producen citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 e IL-16 y son capaces de sintetizar NO. Éstos se activan por la exposición de inmunocomplejos de inmunoglobulinas G. Los macrófagos M2c son activados por glucocorticoides, IL-10 o factor de crecimiento transformante β (TGF- β , del inglés *transforming growth factor β*). Se encargan de funciones inmunosupresoras y reparadoras de la matriz extracelular, así como de la remodelación del tejido. Producen, a su vez, IL-10 y TGF- β , reforzando su activación. Por último, los macrófagos M2d son aquellos macrófagos que son reclutados por las células tumorales y el microambiente tumoral. Se caracterizan por la supresión de la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α y la estimulación de la producción de citoquinas antiinflamatorias y factores proangiogénicos como IL-10 o el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *vascular endothelial growth factor*) (Mamilos et al., 2023; Yao et al., 2019).

Teniendo en cuenta estas características, lo que ocurre en organismos vivos durante la inflamación es la eliminación de los patógenos y tumores y posterior destrucción de la matriz extracelular y el tejido dañado, llevado a cabo por los macrófagos M1 y, a continuación, se produce su polarización a macrófagos M2, que reparan el tejido dañado y lo remodelan para revertir el proceso inflamatorio. Resulta relevante destacar las características metabólicas que presentan los macrófagos, pues el fenotipo M1 utiliza tanto la glucólisis como la ruta de las pentosas fosfato como fuentes de energía, donde su ciclo del ácido tricarbóxico (TCA, del inglés *tricarboxylic acid cycle*) es interrumpido en dos puntos, resultando en la acumulación de succinato e itaconato. La fosforilación

oxidativa, sin embargo, está poco activa, al contrario que en los macrófagos M2, donde su actividad está altamente elevada y mantienen el TCA intacto (Mamilos et al., 2023).

Los macrófagos son de gran relevancia en este estudio pues participan en el ensamblaje y activación del inflammasoma NLRP3, induciendo la respuesta inflamatoria con el objetivo de reparar el daño y restaurar la homeostasis. Esta activación se desencadena por señales como el flujo de calcio intracelular o el estrés mitocondrial, como ya se describió en el apartado anterior. En este contexto, la activación del inflammasoma NLRP3 en macrófagos favorece la secreción de citoquinas inflamatorias y la polarización hacia su fenotipo M1, reforzando la eficacia de una respuesta inmune innata. Debido a ello, este estudio se llevó a cabo en macrófagos murinos procedentes de la línea celular RAW 264.7, para estudiar la influencia del calcio en la activación de la respuesta inflamatoria.

Las células RAW 264.7 son células similares a macrófagos derivadas de la ascitis de un ratón macho con un tumor inducido por el virus de la leucemia murina de Abelson. Constituyen un modelo muy apropiado para el estudio de los macrófagos. Normalmente se describen como más similares al fenotipo M1, pues son capaces de incrementar la producción de NO y realizar la fagocitosis cuando se estimulan con DAMPs como el lipopolisacárido (LPS) (Fuentes et al., 2014). Además, su estabilidad funcional ha sido estudiada ampliamente y permanecen estables hasta el pasaje número 30 aproximadamente (Taciak et al., 2018). En suma, estas células son adecuadas para el estudio de la inflamación al pertenecer a una línea murina debido a la similitud con los humanos (Riastri et al., 2023).

1.3. Homeostasis del calcio intracelular y su participación en la respuesta inflamatoria

El calcio es un segundo mensajero crucial muy versátil en numerosos procesos celulares como la contracción muscular, la supervivencia celular, la regulación de enzimas, el metabolismo, la transcripción de genes y la activación del sistema inmune (Görlach et al., 2015). Las concentraciones de este ion en el citoplasma de células de mamíferos suelen ser de 100 nM, mientras que en el medio extracelular es 2 mM aproximadamente (Clapham, 2007). De esta manera, el calcio regula todos estos procesos mediante variaciones en su concentración en el citosol, que pueden provenir de su liberación procedente de diversos reservorios celulares o del flujo de calcio que proviene del medio extracelular (Putney, 2010). El incremento del flujo de calcio puede provocar concentraciones de 1 μ M o mayores (de Souza & Ambudkar, 2014).

Los flujos de calcio se regulan mediante la entrada de calcio extracelular a través de diversos canales localizados en la membrana plasmática y también aquellos situados en los diferentes reservorios intracelulares, como la mitocondria o el RE, que median la salida del calcio almacenado al citosol. Lógicamente, estos canales introducen calcio a la célula de forma pasiva, ya que no requieren energía, al contrario que las bombas de calcio ATPasas y los intercambiadores, que lo expulsan al exterior en contra de gradiente con gasto de ATP (Görlach et al., 2015). Por tanto, se pueden clasificar en dos grupos teniendo en cuenta aquellos canales que incrementan la concentración de calcio citosólico y aquellos que surten el efecto contrario, mostrados en la Figura 3.

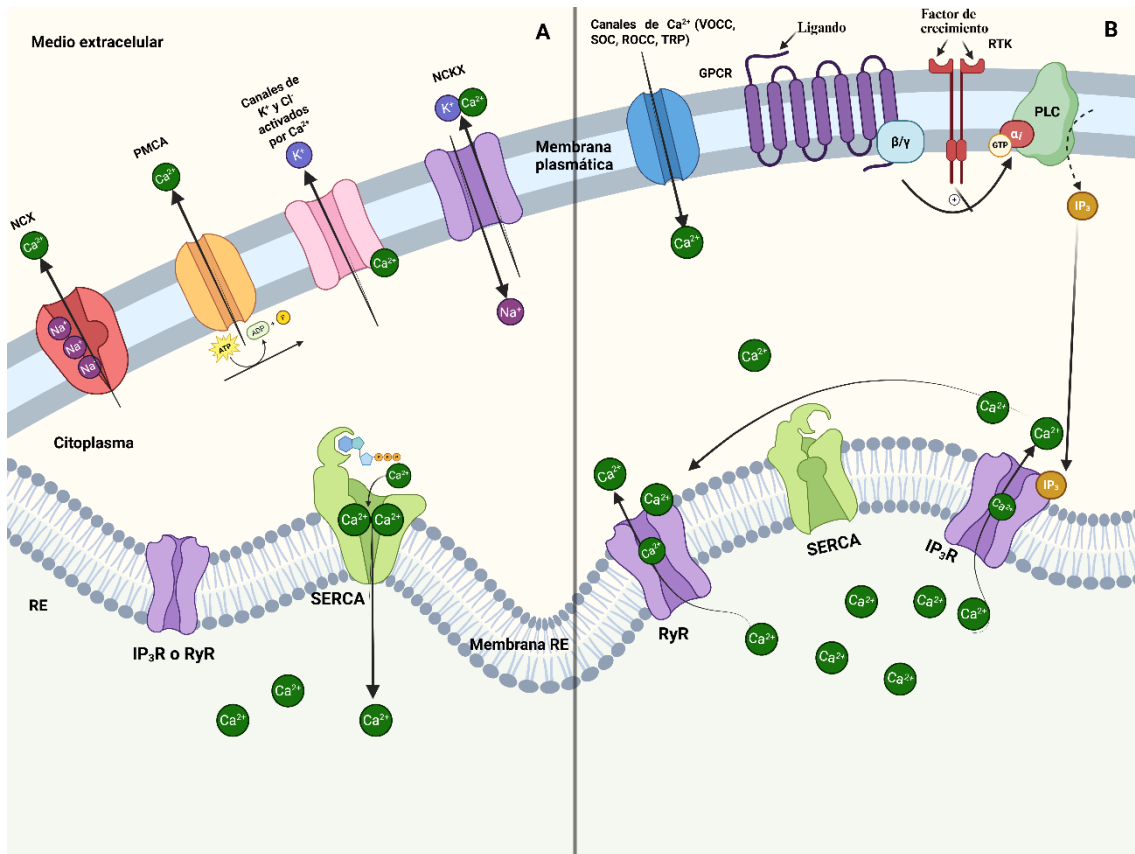


Figura 3. Principales mecanismos que regulan la homeostasis del calcio en el citosol. (A) Mecanismos que disminuyen el nivel de Ca^{2+} citosólico y canales, intercambiadores y bombas de extrusión de Ca^{2+} localizadas en la membrana plasmática: cotransportador de K^+ - Ca^{2+} / Na^+ (NCKX), intercambiador Na^+ / Ca^{2+} (NCX), ATPasas de Ca^{2+} en la membrana plasmática (PMCA) y en los reservorios intracelulares como el RE (SERCA). (B) Mecanismos que aumentan el nivel de Ca^{2+} citosólico: los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VOCC), los canales de Ca^{2+} dependientes de reservorio (SOC), los canales de Ca^{2+} de potencial receptor transitorio (TRP), los canales de Ca^{2+} operados por receptor (ROCC) y los canales de calcio activados por segundos mensajeros (SMOC) como los receptores de rianodina (RyR) y los receptores de IP_3 (IP_3R) situados en reservorios intracelulares como el RE. Estos segundos mensajeros que provocan su activación se sintetizan tras la activación de receptores como los de tirosina-quinasa (RTK) o los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Adaptación de Clapham et al., 2007. Creado con Biorender <https://BioRender.com>.

En el primer grupo se encuentran los canales de calcio operados por voltaje (VOCC, del inglés *voltage-operated calcium channels*), los canales de calcio operados por receptor (ROCC, del inglés *receptor-operated calcium channels*), los canales de calcio activados por segundos mensajeros (SMOC, del inglés *second messenger operated channels*), los canales SOC y los mecanismos presentes en los reservorios (mitocondria, RE, lisosomas, aparato de Golgi y núcleo) para liberar el calcio (Clapham, 2007). En el segundo grupo se engloban las Ca^{2+} -ATPasas de la membrana plasmática (PMCA, del inglés *plasma membrane calcium ATPase*), los intercambiadores de calcio como el intercambiador Na^+ / Ca^{2+} (NCX, del inglés *sodium calcium exchanger*) y los mecanismos presentes en los reservorios para recaptar el calcio como la bomba Ca^{2+} -ATPasa del RE (SERCA, del inglés *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*) o el uniportador de calcio mitocondrial (mCU, del inglés *mitochondrial calcium uniporter*) (Sánchez Salguero, 2016).

Los canales VOCC responden ante una despolarización de la membrana plasmática, por ello están presentes en su mayoría en células excitables como neuronas. En mamíferos se han identificado unos 10 miembros, que se agrupan en diferentes familias (Ca_v1 , Ca_v2 , Ca_v3). A su vez, se agrupan en diversas clases como L, de activación lenta pero duradera, que participan en el acoplamiento excitación-contracción en las células de músculo esquelético, cardíaco y liso; T, de activación transitoria y N, P/Q y R, que participan en la liberación de neurotransmisores. Tanto los canales tipo L como N, P/Q y R están implicados en la homeostasis de calcio intracelular, permitiendo una entrada rápida y excesiva de dicho ion al medio intracelular (Catterall, 2011). Por otro lado, los canales ROCC se activan por la unión de un ligando agonista en la cara extracelular del receptor como, por ejemplo, los receptores nicotínicos de acetilcolina. La unión del ligando provoca un cambio conformacional en el receptor permitiendo la apertura del canal, que permite el paso del calcio, entre otros cationes (Fucile, 2004). A diferencia de los ROCC, los canales SMOC se abren en respuesta a segundos mensajeros como IP_3 , AMP cíclico (AMPc) o diacilglicerol (DAG), o incluso el calcio por sí mismo. Ejemplos de esta clase de canales serían los IP_3R s o los receptores de rianodina (RyR, del inglés *ryanodine receptor*), presentes en la membrana del RE principalmente (Prole & Taylor, 2019). La activación de estos canales se inicia de forma indirecta mediante estímulos extracelulares como hormonas o factores de crecimiento, que actúan sobre receptores acoplados a proteínas G, que dan lugar a la producción de segundos mensajeros mediante vías como la fosfolipasa C. Estos segundos mensajeros sí se unen a estos receptores intracelulares, como los IP_3R . Esta unión desencadena la liberación de calcio desde el RE hacia el citosol gracias a la apertura del canal. Asimismo, cabe destacar a los canales de potencial receptor transitorio (TRP, del inglés *transient receptor potential*), cuya clasificación en un grupo u otro ha sido objeto de discordia a lo largo de los años. Se caracterizan por formar un poro selectivo para el paso de los cationes Ca^{2+} y Na^+ al medio intracelular. Tienen la capacidad de responder ante estímulos muy diversos como el dolor, el frío o el vaciamiento de los canales de calcio de reservorios intracelulares. Se clasifican en diferentes subfamilias como canónicos (TRPC, del inglés *transient receptor potential canonical*) o vaniloides (TRPV, del inglés *transient receptor potential vanilloid*) (Jiménez & Mora, 2020).

