



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

DPTO. DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y FISIOLÓGIA

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)

TESIS DOCTORAL:

**Remodelado del Ca^{2+} Intracelular en el
Cáncer Colorrectal:
Descripción, Bases Moleculares y
Consecuencias Funcionales**

Presentada por **Diego Sobradillo Luengo** para optar al
grado de Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Dr. Carlos Villalobos Jorge
Dra. Lucía Núñez Llorente



D. Carlos Villalobos Jorge, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) de Valladolid,

Y Dña. Lucía Núñez Llorente, Profesora Titular del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid,

CERTIFICAN: que **D. Diego Sobradillo Luengo** ha realizado bajo su dirección el presente trabajo titulado **“Remodelado del Ca²⁺ Intracelular en el Cáncer Colorrectal: Descripción, Bases Moleculares y Consecuencias Funcionales”** como Tesis para alcanzar el grado de Doctor, realizado en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid.

Y para que conste donde proceda firman la presente certificación en Valladolid a 26 de Mayo de 2015.

Carlos Villalobos Jorge

Lucía Núñez Llorente

A mi familia

Por estar siempre ahí

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Carlos Villalobos y la Dra. Lucía Nuñez, por darme la oportunidad de emprender esta aventura, así como por sus consejos, esfuerzo y dedicación a lo largo del desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio debo agradecer todos los buenos ratos pasados tanto fuera como dentro del IBGM: Alejandra, Carmen, Daniel, David, Erica, Eva, Lucía, María, Miriam, Mónica y Paloma. Eva, gracias por tu paciencia y todo lo aprendido que me ayudaron a dar los primeros pasos en el laboratorio.

Agradecer a la Dra. Miriam Hernández por la realización de los experimentos de electrofisiología incluidos en la tesis. Gracias a Daniel Ubierna por su colaboración en los experimentos de PCR. También, a David del Bosque por su soporte técnico en el laboratorio.

A Álvaro Martín y Cristina Sánchez gracias por el soporte técnico en citometría de flujo y microscopía confocal, respectivamente.

Al Dr. David J. Beech y a su equipo, en especial a Lynn Mckeown, agradecer la amable acogida en su laboratorio y todo lo aprendido durante mi estancia en la Universidad de Leeds (UK).

Gracias a mis amigos y compañeros de fatiga tanto de León, como de mi querido pueblo, Veguellina de Órbigo, por los buenos momentos. Gracias a Alicia por su amistad desde mi llegada a Valladolid que espero que siga con los años, a pesar de la distancia.

Por último, y por supuesto no menos importante, gracias a mis padres, hermanos y demás familia, sin su apoyo, cariño y comprensión no hubiera sido posible superar este gran reto.

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES EN CONGRESOS

Parte del material incluido en esta tesis doctoral ha sido publicado en los siguientes artículos:

- **Sobradillo D**, Hernandez-Morales M, Ubierna D, Moyer MP, Núñez L, Villalobos C (2014). A reciprocal shift in transient receptor potential channel 1 (TRPC1) and stromal interaction molecule 2 (STIM2) contributes to Ca²⁺ remodeling and cancer hallmarks in colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem*. 289: 28765-82.
- Muñoz E, Hernandez-Morales M, **Sobradillo D**, Rocher A, Núñez L, Villalobos C (2013). Intracellular Ca²⁺ remodeling during the phenotypic journey of human coronary smooth muscle cells. *Cell Calcium*. 54: 375-85.

Además, ha sido presentado en forma de comunicación en los siguientes congresos:

- Hernández-Morales M, **Sobradillo D**, González L, García-Durillo M, del Bosque D, Núñez L and Villalobos C. Calcium channel remodelling in colon cancer: contribution of mitochondria and the Warburg effect. European Calcium Society Workshop 2015, Seillac, France. Junio 2015.
- **Sobradillo D**, Muñoz E, Moyer MP, Núñez L, Villalobos C. Differences in cell proliferation and store-operated calcium entry between normal colonocytes and colorectal adenoma cells. IV Reunión de la Red Española de Canales Iónicos (IV RECI). Cuenca. España. Febrero 2013.
- **Sobradillo D**, Muñoz-Conejero E, Moyer MP, Núñez L, Villalobos C. Differences in cell proliferation and store-operated calcium entry between normal colonocytes and colorectal adenoma cells. Joint FEPS and Spanish Physiological Society Scientific Congress 2012. Santiago de Compostela. España. Septiembre 2012. *Acta Physiologica 2012*. 206 (693): P177.
- Muñoz-Conejero E, **Sobradillo-Luengo D**, Hernández-Morales M, Rocher A, Núñez L, Villalobos C. Role of calcium channel remodeling in the reversal phenotypic switch of human coronary artery smooth muscle cells, and the effects of NSAIDs. Joint FEPS and Spanish Physiological Society Scientific Congress 2012. Santiago de Compostela. España. Septiembre 2012. *Acta Physiologica 2012*. 206 (693): O138.

RESUMEN

En los últimos años, se ha sugerido que en el desarrollo del cáncer se produce un remodelado de la señal de Ca^{2+} , sin embargo, no están claros cuáles son los mecanismos moleculares y funcionales del mismo. En el cáncer de colon, apenas existen datos al respecto, por lo que nos propusimos estudiar en profundidad el remodelado del transporte de Ca^{2+} en el cáncer de colon, sus bases moleculares y sus posibles consecuencias funcionales.

En la presente Tesis Doctoral comparamos el transporte de Ca^{2+} y la expresión de genes implicados en éste en células humanas de adenocarcinoma de colon y de mucosa de colon normal. Para ello, utilizamos técnicas de Fisiología Celular y Molecular incluyendo la imagen de Ca^{2+} por microscopía de fluorescencia y bioluminiscencia, electrofisiología planar o *patch-clamp* automático, PCR convencional y cuantitativa, *western-blotting*, técnicas de silenciamiento génico y medidas funcionales de proliferación, invasión y resistencia a la muerte celulares.

Los resultados muestran que existe un profundo remodelado del Ca^{2+} intracelular en células de adenocarcinoma de colon respecto a la homeostasis del Ca^{2+} en células de epitelio normal de colon humano. El remodelado consiste en un aumento de la entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC) asociada con cambios en la densidad y naturaleza de las corrientes de Ca^{2+} , una mayor entrada y liberación de Ca^{2+} inducida por agonistas, un aumento de la cocentración de Ca^{2+} intracelular basal y del potencial de membrana en reposo, una mayor captación de Ca^{2+} por las mitocondrias y un menor contenido de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares. A nivel molecular, estos cambios se explican por el aumento en la expresión de canales, especialmente Orai1 y TRPC1, por el cambio recíproco en la expresión de los sensores de Ca^{2+} del RE Stim1 y Stim2, así como por el aumento del potencial mitocondrial. Estos cambios promueven algunas características esenciales de las células tumorales como son la proliferación excesiva, la capacidad de invasión y la resistencia a la muerte celular por lo algunas de las proteínas implicadas podrían ser consideradas para el diseño de nuevas estrategias en la prevención y/o el tratamiento del cáncer de colorrectal.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
I. INTRODUCCIÓN	5
1. Cáncer colorrectal: Aspectos generales.....	7
2. Homeostasis y señalización del Ca ²⁺ subcelular	11
3. Sistemas de transporte de Ca ²⁺ en la célula	14
3.1. Membrana plasmática.....	14
3.1.1. Canales de Ca ²⁺ de la membrana plasmática	14
3.1.1.1. Canales de Ca ²⁺ operados por voltaje (VOCs)	15
3.1.1.2. Canales de Ca ²⁺ operados por receptor (ROCs).....	17
3.1.1.3. Canales de Ca ²⁺ operados por segundo mensajero (SMOCs)	18
3.1.1.4. Canales de Ca ²⁺ operados por depósitos (SOCs)	18
3.1.2. Sistemas de extrusión de Ca ²⁺ de la membrana plasmática.....	19
3.1.2.1. Bomba Ca ²⁺ /ATPasa de la membrana plasmática (PMCA)	19
3.1.2.2. Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ (NCX)	20
3.1.2.3. Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ -K ⁺ (NCKX)	21
2.2. Depósitos intracelulares de Ca ²⁺	21
2.2.1. Canales de Ca ²⁺ de los depósitos intracelulares	22
2.2.1.1. Receptores de IP ₃ (IP ₃ Rs).....	22
2.2.1.2. Receptores de rianodina (RyRs).....	24
2.2.2. Bombas de Ca ²⁺ de los depósitos intracelulares	25
2.2.2.1. ATPasa de Ca ²⁺ del retículo sarco/endoplásmico (SERCA).....	25
2.2.2.2. ATPasa de Ca ²⁺ de la vía secretora (SPCA).....	27
2.3. Mitocondria	28
2.3.1. Uniportador de Ca ²⁺ mitocondrial (MCU)	30