Por último, los canales SOC, mostrados en la Figura 4, son los más relevantes en este estudio pues son aquellos canales que se activan en respuesta al vaciamiento del calcio almacenado en el RE, debido a la acción de segundos mensajeros como el IP_3 . También pueden ser activados por la acción de agentes farmacológicos como la taspigargina (Tg), un inhibidor selectivo de la SERCA (Jaskulska et al., 2021), o la ionomicina, un ionóforo de calcio. De esta forma, los canales SOC aseguran una concentración constante de calcio en el RE, necesaria para la activación de diversas vías intracelulares que participan en la síntesis de proteínas. Su estructura, como aparece representada en la Figura 4, se compone de subunidades de proteínas Orai (Orai1, Orai2, Orai3) que forman el canal y constan de cuatro dominios transmembrana. Ambos extremos amino y carboxilo están orientados hacia el lado citosólico, donde albergan los sitios de unión para las proteínas interactuadoras del estroma (STIM, del inglés *stromal interaction molecules*) 1 y 2.

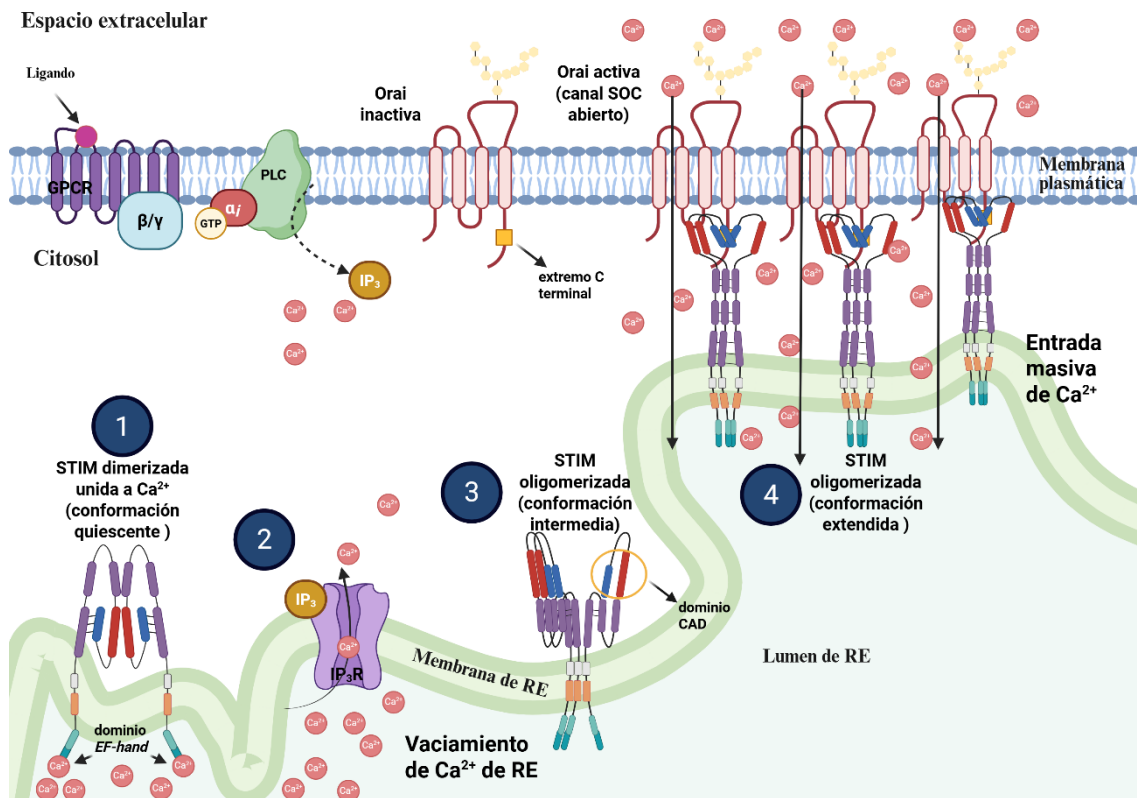


Figura 4. Mecanismo molecular de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC. (1) El RE se encuentra repleto de Ca^{2+} ya que es su principal reservorio, por ello las proteínas STIM se encuentran dimerizadas mediante sus dominios citosólicos, en conformación quiescente, pues están unidas al Ca^{2+} mediante su dominio *EF-hand*. (2) Mediante la estimulación de GPCR gracias a un ligando, se produce GTP, que provoca la disociación de la subunidad $\text{G}\alpha$ y posterior unión a la fosfolipasa C (PLC). Ello desencadena la producción del segundo mensajero IP_3 , que se dirige a su receptor (IP_3R) en la membrana del RE, provocando la apertura del canal y salida de Ca^{2+} , causando el vaciamiento o depleción del RE. (3) La disociación del Ca^{2+} de los dominios *EF-hand* de las proteínas STIM origina un cambio de conformación que provoca la interacción entre sus dominios citosólicos y su posterior extensión, formando así oligómeros (conformación intermedia). (4) A continuación, las proteínas STIM oligomerizadas se dirigen hacia la membrana plasmática, donde se unen mediante su dominio CAD al extremo C terminal citosólico de las proteínas Orai. Esta interacción provoca la activación de las proteínas Orai y apertura de los canales SOC, permitiendo la entrada masiva de Ca^{2+} desde el medio extracelular, para revertir la pérdida de este ion. Adaptación de Y.-F Chen et al., 2013 y Noble et al., 2020. Creado con Biorender <https://BioRender.com>

Las proteínas STIM funcionan como un sensor de los niveles de calcio en el RE y su extremo amino terminal se sitúa en el lumen del RE, donde cuenta con un dominio *EF-hand* de unión al calcio. Con este mecanismo, cuando se produce la depleción de calcio del RE, el dominio *EF-hand* se disocia del calcio, provocando un cambio conformacional de las proteínas STIM que se translocan hacia la membrana plasmática como oligómeros. Allí, las proteínas STIM se encuentran con las proteínas Orai, que conforman los canales SOC, y se unen a su extremo carboxilo terminal citosólico mediante su dominio activador de CRAC (CAD, del inglés *CRAC activation domain*). La unión de las proteínas STIM a las proteínas Orai activa la apertura de los canales SOC, por los que comienza la entrada masiva de calcio hacia el interior celular. Sin embargo, cuando los niveles de calcio son basales, las proteínas Orai se encuentran desacopladas en la membrana plasmática y las proteínas STIM libremente situadas por la membrana del RE en forma

de dímeros. Lógicamente, para que este mecanismo surta efecto y las proteínas STIM y Orai puedan acoplarse, debe suceder en zonas donde la membrana plasmática y el RE estén próximos entre sí, como se muestra en la Figura 4 (Y.-F. Chen et al., 2013; Noble et al., 2020; Putney, 2010; Tiffner et al., 2021). Además, también la mitocondria juega un papel muy importante en la regulación de estos canales, como se explicará más adelante. En cuanto al incremento de calcio procedente de la liberación de reservorios intracelulares, ésta se produce, en su mayoría, a través de los canales regulados por los IP₃Rs y los RyRs (Prole & Taylor, 2019). El retículo endoplasmático, o sarcoplásmico en el caso de las células musculares, es el mayor reservorio intracelular de calcio. En él, la liberación de calcio es llevada a cabo a través de los IP₃Rs y los RyRs, que se activan en respuesta a estímulos externos por parte de receptores tirosina quinasa o acoplados a proteínas G, presentes en la membrana plasmática. Éstos activan la fosfolipasa C, quien produce IP₃. Este segundo mensajero difunde al interior celular hasta alcanzar el RE y activar a su receptor, IP₃R. Esta unión provoca un cambio conformacional y como resultado su apertura, produciéndose una salida de calcio al citosol (Shah et al., 2015; Takeshima et al., 2015). Cabe destacar que, aunque los IP₃Rs dependen de IP₃ para abrirse, su activación depende de la concentración de calcio que haya en el citosol. Sin embargo, los RyRs pueden ser activados solo en presencia de calcio (Lanner et al., 2010). Por otro lado, el RE capta calcio desde el citosol empleando una bomba Ca²⁺-ATPasa, la SERCA, lo que conlleva gasto de energía (Sánchez Salguero, 2016).

En cuanto a la mitocondria, ésta constituye un reservorio temporal de calcio pues puede captarlo a través del mCU, un canal muy selectivo. También cuenta con RyRs y la captación en modo rápido (RaM). Como hemos mencionado anteriormente, juega un papel muy importante en la regulación de la concentración citosólica de calcio. Asimismo, cuando la mitocondria requiere liberar el calcio rápidamente, lo logra mediante los intercambiadores Na⁺/Ca²⁺ y H⁺/Ca²⁺, que expulsan calcio a través de la membrana mitocondrial interna y externa a cambio de sodio y protones. Además, la mitocondria puede abrir el mPTP, un canal localizado entre las membranas mitocondriales externa e interna. El mPTP está conformado por varias proteínas como la hexoquinasa, los canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC, del inglés *voltage-dependent anion channels*), el translocador de nucleótidos de adenina (ANT, del inglés *adenine nucleotide translocator*) y la ciclofilina D (Cyp D, del inglés *cyclophilin D*). Este canal cuenta con sitios de unión al calcio en el lado de la membrana mitocondrial interna para regular su apertura, que permite la salida de calcio y otras sustancias. El mPTP es muy sensible al pH, de manera que, a pH muy alcalinos, debido a la actividad excesiva de la cadena transportadora de protones estimulada por el calcio, se induce su apertura y se acidifica la matriz extracelular. Este canal permanece abierto hasta que se restablece el potencial de membrana y es entonces cuando se vuelve a cerrar. Sin embargo, su apertura de forma permanente debido a una sobrecarga de calcio está involucrada en la patogénesis de diversas enfermedades (de Ridder et al., 2023). No obstante, la actividad más importante que realiza la mitocondria en referente al calcio se debe a su función como compartimento acumulador de este ion de forma temporal. Este orgánulo es capaz de detectar incrementos en la concentración de calcio citosólica y captarlo en su interior

rápidamente para luego liberarlo de forma más lenta cuando sea necesario. Por tanto, puede contribuir al relleno de calcio del RE tras su vaciamiento, pues el calcio liberado por la mitocondria es captado por la bomba SERCA (Sánchez Salguero, 2016).

En cuanto a la participación de la mitocondria en la regulación de la entrada de calcio en los canales SOC, dicho orgánulo se encarga de captar parte del calcio liberado desde el RE al citosol. Gracias a su acción, su concentración en el citosol no se incrementa excesivamente, por lo que los canales SOC se mantienen abiertos y los IP₃Rs activos, favoreciendo una entrada sostenida de calcio. Sin embargo, cuando los niveles de calcio en el interior de la mitocondria son muy elevados, ésta pierde la capacidad de continuar captando calcio, de forma que se inactiva lentamente este mecanismo (Nan et al., 2021).

La importancia de los reservorios de calcio intracelular, así como de su comunicación, queda de manifiesto en los sitios de contacto entre el RE y la mitocondria, conocidos como membranas asociadas a mitocondrias (MAMs, del inglés *mitochondria-associated membranes*), como se muestran en la Figura 5. Se trata de regiones especializadas donde la membrana del RE está estrechamente próxima a la membrana externa mitocondrial. Aparte de su papel como plataforma de ensamblaje para el inflammasoma NLRP3, los MAMs también participan en la regulación de la homeostasis del calcio, la autofagia, la apoptosis y las respuestas al estrés del RE, entre otras funciones. Gracias a su localización clave, actúan como centros de integración entre el estrés del RE, la sobrecarga mitocondrial y la activación de la respuesta inflamatoria (Missiroli et al., 2018). Como se mencionó anteriormente, el flujo de calcio entre el RE y la mitocondria a través de los MAMs es un proceso clave en la regulación de la homeostasis celular. El flujo de calcio viaja desde el IP₃R en el RE hacia los canales VDAC presentes en la membrana mitocondrial externa, gracias a la proteína adaptadora llamada proteína regulada por glucosa de 75 kDa (GRP75). Las proteínas que se encargan de su regulación son la Mfn2, el receptor sigma 1, la proteína regulada por glucosa de 78 kDa (GRP78) o BiP y la policisteína 2 (Namgaladze et al., 2019; Xia et al., 2019). Esta entrada de calcio a la mitocondria permite la activación de enzimas clave en el metabolismo energético mitocondrial. Sin embargo, cuando se alcanzan niveles muy elevados de calcio en la mitocondria, se genera una sobrecarga que resulta en la producción de ROS e incluso en la activación del mPTP. Todo ello desencadena la liberación de DAMPs por parte de la mitocondria, activando así una respuesta inflamatoria (Missiroli et al., 2018). Asimismo, los MAMs ofrecen cabida a algunos sensores de la vía de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, del inglés *unfolded protein response*), que se activa en situaciones de estrés del RE, aunque también por señales mitocondriales. El objetivo de esta vía es restaurar la homeostasis mediante la detención temporal de la traducción y la eliminación de proteínas mal plegadas. Sin embargo, si las condiciones de estrés son prolongadas y excesivas y la célula no resuelve el estrés, el RE se ve obligado a inducir la muerte celular programada.