2.3.2. Intercambiadores mitocondriales de Ca^{2+}	32
4. Entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC).....	32
4.1. ORAI y STIM	34
4.1.1. ORAI1.....	36
4.1.2. ORAI2 y ORAI3	38
4.1.3. STIM1.....	40
4.1.4. STIM2.....	42
4.2. Superfamilia de los canales TRPs	44
4.2.1. TRPCs.....	46
4.2.2. TRPV4 y TRPV6.....	48
4.2.3. TRPM8	49
4.3. Corrientes operadas por depósitos.....	49
4.4. Control mitocondrial de la entrada capacitativa de Ca^{2+}	52
4.5. Papel funcional de la entrada capacitativa de Ca^{2+} en la célula	54
5. Participación del Ca^{2+} en la muerte celular	56
6. Papel del transporte de Ca^{2+} en el cáncer	59
6.1. Extrusión de Ca^{2+} y cáncer	60
6.2. Secuestro de Ca^{2+} hacia los depósitos y cáncer	61
6.3. Liberación de Ca^{2+} desde los depósitos y cáncer	63
6.4. Transporte de Ca^{2+} en la mitocondria y cáncer	65
6.5. Entrada de Ca^{2+} en la célula y cáncer	66
6.5.1. Canales de Ca^{2+} operados por voltaje	66
6.5.2. Canales TRPs	66
6.5.3. Entrada capacitativa de Ca^{2+} mediada por STIM/ORAI	72
6.6. Remodelado de la entrada capacitativa de Ca^{2+} en el cáncer colorrectal	76

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	79
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	83
1. Métodos.....	85
1.1. Cultivos celulares.....	85
1.2. Proliferación celular	86
1.3. Registro de Ca^{2+} citosólico mediante imagen de fluorescencia	87
1.4. Medida de la liberación de Ca^{2+} con IP_3 enjaulado.....	90
1.5. Ensayo de muerte celular con anexina V-FITC y yoduro de propidio	91
1.6. Nucleofección	94
1.7. Monitorización del Ca^{2+} mitocondrial mediante imagen de bioluminiscencia	94
1.8. Estudio del potencial mitocondrial con TMRM	97
1.9. Ensayo de invasión <i>in vitro</i>	98
1.10. Registros electrofisiológicos mediante la técnica de <i>patch-clamp</i> planar	99
1.11. Extracción de RNA, RT-PCR y qRT-PCR	102
1.12. Extracción de proteínas y <i>Western-blotting</i>	105
1.13. Silenciamiento génico con siRNA.....	106
1.14. Análisis estadístico	107
2. Materiales.....	107
2.1. Líneas celulares.....	107
2.2. Medios, reactivos y materiales de cultivo celular	107
2.3. Sondas y colorantes.....	107
2.4. Agonistas, antagonistas, inhibidores y otros compuestos.....	108
2.5. siRNAs	108
2.6. Soluciones y materiales de nucleofección	108
2.7. Medios de imagen	108

2.8. Soluciones de electrofisiología.....	108
2.9. Soluciones y reactivos para ensayo de muerte	109
2.10. Reactivos y materiales de PCR.....	109
2.11. Soluciones, reactivos y anticuerpos para western blotting.....	110
2.12. Reactivos de las soluciones.....	112
IV. RESULTADOS.....	113
1. Remodelado del Ca^{2+} intracelular en células de carcinoma de colon y sus posibles consecuencias funcionales.....	115
1.1. Las células tumorales de colon humano presentan mayor proliferación y entrada capacitativa de Ca^{2+} que las células normales.....	115
1.2. La invasión de las células de adenocarcinoma de colon está regulada por la entrada capacitativa de Ca^{2+}	118
1.3. Liberación y entrada de Ca^{2+} inducida por agonistas fisiológicos en células normales y tumorales de colon	119
1.4. El contenido de Ca^{2+} en los depósitos es menor en las células tumorales que en las células normales de colon.....	123
1.5. El vaciamiento de los depósitos inducido por ATP es superior en las células tumorales que en las normales.....	124
1.6. Las células tumorales de colon son más resistentes a la muerte que las células normales.....	126
1.7. El potencial de membrana y la $[Ca^{2+}]$ basal en el citosol son mayores en las células de adenocarcinoma de colon que en las células normales.....	128
1.8. La captación mitocondrial de Ca^{2+} en las células tumorales de colon es superior a la de las células normales	129
1.9. Los niveles de expresión de <i>MCU</i> y <i>MICU1</i> no varía entre células normales y tumorales de colon.....	132
1.10. Las mitocondrias de las células tumorales están hiperpolarizadas	133
2. Estudio de las corrientes iónicas operadas por depósitos de células normales y tumorales de colon.....	135