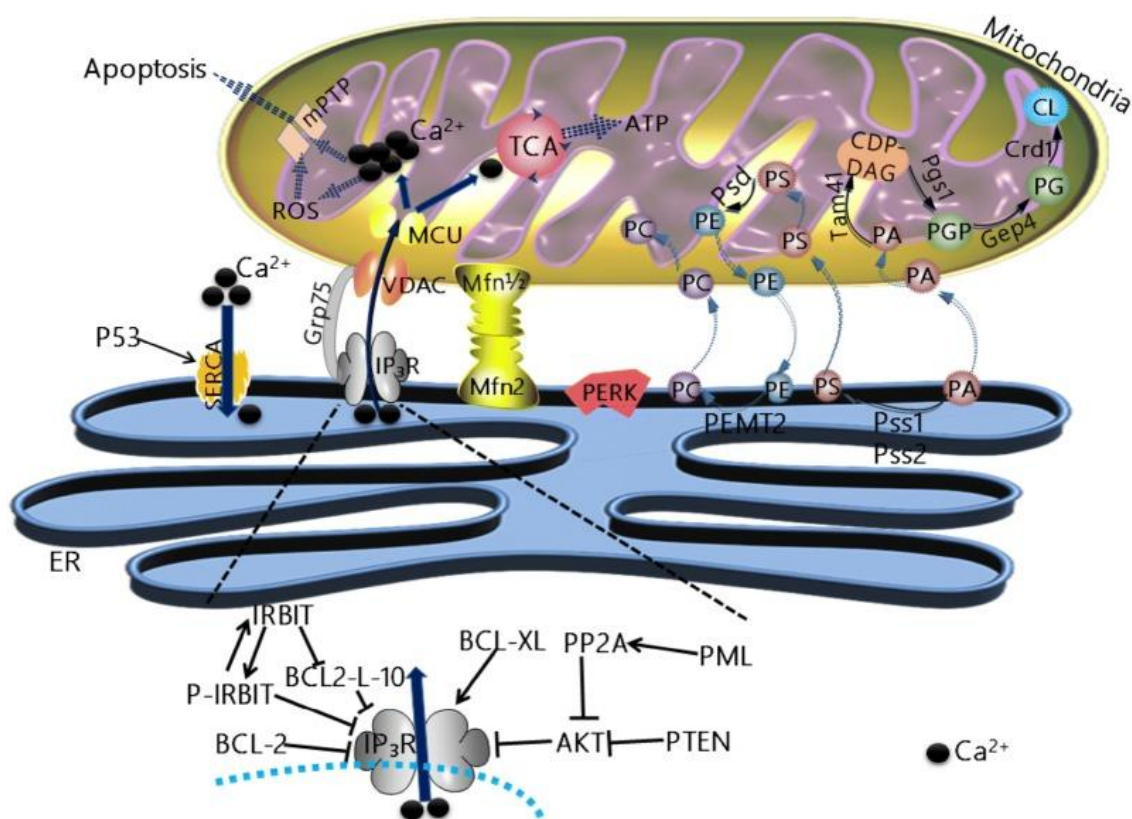


Figura 5. Representación esquemática de la interacción entre el RE y la mitocondria en los sitios de contacto MAMs. El Ca^{2+} es liberado a través de los IP_3Rs en el RE hacia la mitocondria a través de los canales VDAC, que le permiten atravesar la membrana mitocondrial externa, y a través del mCU, para atravesar la membrana mitocondrial interna. Esto se consigue gracias a la proteína regulada por glucosa de 75 kDa (GRP75), que conecta los IP_3Rs con los canales VDAC, y gracias a Mfn2, situada en el RE, que interactúa con Mfn1 o 2 en la membrana mitocondrial externa, regulando la conexión entre ambos orgánulos. La presencia de Ca^{2+} en la mitocondria es fundamental debido a la estimulación que ejerce en el TCA y en la fosforilación oxidativa para producir ATP. Sin embargo, niveles elevados de dicho ion pueden desencadenar estrés oxidativo (ROS) y la apertura del mPTP, promoviendo la apoptosis. Asimismo, existen muchos mecanismos reguladores clave de IP_3R , como BCL-2, IRBIT, AKT y PML. En paralelo se representa el tráfico de fosfolípidos como fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS) y ácido fosfatídico (PA) entre ambos orgánulos, mediado por enzimas como la fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa 2 (PEMT2), la fosfatidilserina sintetasa 1 (Pss1) y 2 (Pss2) o la proteína de ensamblaje y mantenimiento del translocador 41 (Tam41). Este transporte es fundamental para la síntesis de cardiolípidos (CL), un componente esencial de la membrana mitocondrial interna. Por último, la proteína PKR similar a la quinasa del RE (PERK), activada por estrés, y la proteína p53, conocida como el guardián del genoma, mantienen el equilibrio entre la supervivencia y la muerte celular. Adaptado de Xia et al., 2019.

Tanto el RE como la mitocondria participan activamente en el metabolismo de los lípidos, pues el RE es un orgánulo que se encarga del plegamiento de los complejos lipídicos y también regula los niveles de colesterol, y la mitocondria aporta la energía necesaria para ello. No obstante, un mal funcionamiento de los MAMs puede alterar la homeostasis del calcio o del metabolismo lipídico y plegamiento proteico, activando la vía UPR (Namgaladze et al., 2019). La activación de esta vía depende de la proteína 1 α dependiente de inositol (IRE1 α , del inglés *inositol-requiring enzyme 1 α*), del factor activador de la transcripción 6 (ATF6, del inglés *activating factor 6*) y la proteína quinasa activada por ARN bicatenario (PKR, del inglés *protein kinase dsRNA activated*) similar

a la quinasa del retículo endoplasmático (PERK, del inglés *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*), que actúan como sensores de los niveles de estrés en el RE. En estado basal, estos sensores se encuentran unidos a la chaperona GRP78/BiP, que los regula negativamente. Ante señales de estrés en el RE, estos sensores se disocian de la GRP78, activándose y provocando la expresión de factores inhibitorios de la síntesis de proteínas, restableciendo la homeostasis celular. Sin embargo, en situaciones patológicas, ante la sobrecarga de ácidos grasos saturados o de colesterol, se origina un gran estrés en el RE, desencadenando la activación de esta vía mediante cascadas intracelulares a través de la vía MAPK, la vía de la quinasa N-terminal de c-Jun (JNK, del inglés *c-Jun N-terminal kinase*) o la vía del NF- κ B (Grootjans et al., 2016).

1.4. Papel del calcio en el metabolismo energético

El metabolismo energético hace referencia al conjunto de reacciones químicas que suceden en el interior de una célula como medio para obtener y utilizar energía (Liu et al., 2025). Cualquier organismo vivo requiere energía de forma continua para mantener su correcto funcionamiento y para realizar todas las tareas que lleva a cabo, como el transporte activo de moléculas, la replicación, la degradación, la síntesis de nuevas moléculas, etc. De esta forma se garantizan su crecimiento, mantenimiento y función. El metabolismo se produce a través de diversas rutas que tienen lugar en diferentes orgánulos de la célula. Estas rutas metabólicas se clasifican en procesos catabólicos, de degradación de complejos y moléculas para obtener energía; y en procesos anabólicos, que emplean esa energía para la construcción de un amplio abanico de biomoléculas (Mesquita & Rodrigues, 2018). No es de extrañar que la mitocondria desenvuelva un papel central en todo este proceso, pues este orgánulo mantiene la homeostasis celular, pero también participa en el proceso de activación de la respuesta inflamatoria, la autofagia y la apoptosis y en la respuesta al estrés (de Ridder et al., 2023).

La ruta catabólica más relevante para este Trabajo Fin de Grado es la obtención de energía a partir de la glucosa procedente de la degradación del glucógeno y otros compuestos. Este proceso se conoce como glucólisis y tiene lugar en el citosol, como se muestra en la Figura 6. En él, cada molécula de glucosa, mediante un conjunto de diez reacciones, se convierte en dos moléculas de piruvato. A continuación, el piruvato se convierte en acetil-CoA y es entonces cuando puede difundir hacia la mitocondria. En concreto, en la mitocondria tiene lugar la fosforilación oxidativa y el conocido TCA o ciclo de Krebs. En dicho ciclo, en condiciones aerobias, los productos de la glucólisis, es decir, el piruvato convertido a acetil-CoA, se oxida para generar moléculas reductoras, NADH y FADH₂, entre otros productos. Estas moléculas constituyen el poder reductor necesario para la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa (Judge & Dodd, 2020; Liu et al., 2025).

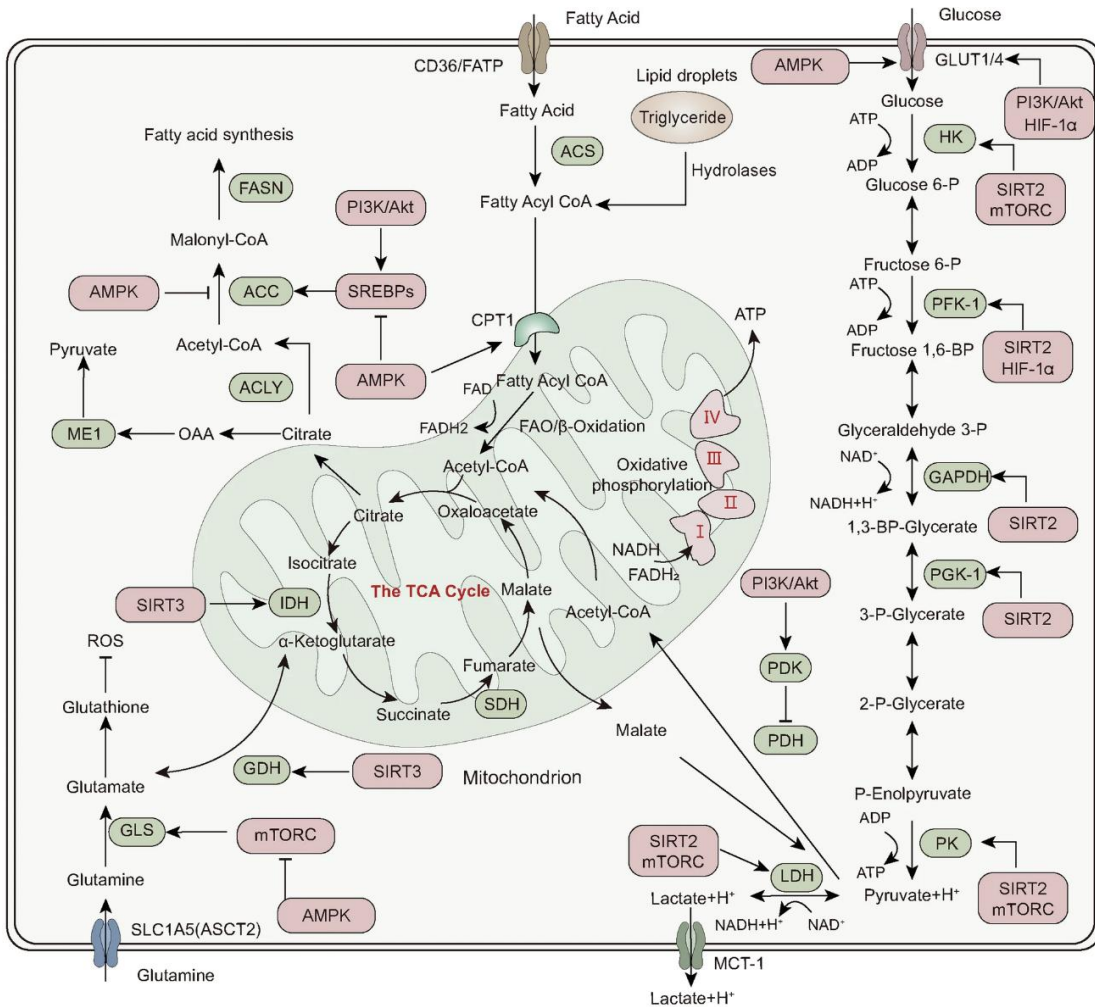


Figura 6. Representación esquemática de rutas metabólicas clave y su regulación mitocondrial en células eucariotas. Este esquema muestra la integración de rutas metabólicas centrales como la glucólisis, el TCA, la β -oxidación de ácidos grasos o el metabolismo de la glutamina, junto con sus mecanismos de regulación. La glucosa ingresa en la célula a través del transportador GLUT1/4 y es degradada a piruvato mediante la glucólisis. A continuación, el piruvato puede ser reducido a lactato mediante la lactato deshidrogenasa (LDH) en condiciones anaerobias o puede ser transportado a la mitocondria para convertirse en acetyl-CoA en condiciones aerobias mediante la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH). A su vez los ácidos grasos, una vez ingresan en la célula, son activados por la acil-CoA sintetasa y penetran en la mitocondria, donde se oxidan mediante la β -oxidación de ácidos grasos, generando $FADH_2$ y $NADH$ para la fosforilación oxidativa. Todas las rutas convergen en el ciclo TCA, que oxida acetyl-CoA generando poder reductor para la cadena transportadora de electrones (complejos I-IV). El metabolismo de la glutamina también contribuye en esta ruta pues la glutamina se convierte a α -cetoglutarato, que ingresa en el ciclo TCA. Todo este proceso está regulado por distintas proteínas como mTORC, AMPK o la vía PI3K/Akt, que adaptan el metabolismo según el estado energético de la célula y su disponibilidad de nutrientes. También es regulado por enzimas como PDH, isocitrato deshidrogenasa (IDH) y succinato deshidrogenasa (SDH). Adaptado de Liu et al., 2025.

La fosforilación oxidativa es un proceso que engloba la cadena transportadora de electrones y la producción de ATP mediante la enzima ATP sintasa, ambas situadas en la membrana mitocondrial interna, como aparece en la Figura 6. La cadena transportadora de electrones es un conjunto de complejos que se encargan de transmitir los electrones por una serie de componentes hasta su aceptor final, el oxígeno, formando agua como producto final. A medida que los electrones van circulando a través de los complejos,

cómo se van reduciendo, van disminuyendo su potencial de energía. Los complejos emplean esta energía para bombear protones al espacio intermembrana de la mitocondria, salvo el complejo II. De esta manera, se genera una gran concentración de protones en el espacio intermembrana que produce la alcalinización de la matriz mitocondrial. Este gradiente electroquímico constituye la fuerza motriz empleada por la ATP sintasa para producir ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi) mediante el regreso de protones a la matriz mitocondrial (Judge & Dodd, 2020; Liu et al., 2025).

En condiciones anaerobias, el piruvato generado en la glucólisis no puede entrar al TCA. Por tanto, en un intento de asegurar la producción continua de energía, el piruvato se convierte en productos finales que permitan la generación de poder reductor, como la fermentación láctica, en la que da lugar a lactato, como se muestra en la Figura 6 (Liu et al., 2025), o la alcohólica, en la que se convierte en etanol (Judge & Dodd, 2020).

Una vez más, el calcio guarda una estrecha relación con el metabolismo pues este segundo mensajero estimula directamente la actividad de la ATP sintasa y la cadena transportadora de electrones en concentraciones del orden μM (de Ridder et al., 2023). Pero, sobre todo, el papel más importante del calcio respecto al metabolismo celular es la estimulación de la actividad mitocondrial. Esta molécula es capaz de controlar la actividad de la piruvato deshidrogenasa (PDH, del inglés *pyruvate dehydrogenase*), la isocitrato deshidrogenasa (IDH, del inglés *isocitrate dehydrogenase*) y la α -cetoglutarato deshidrogenasa (α -KGDH, del inglés *α -ketoglutarate dehydrogenase*), enzimas pertenecientes al TCA. La PDH es un complejo multienzimático que comprende a las enzimas piruvato deshidrogenasa, dihidrolipoil transacetilasa y dihidrolipoil deshidrogenasa. Básicamente se encargan de transformar el piruvato en acetil-CoA. Este complejo proteico está regulado negativamente por los productos de la glucólisis y también por su estado fosforilado. Sin embargo, el calcio provoca la actividad de las fosfatasa, que liberan al complejo PDH de su represión. Asimismo, el calcio también controla la actividad de la enzima IDH, una enzima alostérica encargada de la descarboxilación del isocitrato en α -cetoglutarato. Está regulada negativamente por los ratio ATP/ADP y NADH/NAD⁺, ya que si se incrementan significa que la célula dispone de energía suficiente. Además, el ratio ATP/ADP controla la unión del calcio a IDH, pues si el ratio es bajo, el calcio se une a la enzima, incrementando su actividad y la consecuente producción de ATP, ya que reduce la K_m para su sustrato. Igualmente, la α -KGDH se encarga de la conversión del α -cetoglutarato en succinil-CoA y, como es lógico, es reprimida por incrementos en los ratios succinil-CoA/CoA y NADH/NAD⁺. El calcio, al contrario, se une a esta enzima provocando un descenso en la K_m del α -cetoglutarato, es decir, incrementa la afinidad de la enzima por su sustrato facilitando su actividad incluso a concentraciones bajas del mismo. Por último, el calcio también participa en la regulación de la glicerol fosfato deshidrogenasa ligada a FAD, que forma el complejo de la lanzadera de glicerol fosfatasa junto con la glicerol fosfato deshidrogenasa citosólica. Dicha enzima cuenta con dos dominios *EF-hand* para el calcio, orientados hacia la membrana mitocondrial interna, actuando así como sensores de su concentración citoplasmática. Esta lanzadera se encarga de enviar poder reductor NADH del citosol al FADH₂ en la matriz mitocondrial, para que entre a la cadena transportadora de electrones (Gherardi et al., 2020). Sin embargo, la

sobrecarga de calcio característica de ciertas situaciones patológicas afecta gravemente la función mitocondrial.

Como ya se ha mencionado, la mitocondria juega un papel esencial en la producción de DAMPS, entre ellos, las ROS. Estas moléculas derivan del oxígeno y contienen uno o más electrones desapareados, convirtiéndolas en altamente reactivas. Las ROS tienen una doble función, a niveles fisiológicos contribuyen a la señalización celular, la autofagia, la proliferación y la respuesta inflamatoria, pero un aumento en su producción resulta dañina y tóxica para las células. Las ROS se suelen formar en la mitocondria durante la fosforilación oxidativa. En concreto, en los complejos I, II y III se forma el ion superóxido, que es hiper reactivo y da lugar a radicales libres de oxígeno. Se cree que hasta un 2 % del oxígeno consumido puede producir ROS. Con respecto al calcio, la estimulación del TCA y de la fosforilación oxidativa por parte de este ion incrementa la producción de ROS en la mitocondria debido a que acelera la producción de ATP, además de la estimulación de la NO sintasa. Esta enzima produce NO, el cual inhibe el complejo IV de la cadena transportadora de electrones, aumentando así la generación de ROS. De esta forma, la activación de la respuesta inflamatoria depende de la concentración de ROS en la mitocondria (Feno et al., 2019). Cabe destacar que las ROS también pueden modular los RyRs del RE, provocando la liberación masiva de calcio al citosol (Görlach et al., 2015). Por lo tanto, la disrupción del equilibrio entre producción y eliminación de ROS a favor de la acumulación de ROS provoca estrés oxidativo. Como se mencionó anteriormente, situaciones como ésta desencadenan la activación de la respuesta inflamatoria. En concreto, el ensamblaje del inflammasoma NLRP3, con el objetivo de restaurar la homeostasis. Si la situación es muy extrema y las concentraciones de ROS superan el límite, la mitocondria puede inducir la muerte celular programada o apoptótica o incluso la autofagia. También, ante dichas situaciones de estrés, la mitocondria podría inducir la apertura del mPTP, provocando la liberación del ATP hacia el medio intra y extracelular, actuando entonces como DAMPs y desencadenando la respuesta inflamatoria con el ensamblaje del inflammasoma NLRP3 (de Ridder et al., 2023; Xu et al., 2024).

2. OBJETIVOS

El calcio es un segundo mensajero crucial en numerosos procesos celulares como el metabolismo energético o la activación del sistema inmune. La comunicación que se establece entre la mitocondria y el RE para regular los niveles intracelulares de este ion es esencial para el correcto funcionamiento de la célula y se altera en situaciones de estrés como la inflamación. Por tanto, la modulación farmacológica de la salida de calcio desde reservorios intracelulares puede ayudar a comprender el papel de este ion en la activación de la cascada inflamatoria. En este contexto, los objetivos de este TFG son:

- Determinar la citotoxicidad de la Tg, un fármaco inhibidor de la bomba Ca^{2+} -ATPasa del RE, en la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7.
- Estudiar el efecto de la Tg sobre la activación de la respuesta inflamatoria en los macrófagos.
- Analizar los flujos de calcio y el metabolismo energético de los macrófagos tras el tratamiento con Tg.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Materiales y reactivos

El medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, del inglés *Dulbecco's modified eagle medium*), el suero fetal bovino (FBS, del inglés *fetal bovine serum*), la penicilina/estreptomicina, el kit del ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) *Mouse TNF Alpha Uncoated ELISA kit*, el kit *CyQuant Cell Proliferation Assay Kit* y el Fura-2 acetoximetil éster (Fura-2AM) se obtuvieron en Thermo Fisher Scientific (Madrid, España). Las placas de cultivo celular de 12 y 96 pocillos, así como los frascos de cultivo, se compraron en Jet Biofil (Guangzhou, China).

Los compuestos saponina (SAP), Tg y el reactivo MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] 2,5-difeniltetrazolio) fueron adquiridos en Merck (Madrid, España).

El kit *Agilent Seahorse XFp Real-Time Rate Assay Kit*, las placas Seahorse Hs Mini y los medios de cultivo para la medición de ATP se obtuvieron en Agilent Technologies (Madrid, España).

3.2. Composición de disoluciones

- Solución de Locke's: 154 mM de NaCl, 3,6 mM de NaHCO₃, 1,3 mM de CaCl₂, 5,6 mM de KCl, 10 mM de HEPES y 5,6 mM de glucosa, pH 7,2-7,4.
- Solución de Umbreit: 119 mM de NaCl, 22,85 mM de NaHCO₃, 5,94 mM de KCl, 1,2 mM de MgSO₄, 1,2 mM de NaH₂PO₄, 1 g/L de glucosa, pH 7,2-7,4.
En algunos experimentos se utiliza esta solución suplementada con 1mM de CaCl₂ o 0,1 % de BSA.
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*): 137 mM de Na₂HPO₄, 1,5 mM de KH₂PO₄ y 3,2 mM de KCl, pH 7,2-7,4.
- Tampón de lavado para el ELISA: 9,6 g de PBS y 500 µL de *Tween-20*.
- Disolución stock de SAP (40 mg/mL): 40 mg de SAP en 1 mL de agua.

3.3. Cultivo celular

Las células RAW 264.7, una línea celular de macrófagos murinos, se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC), número TIB-71. Se cultivaron en frascos de 75 cm² en medio DMEM con 4,5 g/L glucosa y L-glutamina a 2 mM, suplementado con un 10 % de FBS y un 1 % de una solución antibiótica compuesta por penicilina (100 unidades/mL) y estreptomicina (100 µg/mL).

Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂ y para su mantenimiento y realización de pases fueron disociadas mecánicamente mediante un raspador celular estéril.

3.4. Tratamientos

El estándar de Tg se disolvió en DMSO y se realizaron diluciones seriadas en medio de cultivo. Las células se trataron con concentraciones que oscilaban entre 0,001 y 1 µM para los ensayos de viabilidad celular y el ELISA. Cada tratamiento se realizó tres veces independientes por triplicado.

Para la medición del calcio citosólico libre y la cuantificación de ATP, se utilizó la concentración 1 μM de Tg.

3.5. Ensayo de viabilidad celular

El ensayo MTT se empleó para evaluar los efectos de la Tg sobre la viabilidad celular y establecer el control de muerte celular.

Para ello, las células se sembraron en placas de 96 pocillos tratadas, a una concentración de $2,5 \times 10^5$ células/mL y se incubaron durante 24 h. A continuación, las células se trataron durante 24 h con Tg (1; 0,1; 0,01 y 0,001 μM). Además, para establecer la concentración utilizada como control de muerte, las células se trataron con distintas concentraciones de SAP de corteza de Quillaja (1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 y 0,005 mg/mL). En todos los casos se incluyó un control de vehículo.

Seguidamente, las células se lavaron dos veces con solución de Locke's y se añadieron 200 μL de MTT (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por pocillo. La placa se incubó durante 1 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 300 rpm en un agitador de placas en oscuridad. Posteriormente, se aspiró el MTT y se añadió sulfato dodecil de sodio al 5 % en Locke's para disolver los cristales de formazán y poder cuantificar su absorbancia. Por último, la absorbancia de estos cristales se midió a 595 nm en un espectrofotómetro lector de placas. Cada ensayo se realizó tres veces independientes por triplicado.

3.6. Cuantificación del factor de necrosis tumoral α mediante ELISA

Para detectar y cuantificar los niveles de TNF- α liberados al medio por las células RAW 264.7 tratadas con Tg a diferentes concentraciones (1; 0,1 y 0,01 μM), se empleó un kit de ELISA para la detección de TNF- α de ratón siguiendo las instrucciones del fabricante para el protocolo (*Mouse TNF Alpha Uncoated ELISA kit*). Las células se trataron durante 24 horas con el compuesto y se recogió el sobrenadante, que se conservó a -80 $^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

El día anterior al experimento se preparó la dilución del anticuerpo de captura. Se añadieron 100 μL a la placa y se incubó durante la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$ en agitación para que el anticuerpo se inmovilizase y uniese de forma específica. Al día siguiente, se bloqueó la placa y se incubaron las muestras y los estándares durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, tras preparar la dilución del anticuerpo de detección, se añadieron 100 μL a la placa y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente para que se uniese al antígeno. Seguidamente se añadieron 100 μL de HRP-estreptavidina y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente para que se uniese al antígeno biotilado. Por último, se añadieron 100 μL de la solución TMB durante 15 min a temperatura ambiente para que se generase el cambio de color en la placa y se añadieron 100 μL de la solución de parada.

La absorbancia se midió a 450 y 570 nm en un lector de placas. Se realizaron tres réplicas independientes por duplicado.