3. Bases moleculares del remodelado de la entrada capacitativa de Ca²⁺	140
3.1. Expresión de los posibles componentes moleculares de la entrada capacitativa de Ca²⁺ en células normales y tumorales de colon a nivel de mRNA	140
3.2. Expresión de los posibles componentes moleculares de la entrada capacitativa de Ca²⁺ en células normales y tumorales de colon a nivel de proteína	143
4. Efecto del silenciamiento de los canales y sensores de Ca²⁺ implicados en el remodelado sobre la entrada de Ca²⁺, las corrientes operadas por depósitos y los depósitos de Ca²⁺	147
4.1. ORAI1, y no TRPC1, participa en la entrada capacitativa de Ca²⁺ y la I_{soc} de los colonocitos normales	147
4.2. STIM1 y STIM2 están implicados en la entrada capacitativa de Ca²⁺ de las células normales de colon	150
4.3. Solo ORAI1, y no ORAI2, ORAI3 ni TRPC1, está implicado en la entrada capacitativa de Ca²⁺ de las células de adenocarcinoma de colon	152
4.4. ORAI1 y TRPC1 intervienen en la I_{soc} de las células tumorales de colon	156
4.5. Papel de STIM1 y STIM2 en la entrada capacitativa de Ca²⁺ de las células tumorales de colon	158
4.6. STIM2 participa en la regulación del contenido de Ca²⁺ de los depósitos y en la resistencia a la muerte celular	160
V. DISCUSIÓN	163
VI. CONCLUSIONES	177
VII. REFERENCIAS	181

ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$	Potencial de la membrana plasmática
$\Delta\Psi_{mit}$	Potencial de membrana mitocondrial
ATP	Adenosín trifosfato
AEQ	Aequorina
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (en español, ácido desoxirribonucleico)
Ca^{2+}	Ión de calcio
$[Ca^{2+}]$	Concentración de Ca^{2+}
$[Ca^{2+}]_c$	Concentración de Ca^{2+} citosólica
$[Ca^{2+}]_{mit}$	Concentración de Ca^{2+} mitocondrial
$[Ca^{2+}]_{RE}$	Concentración de Ca^{2+} del retículo endoplásmico
CaM	Calmodulina
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (en español, ADN complementario)
CPA	<i>Cyclopiazonic acid</i> (en español, ácido ciclopiazónico)
CRAC	<i>Ca²⁺ release-activated channel</i> (en español, canal activado por la liberación de Ca^{2+})
ECC	Entrada capacitativa de Ca^{2+}
EDTA	Acido etilenglicol-diamino-tetra-acetico
EEM	Error estándar de la media
EGTA	Acido etilenglicol-bis-(b-aminoetil-eter)-N,N,N',N'-tetra-acetico
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (en español, suero bovino fetal)
FITC	<i>Fluorecein isothiocyanate</i> (en español, isotiocianato de fluoresceína)
GFP	<i>Green fluorecent protein</i> (en español, proteína fluorescente verde)
I_{CRAC}	<i>Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current</i> (en español, corriente de Ca^{2+} activada por la liberación de Ca^{2+})
IP_3	<i>Inositol 1,4,5-triphosphate</i> (en español, inositol 1,4,5-trifosfato)
IP_3R	<i>Inositol 1,4,5-triphosphate receptor</i> (en español, receptor de inositol 1,4,5-trifosfato)
I_{soc}	<i>Store-operated Ca²⁺ current</i> (en español, corriente de Ca^{2+} operada por depósitos)
MCU	<i>Mitochondrial Ca²⁺ uniporter</i> (en español, uniportador de Ca^{2+} mitocondrial)
MEC	Medio externo completo
mHCX	<i>Mitochondrial H⁺/Ca²⁺ exchanger</i> (en español, intercambiador H^+/Ca^{2+} mitocondrial)
MICU1	<i>Mitochondrial Ca²⁺ uptake 1</i>
MMR	<i>Missmach repair</i> (en español, reparación de apareamientos erróneos)