3.7. Medición del calcio citosólico libre

Para determinar las variaciones en el calcio citosólico causadas por la Tg (1 μM) se empleó el indicador fluorescente selectivo de calcio Fura-2AM. Para este ensayo las

células se sembraron en cubreobjetos de 18 mm. Los cubreobjetos se depositan en placas de 12 pocillos sobre los que se siembran las células con una densidad de 3×10^5 células/pocillo y se dejan crecer durante 24 h. Las células se lavaron dos veces con solución Umbreit suplementada con 0,1 % de BSA y 1 mM de CaCl_2 . A continuación, las células se cargaron con Fura-2AM a una concentración de 2 μM durante 10 min a 37 °C y 300 rpm en oscuridad. Tras la incubación, las células cargadas se lavaron dos veces con solución Umbreit suplementada con 1 mM de CaCl_2 y los portaobjetos se colocaron en una cámara con temperatura controlada y se incuban durante 10 minutos para que las esterasas celulares conviertan el Fura-2 AM en Fura-2 libre, que es la forma sensible al calcio. Para observar las células fluorescentes se empleó un microscopio invertido de fluorescencia (Leica DMI8).

Las disoluciones stock de Tg (1 μM) y CaCl_2 (1 mM) se prepararon previamente en DMSO y agua miliQ respectivamente y se añadieron directamente a la cámara de incubación cuando correspondía. Como control, se realizaron mediciones con solución Umbreit suplementada con 1 mM de CaCl_2 .

Las variaciones de fluorescencia del Fura-2 se determinaron a partir de imágenes captadas por una cámara (K8, Leica) conectada al microscopio. Las células se excitaron alternativamente a 340 y 380 nm utilizando un sistema de fluorescencia con iluminación led (pE-800, Leica). La emisión se recogió a 510 nm mediante un filtro. A 340 nm la fluorescencia aumenta al aumentar la unión del Fura-2 y el calcio, es decir, cuanto mayor es la cantidad de calcio presente, mientras que, a 380 nm, la fluorescencia de indicador aumenta cuando no hay calcio. El ratio entre 340 y 380 nm permite determinar las fluctuaciones de calcio en el citosol y evita el efecto del blanqueamiento del indicador.

Cada experimento se realizó tres veces independientes por triplicado, con una media de 117 células por campo visual.

3.8. Cuantificación de la producción de ATP

Para cuantificar la producción de ATP a tiempo real, se empleó el kit de análisis de la tasa de ATP a tiempo real (*Agilent Seahorse XFp Real-Time Rate Assay Kit*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El día previo al experimento las células se sembraron en microplacas Seahorse Hs Mini a una concentración de $7,5 \times 10^3$ células/pocillo, dejando dos pocillos libres como control. Seguidamente, las células se incubaron durante 24 h a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO_2 . Además, el cartucho del sensor fue hidratado a 37 °C en un incubador sin CO_2 durante la noche. El día del propio experimento se reemplazó el agua del cartucho por calibrante XF, incubándose posteriormente a 37 °C en un incubador sin CO_2 durante 45-60 min. También se preparó el medio DMEM Seahorse XF adecuado para las células en condiciones estériles suplementándose con glucosa 10 mM, piruvato 1 mM y 2 mM de glutamina y se incubó a 37 °C hasta su uso.

Asimismo, se comprobó la morfología y consistencia de las células en un microscopio, y se sustituyó el medio de cultivo por el medio del ensayo previamente preparado. Posteriormente, la placa se incubó a 37 °C en un incubador sin CO_2 durante 45-60 min para preaclimatarse.

A continuación, se realizó la calibración del equipo y el ensayo de medida de ATP. Durante éste, el equipo inyectora de manera secuencial Tg a 1 μM , oligomicina a 1,5 μM y antimicina A y rotenona a 0,5 μM . Los datos fueron analizados con el software Wave (Agilent Technologies). Los datos obtenidos se normalizaron utilizando el kit *CyQuant Cell Proliferation Assay Kit*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se congelaron las células a -80°C y se añadieron 200 μL /pocillo de tampón de lisis con el indicador fluorescente *GR dye*. Tras 5 minutos de incubación, se leyó la fluorescencia en un lector de placas a 480 nm de excitación y 520 nm de emisión.

3.9. Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. Las diferencias se evaluaron mediante la prueba t de *Student* o ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Dunnett. La significación estadística se estableció en * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. Se utilizó el programa GraphPad Prism 8 para calcular la concentración inhibitoria 50 (IC_{50} , del inglés *inhibitory concentration 50*) utilizando un ajuste de $\log(\text{inhibidor})$ frente a respuesta.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Ensayo de viabilidad con saponina

Las SAPs son conocidas por su capacidad para inducir la formación de poros en la membrana celular de forma inespecífica, provocando la lisis celular debido a sus propiedades surfactantes. Se trata de detergentes no iónicos con gran afinidad con los esteroides, sobre todo, con el colesterol, con el que forman complejos insolubles, afectando a la integridad de la membrana y desencadenando la muerte celular (Böttger et al., 2012).

Inicialmente, se evaluó la viabilidad celular tras el tratamiento con SAP extraída de la corteza de Quillaja en macrófagos de la línea celular RAW 264.7 mediante un ensayo MTT. Este ensayo permite conocer el número de células viables mediante la medición de su actividad mitocondrial, pues la enzima succinato deshidrogenasa es la encargada de reducir las sales de tetrazolio solubles en agua (MTT), de color amarillo, a cristales insolubles de formazán, de color violeta. Por último, estos cristales se deben disolver con un disolvente orgánico (van Meerloo et al., 2011). Las células se trataron a diferentes concentraciones de SAP (1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 y 0,005 mg/mL) durante 24 h para establecer un control positivo de muerte celular que pudiera usarse en ensayos posteriores.

Los resultados se muestran en la Figura 7, donde se observa una curva sigmoidea característica de respuesta dosis-dependiente en la que a medida que aumenta la concentración de SAP desde 0,001 hasta 1 mg/mL, la viabilidad celular se reduce significativamente desde 100,0 % hasta 3,2 %. En concreto, la viabilidad celular comenzó a disminuir progresivamente a partir de concentraciones superiores a 0,01 mg/mL. A 0,05 mg/mL, la viabilidad se redujo en torno al 56 %, alcanzando valores mínimos a partir de 0,1 mg/mL en adelante.

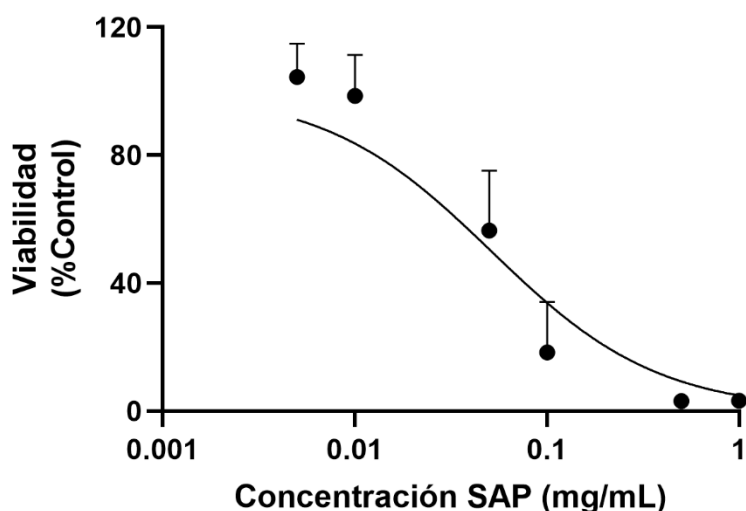


Figura 7. Efecto de la saponina sobre la viabilidad de las células RAW 264.7. Las células se incubaron con distintas concentraciones de SAP durante 24 h y se analizó su efecto sobre la viabilidad celular con el ensayo MTT. Los resultados se presentan como porcentaje de las células control y son la media \pm SEM de tres réplicas realizadas por triplicado.

La IC₅₀ calculada fue de 0,05 mg/mL, por lo que, con esta concentración se reduciría al 50 % la viabilidad celular con las mismas condiciones experimentales. Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y el grupo control, con valores $p < 0,001$ para las concentraciones 1; 0,5 y 0,1 mg/mL y $p < 0,05$ para la concentración 0,05 mg/mL.

En base a estos resultados, se confirma el efecto citotóxico de la SAP, probablemente mediante disrupción de la membrana plasmática. Por ello, se seleccionó la concentración 1 mg/mL como control positivo de muerte celular para los ensayos posteriores en vista a que, a esa concentración de SAP, se generan los valores mínimos de viabilidad celular.

4.1.2. Ensayo de viabilidad con taspigargina

Una vez determinada la concentración de SAP como control de muerte celular, se evaluaron los efectos de la Tg sobre la viabilidad de los macrófagos RAW 264.7 mediante un ensayo MTT. Este fármaco induce un aumento del calcio intracelular, resultando muy útil para estudiar su papel en la activación de la respuesta inflamatoria. La Tg es una lactona sesquiterpénica cuyo principal efecto farmacológico, de mayor interés para este estudio, es su papel como inhibidor irreversible y selectivo de la bomba SERCA (Jaskulska et al., 2021). Esta inhibición causa una depleción de calcio en el RE y su liberación hacia el citosol, sin inducir la liberación de IP₃.

Las células se trataron a diferentes concentraciones de Tg (0,001; 0,01; 0,1 y 1 μ M) y se utilizaron SAP (1 mg/mL) como control positivo de muerte y DMSO al 0,1 % como control de vehículo. La Figura 8 muestra los resultados tras el tratamiento con Tg, observándose de nuevo una curva sigmoidea característica de respuesta dosis-dependiente en la que a medida que aumenta la concentración de Tg, la viabilidad celular se reduce.

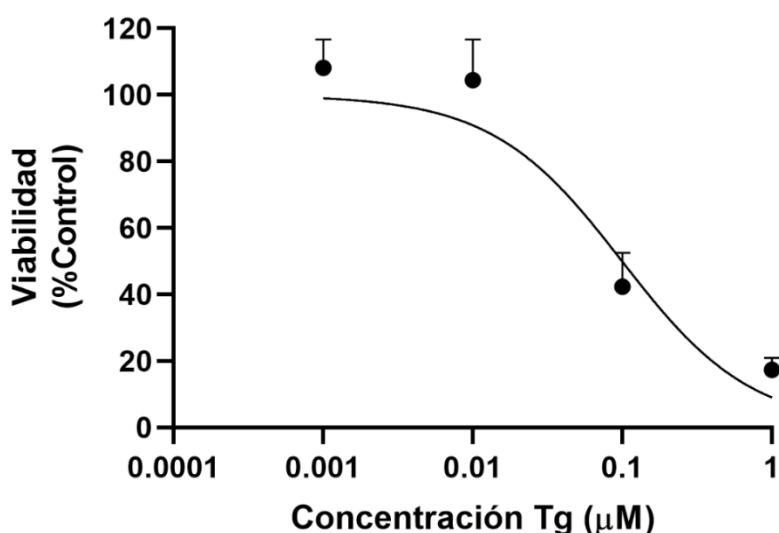


Figura 8. Efecto de la taspigargina sobre la viabilidad de las células RAW 264.7. Las células se incubaron con distintas concentraciones de Tg durante 24 h y se analizó su efecto sobre la viabilidad celular con el ensayo MTT. Los resultados se presentan como porcentaje de las células control y son la media \pm SEM de tres réplicas realizadas por triplicado.

Las concentraciones más bajas de Tg (0,001 y 0,01 μM), no produjeron cambios en la viabilidad celular, manteniéndose en torno al 100 %. Sin embargo, a partir de concentraciones superiores a 0,01 μM , la viabilidad de las células disminuye significativamente en más de la mitad, alcanzando valores mínimos, alrededor del 42 % a 0,1 μM y aproximadamente del 17 % a 1 μM . La IC_{50} determinada fue de 0,1 μM . El análisis estadístico reveló diferencias significativas respecto al grupo control para las concentraciones 0,1 y 1 μM con valores $p < 0,001$.

4.1.3. Liberación del factor de necrosis tumoral α

Una vez determinado el efecto citotóxico de la Tg, se evaluó si dicho compuesto induce una respuesta inflamatoria, por lo que se midieron los niveles de $\text{TNF-}\alpha$ en el sobrenadante de las células tratadas con Tg. $\text{TNF-}\alpha$ es una citoquina proinflamatoria producida por macrófagos, células NK y T activadas, entre otras células, que participa en el proceso de inflamación y muerte celular, entre otras funciones (Sedger & McDermott, 2014). Para la cuantificación de la citoquina se empleó un kit de ELISA específico para $\text{TNF-}\alpha$ murino. En el ensayo ELISA, se cuantificaron los niveles de liberación de $\text{TNF-}\alpha$ en los sobrenadantes de macrófagos RAW 264.7 tratados con Tg a concentraciones de 1; 0,1 y 0,01 μM , comparándose con los niveles del sobrenadante del control vehicular de DMSO (0,1 %) (Figura 9).