ABREVIATURAS

mNCX	<i>Mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger</i> (en español, intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ mitocondrial)
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (en español, ARN mensajero)
NCX	<i>Na⁺/Ca²⁺ exchanger</i> (en español, intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺)
NCKX	<i>Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchanger</i> (en español, intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ -K ⁺)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (en español, tampón fosfato salino)
PI	<i>Propidium iodide</i> (en español, yoduro de propidio)
PKA	Proteína quinasa A
PKB	Proteína quinasa B
PMCA	<i>Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase</i> (en español, ATPasa de Ca ²⁺ de la membrana plasmática)
PTP	Permeability transition pore (en español, poro de permeabilidad transitoria)
qRT-PCR	<i>quantitative RT-PCR</i> (en español, RT-PCR cuantitativa)
RE	Retículo endoplásmico
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (en español, ácido ribonucleico)
ROC	<i>Receptor-operated calcium channel</i> (en español, canal de Ca ²⁺ operado por receptor)
RT-PCR	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i> (en español, reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa)
RyR	<i>Ryanodine Receptor</i> (en español, receptor de rianodina)
SERCA	<i>Sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase</i> (en español, ATPasa de Ca ²⁺ del retículo sarcoplásmico o endoplásmico)
siRNA	<i>Small interfering RNA</i> (en español, ARN pequeño de interferencia)
SMOC	<i>Second messenger-operated Ca²⁺ channel</i> (en español, canal de Ca ²⁺ operado por segundo mensajero)
SOC	<i>Store-operated Ca²⁺ channel</i> (en español, canal de Ca ²⁺ operado por depósitos)
SOCE	<i>Store-operated Ca²⁺ entry</i> (en español, entrada de Ca ²⁺ operada por depósitos)
SPCA	<i>Secretory pathway Ca²⁺ ATPase</i> (en español, ATPasa de Ca ²⁺ de la vía secretora)
TBH	2,5-di(tert-butil)-1,4-benzohidroquinona
TMRM	Tetrametilrodamina metil éster
VOC	<i>Voltage-operated Ca²⁺ channel</i> (en español, canal de Ca ²⁺ operado por voltaje)
VOCE	<i>Voltage-operated Ca²⁺ entry</i> (en español, entrada de Ca ²⁺ operada por depósitos)

I. INTRODUCCIÓN

1. Cáncer colorrectal: Aspectos generales

El cáncer colorrectal es el tercer cáncer más común y la cuarta causa de muerte por cáncer en el mundo. Cada año, se registran más de 1,3 millones de nuevos casos y unas 700.000 muertes (Ferlay *et al.*, 2015). Su incidencia es baja hasta los 50 años, pero aumenta notablemente con la edad (Siegel *et al.*, 2012). Las regiones con mayor incidencia son Europa, América del Norte y Oceanía, mientras que la incidencia es baja en países del sur y centro de Asia, así como en África (Center *et al.*, 2009). En España, el cáncer colorrectal en hombres es el tercero más frecuente, por detrás del cáncer de pulmón y de próstata, y en mujeres el segundo, por detrás del cáncer de mama. Sin embargo, teniendo en cuenta ambos sexos, el cáncer colorrectal es el de mayor incidencia de todos (15%) con más de 32.000 nuevos casos al año. Además, se trata segunda causa de muerte por cáncer en nuestro país con casi 15.000 muertes al año, por detrás del cáncer de pulmón (Fig. 1) (GLOBOCAN 2012).

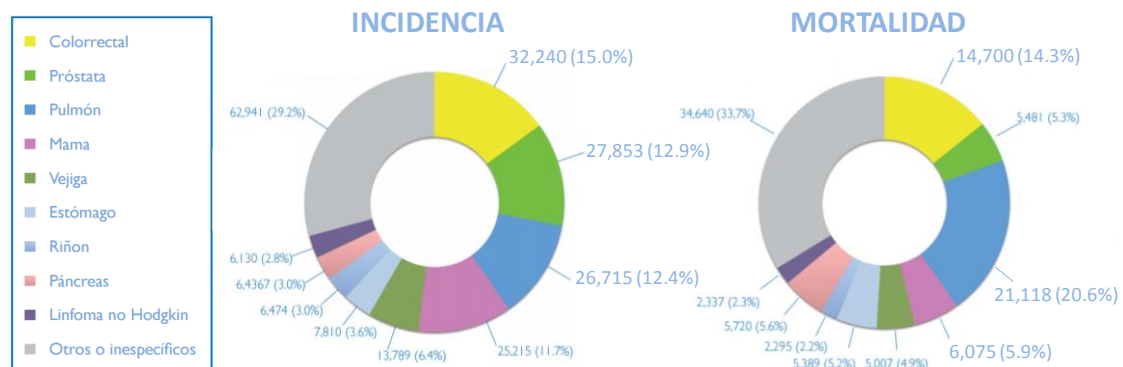


Figura 1. Incidencia y mortalidad en ambos sexos de los tumores más frecuentes en España (2014).
Figura tomada de la Sociedad Española de Oncología Médica (www.seom.org).