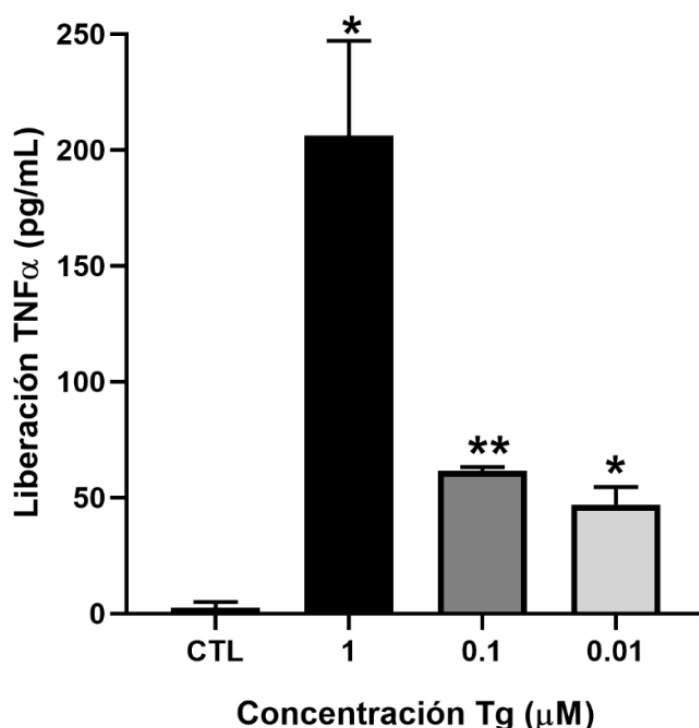


Figura 9. Liberación del factor de necrosis tumoral α inducida por distintas concentraciones de taspigargina en células RAW 264.7. Las células se trataron con Tg a concentraciones 1; 0,1 y 0,01 μM durante 24 h, y se cuantificó la liberación de $\text{TNF-}\alpha$ en el sobrenadante mediante ELISA. Los resultados se presentan como media \pm SEM de tres réplicas realizadas por triplicado. Las diferencias estadísticas se determinaron con un test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Dunnett (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, respecto a las células control).

A concentraciones 0,1 y 0,01 μM , se observó un incremento moderado, pero estadísticamente significativo superando los 80 ($p < 0,01$) y 60 pg/mL ($p < 0,05$), respectivamente, que se correlaciona con una respuesta inflamatoria causada por el estrés del RE provocado por la Tg. Sin embargo, a la concentración de 1 μM , la liberación de TNF- α fue mayor, superando los 200 pg/mL , debido a que las células a esa concentración están muertas, de acuerdo con el ensayo de viabilidad, y dicho aumento podría representar los niveles de TNF- α inflamatorios previos a la muerte celular. Por tanto, estos datos surgieron que la respuesta es dosis-dependiente, pero el efecto a 1 μM podría ser un reflejo de la citotoxicidad de la Tg, más que indicar inflamación activa.

4.1.4. Medición del efecto de la tapsigargina sobre el calcio citosólico libre

Para estudiar el papel de la Tg sobre la homeostasis del calcio, se analizó su efecto en los flujos de calcio. En vista de los resultados anteriores, se seleccionó la concentración de 1 μM puesto que estos ensayos se realizaron a tiempos cortos. Se añadió, por tanto, Tg 1 μM en medio Umbreit suplementado con CaCl_2 1 mM para analizar la liberación de calcio al citosol y la posterior entrada de calcio desde el medio extracelular a través de los canales SOC. La Figura 10 representa los niveles de calcio citosólico a lo largo del tiempo tras la adición de Tg, evaluados con el indicador fluorescente Fura-2AM.

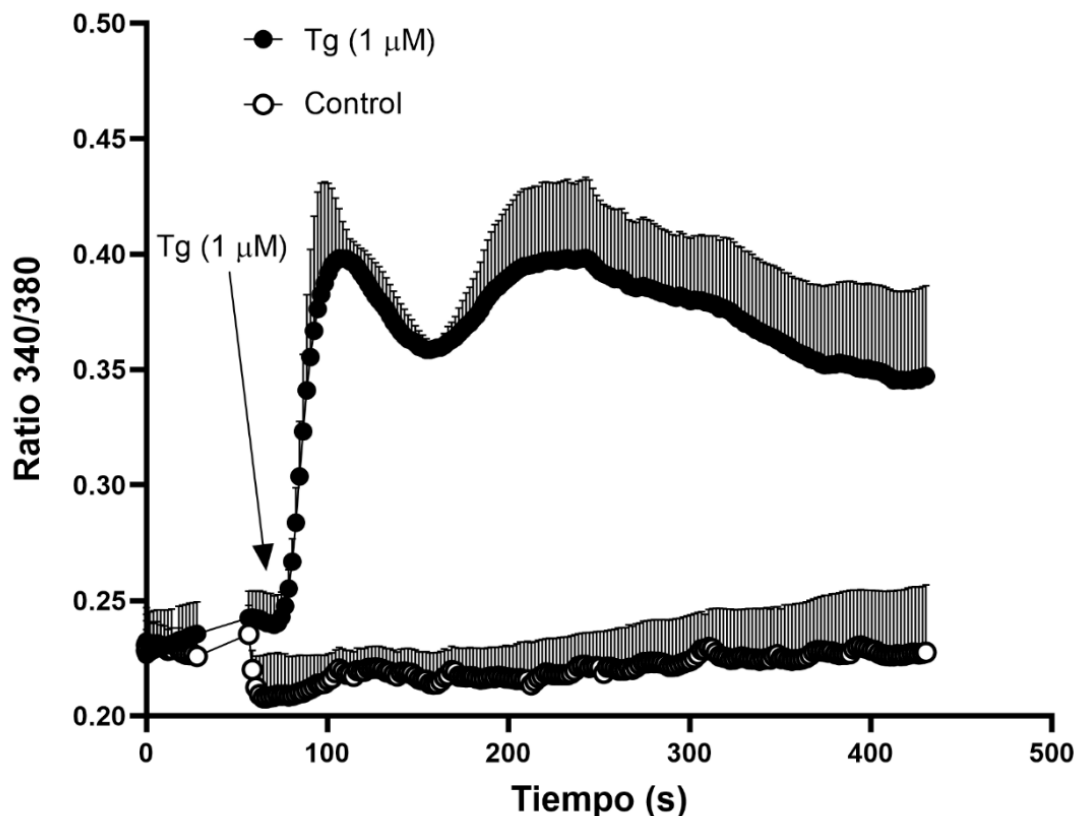


Figura 10. Efecto de la tapsigargina sobre el perfil de calcio citosólico en células RAW 264.7. La concentración intracelular de Ca^{2+} de las células RAW 264.7 aumentó significativamente tras ser tratadas con Tg 1 μM (flecha) en un medio suplementado con Ca^{2+} en comparación con el grupo control. Los resultados se presentan como media \pm SEM de tres réplicas realizadas por triplicado.

Al inicio de la gráfica, los niveles de calcio en el citosol son los propios de un estado basal celular. Tras la adición de la Tg (1 μM), se produce un incremento inmediato del calcio citosólico debido a la inhibición selectiva de la SERCA, por lo que se impide la captación de calcio por parte del RE, principal reservorio de calcio. Por tanto, se observa un aumento en el ratio de 0,22 a 0,40, aproximadamente. A continuación, hay un pequeño descenso debido a la recaptación de calcio citosólico por diversos mecanismos, como la captación de calcio por parte de las mitocondrias mediante el mCU gracias a los MAMs, ya que la célula comienza a restablecer parcialmente la homeostasis en un intento de amortiguar la liberación masiva de calcio en el citosol. Seguidamente, en torno a los 200 s, se produce un incremento de los niveles de calcio citosólico debido a la activación de los canales SOC, que permiten la entrada de calcio del medio exterior.

4.1.5. Cuantificación del ATP tras el tratamiento con taspigargina

Para estudiar en profundidad el efecto de la Tg sobre los reservorios intracelulares y el metabolismo celular, se analizó la respiración celular por medio del kit de análisis de la tasa de ATP a tiempo real (*Agilent Seahorse XFp Real-Time Rate Assay Kit*). Este ensayo permite diferenciar entre la proporción de ATP producido por la mitocondria a través de la fosforilación oxidativa y la proporción producida mediante la glucólisis, lo que se consigue mediante la inyección seriada de los moduladores metabólicos oligomicina, antimicina A y rotenona. La oligomicina bloquea la ATP sintasa (complejo V) de la cadena transportadora de electrones, impidiendo la síntesis de ATP acoplada a la fosforilación oxidativa. De esta forma, permite determinar la fracción mitocondrial de ATP mediante la diferencia entre el consumo de oxígeno basal y el consumo de oxígeno registrado tras la inyección de oligomicina. A continuación, se inyecta antimicina A y rotenona, que impiden la oxidación de las proteínas ferrosulfuradas de los complejos III y I respectivamente, de la cadena transportadora de electrones. Al inhibir la cadena de transporte electrónico, el consumo de oxígeno mitocondrial se detiene, por lo que se puede estimar la producción de ATP glucolítico a partir de la acidificación extracelular causada por la liberación de protones durante la conversión de glucosa en lactato (Agilent Technologies, 2018).

Por tanto, se determinó la tasa de producción de ATP mitocondrial, glucolítico y total en respuesta al estrés causado por la adición de Tg 1 μM (Figura 11). La Figura 11A refleja los valores de ATP total, observándose que en los primeros 15 minutos los valores de ATP se mantienen constantes, rondando los 200 pmol/min, bajo condiciones basales. Sin embargo, tras la inyección de Tg 1 μM , se aprecia una reducción significativa de la producción de ATP total, disminuyendo hasta $93,8 \pm 19,4$ pmol/min.

En la Figura 11B se presentan los resultados de la producción de ATP mitocondrial, donde se aprecia una caída considerable de la producción de éste hasta $36,7 \pm 15,7$ pmol/min tras el tratamiento con Tg. Esta diferencia es estadísticamente significativa respecto a los valores del control ($p < 0,05$). A su vez, la Figura 11C muestra un aparente aumento progresivo de la producción de ATP procedente de la glucólisis tras la adición de Tg 1 μM , especialmente en el minuto 35.

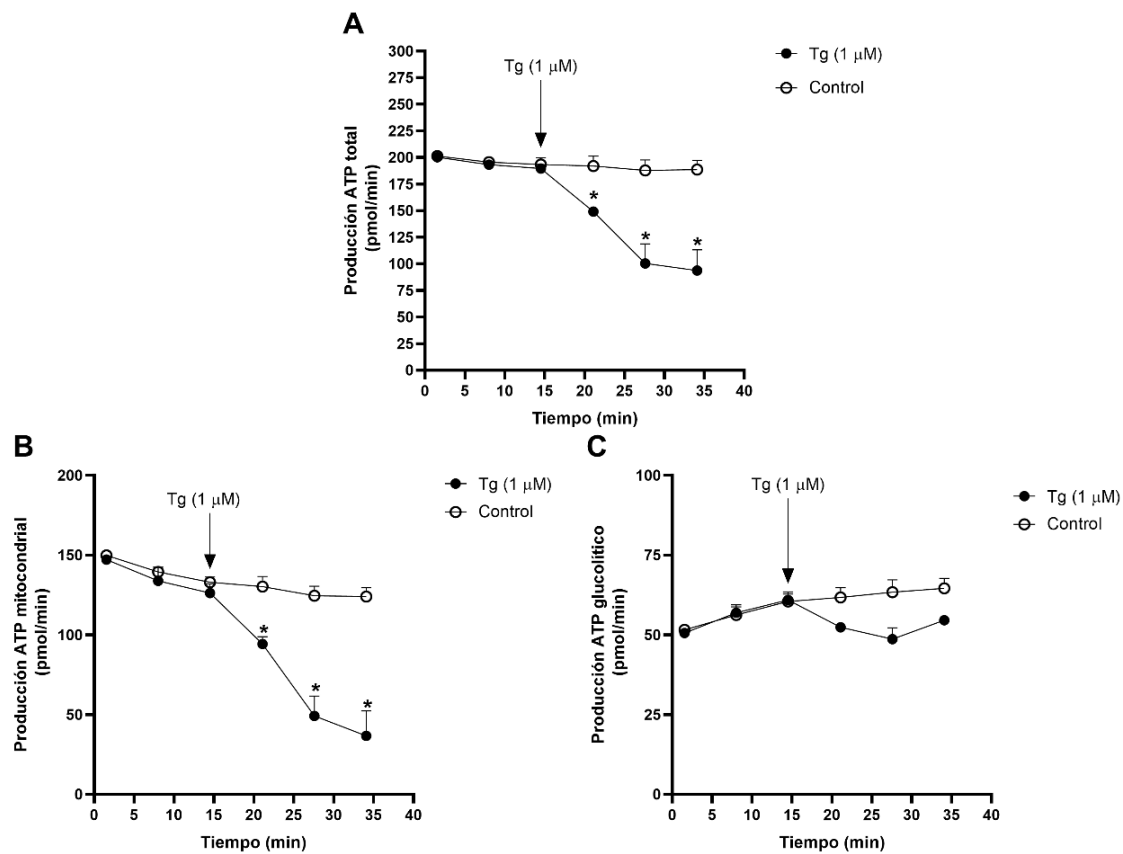


Figura 11. Producción de ATP en los macrófagos tras la adición de tapsigargina. (A) ATP total, (B) ATP mitocondrial y (C) ATP glucolítico tras el tratamiento con Tg 1 μM (flecha) en las células RAW 264.7. Los resultados se presentan como media±SEM de tres réplicas realizadas por triplicado. Las diferencias estadísticas se determinaron con un test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Dunnett (* p<0,05, comparado con las células control).

4.2. Discusión

La inflamación es una respuesta esencial del sistema inmune innato frente a agresiones externas como infecciones, toxinas o daño tisular, en la que los macrófagos realizan una función clave, tanto como células fagocíticas como reguladoras de la respuesta inflamatoria, gracias a la liberación de citoquinas pro- y antiinflamatorias (L. Chen et al., 2017). Esta respuesta inflamatoria es un proceso altamente regulado en el que el calcio intracelular actúa como un mensajero clave, sobre todo en la activación del inflamasoma NLRP3 (Namgaladze et al., 2019). Este complejo multiproteico, muy importante en la defensa frente a agentes patógenos y daño tisular, se ensambla en respuesta a diversos estímulos como el desequilibrio de los flujos de calcio intracelulares, ROS o una disfunción mitocondrial, entre otros (He et al., 2016). Dado que la activación de la respuesta inflamatoria está regulada por variaciones en la concentración intracelular de calcio, el estudio del papel de este segundo mensajero en este contexto resulta esencial para comprender y dilucidar los mecanismos moleculares que controlan la inflamación (Namgaladze et al., 2019). Por esta razón, en este Trabajo Fin de Grado se empleó la Tg, un inhibidor irreversible y selectivo de la SERCA, con el objetivo de provocar la liberación de calcio desde el RE al citosol y analizar la respuesta de las células inflamatorias (Jaskulska et al., 2021). La adición de Tg permite producir una situación de sobrecarga de calcio intracelular, que conllevaría a la activación del inflamasoma NLRP3 junto con el aumento de la producción de ROS y la disrupción mitocondrial y del RE, de forma similar a lo que sucedería en una respuesta inflamatoria según la literatura (Missiroli et al., 2018). Los ensayos se realizaron en macrófagos de la línea celular RAW 264.7, y se evaluó el efecto de la Tg sobre su viabilidad, la liberación de mediadores proinflamatorios, las alteraciones en el calcio intracelular y la producción de ATP.

En primer lugar, se observó que, tras 24 h de tratamiento, la Tg provoca una reducción significativa en la viabilidad de los macrófagos RAW 264.7 a partir de concentraciones de 0,1 μM y 1 μM , con un descenso hasta valores en torno al 42 y 17 %, respectivamente. Esta disminución se debe al efecto de la Tg, ya que, al ser un inhibidor irreversible y selectivo de la SERCA, impide la captación de calcio hacia el interior del RE, el principal reservorio intracelular de este ion. La inhibición de la SERCA causa la depleción del RE, pues el calcio que había en su interior se agota y se produce un incremento del calcio en el citosol, aumentando la concentración intracelular de dicho ion de forma sostenida, de manera similar a como lo haría el IP_3 (Jaskulska et al., 2021). Este vaciamiento puede provocar alteraciones en la función del RE, desencadenando un nivel considerable de estrés en dicho orgánulo, y llevándolo a un estado disfuncional debido a la acumulación de proteínas mal plegadas, entre otras consecuencias derivadas de su incapacidad para funcionar correctamente. En un intento de aliviar esta situación, la célula activa la vía UPR, una red de rutas de señalización cuyo objetivo es evaluar el grado de daño causado en el RE y, en base a ello, restaurar la homeostasis proteica o desencadenar la apoptosis en casos extremos (Namgaladze et al., 2019). En este caso, se encarga de disminuir la carga de proteínas nuevas impidiendo su traducción a través de factores inhibidores de la traducción expresados gracias a PERK. También aumenta la expresión de chaperonas como GRP78, para mejorar el plegamiento y transporte de dichas proteínas mal plegadas;

y activa mecanismos para su eliminación a través de la translocación al citosol, donde son degradadas por el proteasoma (Grootjans et al., 2016). Debido a esta capacidad del RE para recuperar su homeostasis, a concentraciones bajas de Tg, la célula parece recuperarse de dicha situación de estrés, pues el vaciamiento de calcio del RE no sería tan acusado, de forma que la mitocondria puede amortiguar la salida masiva de calcio al citosol al recaptarlo mediante el mCU, gracias a los MAMs, y la vía UPR consigue restaurar la homeostasis. Sin embargo, a concentraciones mayores de Tg, la depleción del RE es mayor, provocando niveles muy altos de estrés mitocondrial y del RE. Además, es probable que dichos niveles de estrés debido a la liberación masiva de calcio sean tan elevados en el RE y la mitocondria, que se activen vías de muerte celular programada, reguladas por la vía UPR o por mecanismos inflamatorios o mitocondriales (Jaskulska et al., 2021).

A continuación, se analizó la posible implicación de la Tg en la respuesta inflamatoria mediante la medida de la liberación de TNF- α tras 24 h de tratamiento. Esta citoquina es un mediador proinflamatorio que participa en la respuesta inflamatoria y en la muerte celular. En el ensayo ELISA se observó un incremento moderado pero significativo a concentraciones 0,1 y 0,01 μ M de Tg que alcanzó concentraciones superiores a los 80 y 60 pg/mL de TNF- α , respectivamente. Sin embargo, a concentraciones 1 μ M de Tg, la liberación de TNF- α fue extremadamente superior, alcanzando los 200 pg/mL. Estos datos parecen reflejar la citotoxicidad de la Tg, pues son valores propios de muerte celular. Además, los niveles de TNF- α detectados tras el tratamiento a 0,1 μ M son ligeramente superiores a los inducidos a 0,01 μ M, lo que tiene sentido de acuerdo con que el nivel de estrés mitocondrial y del RE será mayor cuanto más calcio haya sido liberado en el citosol debido a la acción de la Tg, pues más estrés generará. Como se mencionó anteriormente, la Tg causa una depleción del RE que provoca un gran aumento de la concentración de calcio en el citosol. La mitocondria capta parte de este calcio mediante el mCU pues actúa como un reservorio temporal de calcio, pero a niveles muy elevados, se produce una sobrecarga que le genera altos niveles de estrés (Sánchez Salguero, 2016). Esto ocurre porque, si bien el calcio, a bajas concentraciones, estimula el metabolismo celular a través de la fosforilación oxidativa, a concentraciones muy elevadas, provoca un gran aumento de la producción de ROS en la cadena transportadora de electrones (Gherardi et al., 2020). De esta manera, los ROS mitocondriales actúan como DAMPs y conducen a una activación de vías inflamatorias, que provocan la transcripción de diversas citoquinas proinflamatorias como TNF- α a través de la vía NF- κ B (Feno et al., 2019). Además, si la sobrecarga de calcio mitocondrial es muy elevada, se induce la apertura del mPTP, debido a la alcalinización de la matriz mitocondrial por la actividad excesiva de la cadena transportadora de electrones estimulada por el calcio (de Ridder et al., 2023). De manera que el mPTP permanece abierto hasta que se restablece el potencial de membrana mitocondrial, cuando se vuelve a cerrar. Sin embargo, debido a una sobrecarga de calcio, puede permanecer abierto permanentemente y la mitocondria podrá entonces liberar a través de él una serie de DAMPs como el citocromo c, mtDNA o ROS, que estimulan la inflamación. Todo este daño mitocondrial puede desencadenar el ensamblaje del inflamasoma NLRP3, que se sitúa en los sitios de contacto mitocondria-

RE conocidos como MAMs (Missiroli et al., 2018). Este complejo multiproteico se encarga de desencadenar una respuesta inflamatoria, que a su vez se ve potenciada por la vía UPR activada debido al estrés del RE causado por la Tg (Namgaladze et al., 2019). Además, ambas vías, tanto la respuesta UPR como el inflammasoma NLRP3, ante niveles muy elevados de estrés celular, pueden desencadenar la muerte celular (de Ridder et al., 2023; Xu et al., 2024), lo que explicaría los valores de TNF- α liberados por las células tras 24 h con el tratamiento de Tg 1 μ M.

En concreto, IRE1 α , uno de los sensores de los niveles de calcio más importantes que participa en la vía UPR, ejerce un papel clave en la conexión del estrés del RE y la inflamación. Esta proteína, al activarse, recluta a la proteína adaptadora factor 2 asociado a la proteína receptora TNF (TRAF2, del inglés *TNF receptor-associated factor 2*), quien forma un complejo con la quinasa inhibidora del NF- κ B (IKK, del inglés *inhibitor of κ B kinase*), provocando su degradación. Tras la eliminación de su inhibidor, NF- κ B es liberado y se dirige hacia el núcleo, donde promoverá la transcripción de sus genes diana, como TNF- α , dado que NF- κ B es un mediador clave de la inflamación y supervivencia celular (Grootjans et al., 2016). En este sentido, la liberación de esta citoquina proinflamatoria observada en este Trabajo Fin de Grado es un indicador indirecto de la activación conjunta de la vía UPR y la respuesta inflamatoria mediada por NF- κ B. Estos resultados concuerdan con estudios previos, donde se afirma que la Tg desencadena la vía UPR y activa la señalización inflamatoria mediante NF- κ B debido al eflujo de calcio del RE que origina la inhibición de la SERCA, seguido de la formación de ROS (Chaudhari et al., 2014).

En vista de estos resultados, se procedió a analizar el efecto de la Tg sobre los flujos de calcio intracelular, observándose un gran incremento de la concentración citosólica de calcio tras la adición del compuesto a concentraciones 1 μ M, que se debe a la depleción del ion desde el RE causado por la inhibición de la SERCA. Así, el ratio de calcio experimentó un aumento de 0,22 a 0,40, aproximadamente. A continuación, hay un pequeño descenso en el ratio debido a que el calcio al principio es recaptado por la mitocondria a través del mCU gracias a los MAMs, pues este orgánulo actúa como un reservorio temporal de calcio, como se puede comprobar alrededor del segundo 150. Seguidamente, en torno a los 200 s, se produce un incremento de los niveles de calcio citosólico. La explicación a este vaciamiento de calcio del RE que se produce inicialmente podría deberse a que el calcio ya no estaría unido al dominio *EF-hand* amino terminal de las proteínas STIM. De esta forma, las proteínas STIM estarían experimentando un cambio conformacional en el lumen del RE, pues pasarían a ser oligómeros, lo que provocaría su translocación hacia la membrana plasmática. Allí se unirían al extremo carboxilo terminal citosólico de las proteínas Orai que conforman los canales SOC a través de su dominio CAD y se produciría la apertura de los canales SOC (Putney, 2010; Tiffner et al., 2021), por lo que comenzaría a entrar masivamente calcio en la célula en un intento de recuperar la homeostasis, como parece reflejarse a los 200 s, ya que se produce un incremento de calcio citosólico proveniente del medio extracelular. La apertura de los canales SOC se debería a que la Tg induce la liberación de calcio del RE

de forma muy similar a como lo hace el IP₃, pero sin liberar este segundo mensajero (Sánchez Salguero, 2016).

La estructura de los canales SOC consta de 4 dominios transmembrana de proteína Orai1, que forman un canal que permite el flujo de calcio desde el medio extracelular. Sus extremos citosólicos contienen los sitios de unión para las proteínas STIM, que actúan como sensores de calcio en el lumen del RE y, tras su activación, se acoplan a las proteínas Orai1 para regular la apertura del canal. De esta manera, cuando el RE está lleno de calcio, a nivel molecular, el complejo Orai1-STIM está desacoplado de la membrana, pues las proteínas STIM detectan el calcio unido a su dominio *EF-hand* y se encuentran libres por el citosol. Esto se correspondería con los valores basales de los primeros segundos. Sin embargo, cuando los niveles de calcio decaen, el calcio se disociaría de las proteínas STIM, que se reorganizarían en oligómeros e interaccionarían con las proteínas Orai1 activando la apertura de los canales SOC (L. Chen et al., 2017; Noble et al., 2020; Putney, 2010; Tiffner et al., 2021) y permitiendo así la entrada de calcio del exterior (Lewis, 2007), lo que se parece observarse a partir de los 200 s aproximadamente.