El pronóstico de los pacientes ha mejorado lentamente, pero de manera constante en las últimas décadas en muchos países, pero se ha estancado en otros. Por ejemplo, en países como Australia, Canadá y Estados Unidos la supervivencia a 5 años ha alcanzado casi el 65%, mientras que en otros países de Europa se ha mantenido en algo menos del 50%. La supervivencia relativa disminuye con la edad y en pacientes jóvenes ésta es mayor en mujeres que en hombres. Además de la edad y del sexo, hay otros factores de riesgo del cáncer colorrectal que han sido identificados en estudios epidemiológicos. Así, se han considerado como factores de riesgo el presentar antecedentes familiares de este tipo de cáncer, padecer alguna enfermedad inflamatoria intestinal, el tabaco, el consumo excesivo de alcohol, el abuso de las carnes rojas, la obesidad y la diabetes. Algunos estudios sugieren que la exposición a determinados agentes infecciosos como *Helicobacter pylori*, también, incrementa el riesgo de padecer cáncer colorrectal. Por otro lado, se han descrito como factores preventivos de esta enfermedad: la actividad física, la terapia de reemplazo hormonal, la endoscopia para eliminar lesiones precancerosas y el tratamiento con aspirina. Esta última, reduce el riesgo de padecer

I. INTRODUCCIÓN

cáncer colorrectal en un 20-30 %, aunque en algunas formas familiares de cáncer colorrectal puede reducir la incidencia hasta un 50% según un reciente estudio clínico (Burn *et al.*, 2011). Además, se ha observado que una dieta rica en frutas, verduras, cereales y/o pescado puede proteger frente a este tipo de cáncer (Brenner *et al.*, 2014).

El primer cambio patológico que da lugar al cáncer de colon es la formación de un adenoma, un tumor benigno generado a partir del epitelio. Primero, se produce la formación de un microadenoma como consecuencia generalmente de la mutación en el gen *APC* (del inglés, *adenomatous polyposis coli*) o de la metilación del DNA. A continuación, una mutación en el oncogen *KRAS* o en el gen de la ciclooxygenasa-2 (*COX2*) puede provocar la expansión del adenoma. Además, la pérdida del gen supresor tumoral *TP53* o del brazo largo del cromosoma 18 que incluye genes como *SMAD4*, otro gen supresor de tumores, conducen a la formación del carcinoma. Por último, una serie de mutaciones, entre ellas, una mutación que produce la pérdida del gen supresor de metástasis *AES* pueden dar lugar a un carcinoma metastático (Fig. 2) (Taketo, 2012).

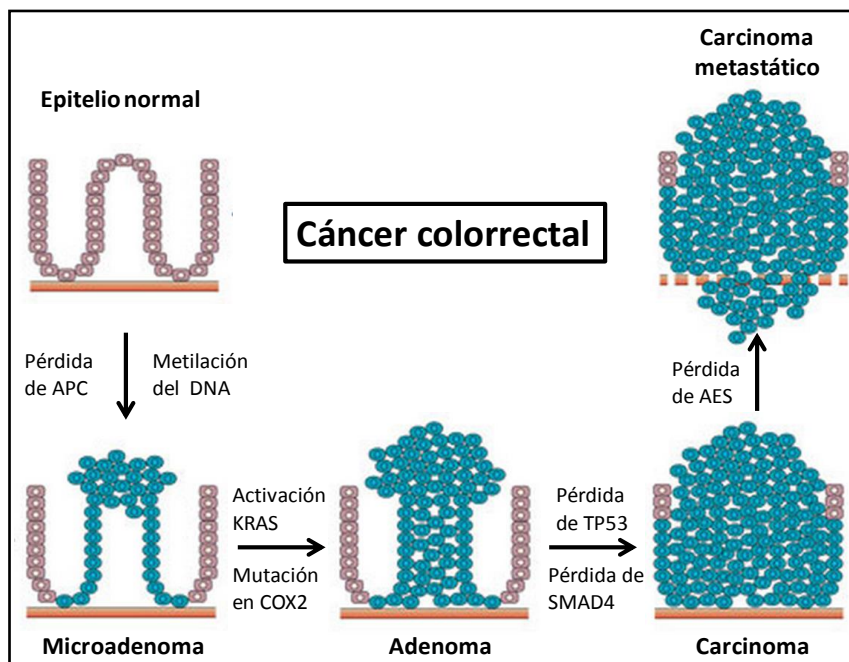


Figura 2. Progresión del cáncer colorectal desde su origen en el epitelio normal hasta la formación del carcinoma y su posterior metástasis. Figura modificada de Davies *et al.*, 2005.