Por último, debido al importante papel que ejerce el calcio sobre el metabolismo energético, se analizó el efecto de la Tg en la producción de ATP. Se observó una gran disminución de la producción total de ATP al tratar a los macrófagos con Tg 1 μ M, reduciéndose de 200 a 94 pmol/min, aproximadamente. Este efecto podría estar relacionado con la gran liberación de calcio producida por la Tg desde el RE al citosol. Como consecuencia, las mitocondrias no serían capaces de amortiguar completamente esta salida de calcio, lo que podría estar provocando un gran estrés mitocondrial, anulándose así su capacidad para producir ATP mediante la fosforilación oxidativa. En este sentido, al analizar la producción de ATP mitocondrial, se aprecia un descenso en sus niveles, probablemente debido a una sobreestimulación de la cadena transportadora de electrones (de Ridder et al., 2023; Gherardi et al., 2020). Así, al determinar la generación de ATP glucolítico, se observa un ligero aumento en su producción, probablemente en un intento de compensar la disfunción mitocondrial y restaurar el equilibrio en la producción energética. Básicamente lo que ocurriría es que la célula, como respuesta adaptativa para recuperar la homeostasis, activa la glucólisis anaerobia como mecanismo compensatorio para revertir el déficit energético causado por la disfunción mitocondrial por sobrecarga de calcio y finalmente lograría recuperarse del efecto de la Tg, como se observa tanto en la medición de calcio citosólico como en la producción de ATP. Sin embargo, no se puede apreciar este mecanismo en los ensayos de viabilidad debido a que éstos experimentan un tratamiento con Tg con tiempos de incubación de 24 h, mientras que la medición del calcio intracelular y la producción de ATP fueron registrados con tiempos de incubación inferiores a 1 h. Si se realizasen dichos experimentos tras 24 h del tratamiento con Tg, no sería posible ver ningún efecto porque se produciría una gran reducción de la viabilidad celular. Los resultados obtenidos se correlacionan con la literatura, pues el calcio es necesario para estimular el metabolismo energético mitocondrial, ya que activa varias enzimas clave como la PDH, la IDH o la α -KGDH (Gherardi et al., 2020). Esto explica por qué la mitocondria juega un papel muy importante en la regulación de los niveles de calcio citosólico, pues puede actuar como

un reservorio temporal de este ion. Este orgánulo es capaz de detectar aumentos en la concentración citosólica de calcio y amortiguarlo captándolo en su interior a través del mCU para luego liberarlo lentamente gracias a sus diversos intercambiadores (Sánchez Salguero, 2016). No obstante, la función amortiguadora de la mitocondria tiene límites, ya que, ante una sobrecarga sostenida de calcio, como la inducida por la Tg, podría perder su capacidad compensatoria y activar la apertura del mPTP, para liberar calcio al citosol y revertir la producción de ROS debido a la estimulación excesiva que ejerce el calcio en la cadena transportadora de electrones. Tal como se ha mencionado anteriormente, la apertura del mPTP constituiría además un canal por el que la mitocondria liberaría diversos DAMPs, lo que podría contribuir al ensamblaje del inflammasoma NLRP3, en paralelo a la activación de la vía UPR como consecuencia del estrés del RE (de Ridder et al., 2023; Missiroli et al., 2018). Además, la mitocondria también estaría implicada en la regulación de los canales SOC, pues capta el calcio liberado por el RE sin inactivar los IP₃Rs (pues la concentración de calcio citosólico no aumenta), lo que permitiría la entrada sostenida de calcio a través de los canales SOC, dado que se produce el vaciamiento del RE (Sánchez Salguero, 2016). A su vez, las mitocondrias participan en la inactivación lenta de los canales SOC dependiente de calcio, que ocurre como consecuencia de un aumento del calcio a nivel citosólico, debido a la incapacidad de la mitocondria para seguir captando calcio una vez ya se ha llenado (Nan et al., 2021).

En conjunto, los resultados sugieren que la inhibición de la bomba SERCA producida por la Tg induce una disrupción en la homeostasis del calcio, afectando a la función tanto del RE como de la mitocondria. Este desequilibrio activa mecanismos compensatorios como la vía UPR y la glucólisis que, a tiempos cortos, recuperan la homeostasis celular. Sin embargo, a tiempos largos, la presencia de Tg parece producir la activación del inflammasoma NLRP3 y el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria, que puede derivar en muerte celular.

6. CONCLUSIONES

1. La Tg reduce la viabilidad de las células RAW 264.7, con una IC₅₀ de 0,1 μM tras 24 h de incubación.
2. La Tg activa la cascada inflamatoria en los macrófagos, induciendo la liberación de la citoquina proinflamatoria TNF-α.
3. La Tg provoca salida de calcio desde el RE y altera el metabolismo energético, ya que reduce la producción de ATP mitocondrial.

BIBLIOGRAFÍA

- Agilent Technologies. (2018). *Agilent Seahorse XFp Real-Time ATP Rate Assay Kit User Guide* (p. 24). Agilent Technologies, Inc. https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/103591-400_Seahorse_XFp_ATP_Rate_Assay_Kit_User_Guide.pdf
- Böttger, S., Hofmann, K., & Melzig, M. F. (2012). Saponins can perturb biologic membranes and reduce the surface tension of aqueous solutions: A correlation? *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(9), 2822-2828. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.03.032>
- Catterall, W. A. (2011). Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), a003947. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>
- Chaudhari, N., Talwar, P., Parimisetty, A., d'Hellencourt, C. L., & Ravanan, P. (2014). A molecular web: Endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 213. Scopus. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00213>
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2017). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204-7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>
- Chen, S., Saeed, A. F. U. H., Liu, Q., Jiang, Q., Xu, H., Xiao, G. G., Rao, L., & Duo, Y. (2023). Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 1-35. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01452-1>
- Chen, Y.-F., Chen, Y.-T., Chiu, W.-T., & Shen, M.-R. (2013). Remodeling of calcium signaling in tumor progression. *Journal of Biomedical Science*, 20(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-20-23>
- Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6), 1047-1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- de Ridder, I., Kerkhofs, M., Lemos, F. O., Loncke, J., Bultynck, G., & Parys, J. B. (2023). The ER-mitochondria interface, where Ca²⁺ and cell death meet. *Cell Calcium*, 112, 102743. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2023.102743>
- de Souza, L. B., & Ambudkar, I. S. (2014). Trafficking mechanisms and regulation of TRPC channels. *Cell Calcium*, 56(2), 43-50. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.05.001>
- Feno, S., Butera, G., Vecellio Reane, D., Rizzuto, R., & Raffaello, A. (2019). Crosstalk between Calcium and ROS in Pathophysiological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 9324018. <https://doi.org/10.1155/2019/9324018>
- Fucile, S. (2004). Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium*, 35(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2003.08.006>

- Fuentes, A.-L., Millis, L., Vapenik, J., & Sigola, L. (2014). Lipopolysaccharide-mediated enhancement of zymosan phagocytosis by RAW 264.7 macrophages is independent of opsonins, laminarin, mannan, and complement receptor 3. *Journal of Surgical Research*, *189*(2), 304-312. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.03.024>
- Gherardi, G., Monticelli, H., Rizzuto, R., & Mammucari, C. (2020). The Mitochondrial Ca²⁺ Uptake and the Fine-Tuning of Aerobic Metabolism. *Frontiers in Physiology*, *11*, 554904. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.554904>
- Görlach, A., Bertram, K., Hudcová, S., & Krizanová, O. (2015). Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biology*, *6*, 260-271. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.010>
- Grootjans, J., Kaser, A., Kaufman, R. J., & Blumberg, R. S. (2016). The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nature reviews. Immunology*, *16*(8), 469-484. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.62>
- He, Y., Hara, H., & Núñez, G. (2016). Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends in Biochemical Sciences*, *41*(12), 1012-1021. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.002>
- Jaskulska, A., Janecka, A. E., & Gach-Janczak, K. (2021). Thapsigargin—From Traditional Medicine to Anticancer Drug. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/ijms22010004>
- Jiménez, Y. Y. L., & Mora, R. M. S. (2020). Canales de calcio como blanco de interés farmacológico. *Revista Nova publicación científica en ciencias biomédicas*, *18*(34), Article 34. <https://doi.org/10.22490/24629448.3926>
- Judge, A., & Dodd, M. S. (2020). Metabolism. *Essays in Biochemistry*, *64*(4), 607-647. <https://doi.org/10.1042/EBC20190041>
- Lanner, J. T., Georgiou, D. K., Joshi, A. D., & Hamilton, S. L. (2010). Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(11), a003996. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003996>
- Lewis, R. S. (2007). The molecular choreography of a store-operated calcium channel. *Nature*, *446*(7133), 284-287. <https://doi.org/10.1038/nature05637>
- Liu, H., Wang, S., Wang, J., Guo, X., Song, Y., Fu, K., Gao, Z., Liu, D., He, W., & Yang, L.-L. (2025). Energy metabolism in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *10*(1), 69. <https://doi.org/10.1038/s41392-025-02141-x>
- Mamilos, A., Winter, L., Schmitt, V. H., Barsch, F., Grevenstein, D., Wagner, W., Babel, M., Keller, K., Schmitt, C., Gürtler, F., Schreml, S., Niedermair, T., Rupp, M., Alt, V., & Brochhausen, C. (2023). Macrophages: From Simple Phagocyte to an Integrative Regulatory Cell for Inflammation and Tissue Regeneration—A Review of the Literature. *Cells*, *12*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/cells12020276>

- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>
- Mesquita, I., & Rodrigues, F. (2018). Cellular Metabolism at a Glance. *Experientia Supplementum* (2012), 109, 3-27. https://doi.org/10.1007/978-3-319-74932-7_1
- Missiroli, S., Patergnani, S., Carocchia, N., Pedriali, G., Perrone, M., Previati, M., Wieckowski, M. R., & Giorgi, C. (2018). Mitochondria-associated membranes (MAMs) and inflammation. *Cell Death & Disease*, 9(3), 329. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0027-2>
- Namgaladze, D., Khodzhaeva, V., & Brüne, B. (2019). ER-Mitochondria Communication in Cells of the Innate Immune System. *Cells*, 8(9), 1088. <https://doi.org/10.3390/cells8091088>
- Nan, J., Li, J., Lin, Y., Saif Ur Rahman, M., Li, Z., & Zhu, L. (2021). The interplay between mitochondria and store-operated Ca²⁺ entry: Emerging insights into cardiac diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(20), 9496-9512. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16941>
- Noble, M., Lin, Q.-T., Sirko, C., Houpt, J. A., Novello, M. J., & Stathopoulos, P. B. (2020). Structural Mechanisms of Store-Operated and Mitochondrial Calcium Regulation: Initiation Points for Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/ijms21103642>
- Prole, D. L., & Taylor, C. W. (2019). Structure and Function of IP₃ Receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(4), a035063. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035063>
- Putney, J. W. (2010). Pharmacology of Store-operated Calcium Channels. *Molecular Interventions*, 10(4), 209-218. <https://doi.org/10.1124/mi.10.4.4>
- Riastrri, A., Putri, D. D. P., Sa'adah, M., Gani, A. P., & Murwanti, R. (2023). RAW 264.7 Macrophage Cell Line: In Vitro Model for the Evaluation of the Immunomodulatory Activity of Zingiberaceae: <http://www.doi.org/10.26538/tjnpr/v7i2.3>. *Tropical Journal of Natural Product Research (TJNPR)*, 7(2), Article 2.
- Sánchez Salguero, J. A. (2016). *Estudio del potencial terapéutico de compuestos de origen marino* [Tesis doctoral]. Universidad de Santiago de Compostela.
- Sedger, L. M., & McDermott, M. F. (2014). TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 25(4), 453-472. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.016>
- Shah, S. Z. A., Zhao, D., Khan, S. H., & Yang, L. (2015). Regulatory Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Resident IP₃ Receptors. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 56(4), 938-948. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0551-4>

- Taciak, B., Białasek, M., Braniewska, A., Sas, Z., Sawicka, P., Kiraga, Ł., Rygiel, T., & Król, M. (2018). Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLOS ONE*, *13*(6), e0198943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198943>
- Takeshima, H., Venturi, E., & Sitsapesan, R. (2015). New and notable ion-channels in the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum: Do they support the process of intracellular Ca²⁺ release? *The Journal of Physiology*, *593*(15), 3241-3251. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.281881>
- Tiffner, A., Maltan, L., Weiß, S., & Derler, I. (2021). The Orai Pore Opening Mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ijms22020533>
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1843*(11), 2563-2582. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>
- van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. En I. A. Cree (Ed.), *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* (pp. 237-245). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
- Xia, M., Zhang, Y., Jin, K., Lu, Z., Zeng, Z., & Xiong, W. (2019). Communication between mitochondria and other organelles: A brand-new perspective on mitochondria in cancer. *Cell & Bioscience*, *9*, 27. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0289-8>
- Xu, K., Saaoud, F., Shao, Y., Lu, Y., Yang, Q., Jiang, X., Wang, H., & Yang, X. (2024). A new paradigm in intracellular immunology: Mitochondria emerging as leading immune organelles. *Redox Biology*, *76*, 103331. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2024.103331>
- Yao, Y., Xu, X.-H., & Jin, L. (2019). Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Frontiers in Immunology*, *10*, 00792. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00792>
- Zhang, C., Yang, M., & Ericsson, A. C. (2021). Function of Macrophages in Disease: Current Understanding on Molecular Mechanisms. *Frontiers in Immunology*, *12*, 620510. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.620510>
- Zheng, Q., Wang, D., Lin, R., & Xu, W. (2025). Pyroptosis, ferroptosis, and autophagy in spinal cord injury: Regulatory mechanisms and therapeutic targets. *Neural Regeneration Research*, *20*(10), 2787. <https://doi.org/10.4103/NRR.NRR-D-24-00112>
- Zheng, X., Wan, J., & Tan, G. (2023). The mechanisms of NLRP3 inflammasome/pyroptosis activation and their role in diabetic retinopathy. *Frontiers in Immunology*, *14*, 1151185. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1151185>