Al menos el 25% de los casos de cáncer de colon están asociados con la historia familiar de los pacientes. Alrededor de un 5% se han relacionado con la presencia de un síndrome hereditario de esta enfermedad (Gala y Chung, 2013). Uno de estos síndromes es la poliposis adenomatosa familiar caracterizada por la presencia de cientos o miles de pólipos colorrectales adenomatosos que se desarrollan a partir de la segunda década de vida de los

pacientes. El 1% de los casos de cáncer colorrectal son provocados por éste síndrome. Éstos presentan prácticamente un 100% de riesgo de desarrollar el cáncer si no son tratados, por lo que su diagnóstico es muy importante. Es heredado de forma autosómica dominante y resulta de una mutación en la línea germinal del gen *APC*. Se han reportado más de mil mutaciones del gen *APC* que causan este síndrome dando lugar a una proteína truncada. La proteína APC se trata de un supresor tumoral de la vía de señalización de Wnt que regula la degradación de la β -catenina que actúa como un factor de transcripción para diversos genes implicados en la proliferación celular. Por tanto, la mutación en el gen *APC* conduce a la acumulación de la proteína oncogénica β -catenina, lo que puede dar lugar al cáncer si se acompaña de otras mutaciones (Half *et al.*, 2009). Otro síndrome estudiado es la poliposis asociada a *MUTYH*, denominado así debido a que es causado por una mutación bialélica en la línea germinal del gen *MUTYH* implicado en la reparación del DNA a través de la escisión de bases. Se hereda de manera autosómica recesiva. El 30% de los pacientes que lo padecen desarrollan pólipos en la parte superior del tracto digestivo y presentan un 80% de riesgo de desarrollar cáncer de colon (Bogaert y Prenen, 2014). El síndrome más común es el cáncer colorrectal no polipósico hereditario, también conocido como síndrome de Lynch. Entre el 2 y el 5% de los casos de cáncer colorrectal son atribuidos a éste síndrome. También, se trata de un factor de riesgo para padecer otro tipo de cánceres como el de endometrio. El síndrome de Lynch presenta una herencia autosómica dominante, al igual que el anterior, y es causado por una mutación en la vía germinal en algunos de los genes de reparación de apareamientos erróneos en el DNA (MMR, del inglés, *mismatch repair*) como *MSH2* y *MLH1*, lo que provoca una acumulación de mutaciones en microsatélites. Las mutaciones se producen en los microsatélites, ya que son repeticiones de uno a seis pares de bases de longitud que durante la replicación son susceptibles de sufrir desapareamiento (Vasen *et al.*, 2005; Akrami, 2006).

Sin embargo, la mayoría de los casos de cáncer colorrectal, del 70 al 85%, son considerados esporádicos, es decir, los pacientes no presentan riesgos genéticos conocidos asociados. Su desarrollo se supone debido principalmente a la dieta, al estilo de vida, a determinados factores ambientales y a la acumulación de diversas mutaciones somáticas adquiridas. Asimismo, existen varias vías genéticas implicadas en el desarrollo del cáncer de colon esporádico (Mundade *et al.*, 2014). Una de las vías es la de la inestabilidad cromosómica (CIN; del inglés, *chromosomal instability*), la cual puede tener lugar por un desequilibrio en el número de cromosomas (aneuploidía) o por una pérdida de heterocigosidad. Sugiere que tienen lugar una serie de mutaciones que activan oncogenes como *KRAS*, *SRC* y *MYC* e inactivan genes supresores de tumores como el *APC* y *TP53*. También, puede producirse por la pérdida de heterocigosidad del brazo largo del cromosoma 18 (Pino y Chung, 2010; Mundade *et al.*, 2014). Otra de las vías es la inestabilidad de microsatélites (MIS; del inglés *microsatellite instability*) que se produce por la inactivación de genes implicados en la reparación del DNA MMR, lo que da lugar a la acumulación de mutaciones en microsatélites. La inactivación de los genes MMR puede ser debida a una hipermetilación del promotor de alguno de estos genes,

normalmente *MLH1*, o a mutaciones puntuales. Entre los primeros eventos que tienen lugar en esta vía está la pérdida de función del gen *APC* al igual que en la vía anterior. La inactivación de los genes MMR puede provocar mutaciones en otros genes implicados en la proliferación celular como el gen de *TGFβRII* (del inglés; *transforming growth factor β receptor II*) o en la apoptosis como el gen *BAX*. (Geiersbach *et al.*, 2011). Una tercera vía implicada en la aparición del cáncer de colon esporádico es la vía serrada que, a diferencia de las dos anteriores, no se inicia por la mutación en el gen *APC*. Su nombre se debe al aspecto morfológico de las lesiones precursoras que se originan por el desarrollo de esta vía. Se caracteriza por la presencia de una mutación en el gen *BRAF* (del inglés, *protein kinase B-Raf*) que codifica para una proteína RAF quinasa, la cual tiene un papel importante en la regulación de señalización de las proteínas MAPKs y ERKs. Estas proteínas participan en la división y diferenciación celular, así como en procesos de secreción. En esta vía, también, se produce un silenciamiento epigenético, debido a una metilación aberrante del DNA, de genes relacionados con la diferenciación celular, la reparación del DNA y el control de ciclo celular como *CDKN2A* y *TP53*, ambos supresores tumorales (Legget y Withehall, 2010; Rustgi, 2013, Mundade *et al.*, 2014).

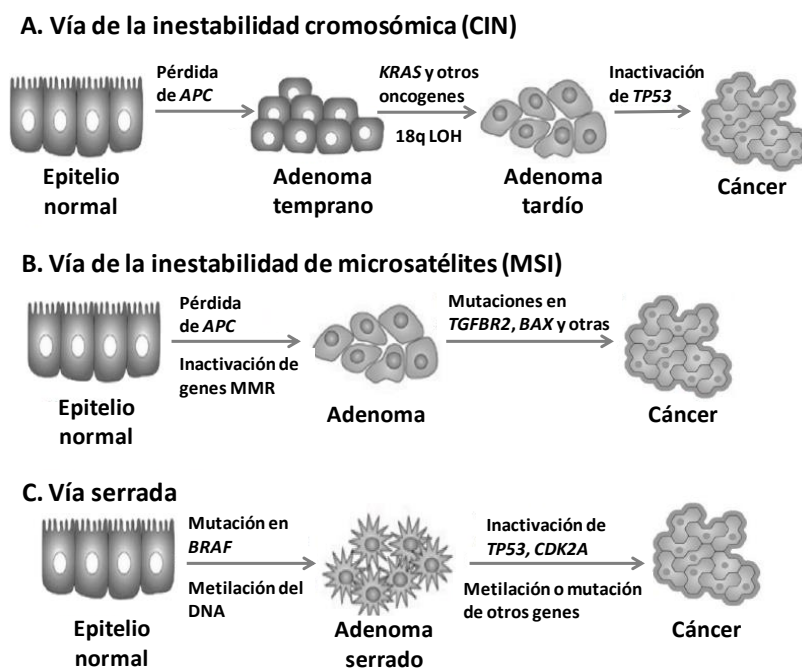


Figura 3. Vías genéticas implicadas en el desarrollo de cáncer de colon esporádico. A. La vía de la inestabilidad cromosómica (CIN) presenta como un primer paso la pérdida de *APC* lo que da lugar a la formación de un adenoma temprano. A continuación, el adenoma temprano se transforma en un adenoma tardío tras la mutación de oncogenes como *KRAS* o la pérdida de heterocigosidad del brazo largo del cromosoma 18. La inactivación de *TP53* puede ser un mecanismo clave en el desarrollo del cáncer. B. La vía de la inestabilidad de microsatélites (MSI) puede comenzar con la inactivación de genes implicados en la reparación de apareamientos erróneos del DNA (MMR), así como con la pérdida de *APC*. Las mutaciones en genes como *TGFBR2* y *BAX* están implicadas en el paso de adenoma a cáncer. C. La vía serrada se caracteriza por la formación de un adenoma serrado a consecuencia de la presencia de mutaciones en *BRAF* y de metilaciones en el DNA. La inactivación de genes como *TP53* y *CDK2A*, así como la metilación o mutación de otros genes conducen a la aparición del cáncer colorrectal. Figura modificada de Mundade *et al.*, 2014.

2. Homeostasis y señalización del Ca^{2+} subcelular

El Ca^{2+} juega un papel esencial en infinidad de procesos fisiológicos, puesto que interviene en numerosas vías de señalización donde actúa como uno de los segundos mensajeros más versátiles de la célula. Esta peculiar e importante característica es debida a que el Ca^{2+} tiene la capacidad de alterar campos electrostáticos dando lugar a numerosos cambios conformacionales en el interior de las proteínas (Clapham, 2007). Por ello, el estudio de su homeostasis es de vital importancia para conocer en detalle el funcionamiento y la regulación de las reacciones que tienen lugar en la célula (Petersen *et al.*, 2005). Así, el Ca^{2+} es capaz de regular desde procesos intracelulares tales como la exocitosis, que se produce durante la transmisión sináptica y para la que se necesita un rango de acción de milisegundos, hasta la proliferación celular o la expresión de una amplia variedad de genes, donde el rango de acción puede oscilar entre horas y días. Además, participa en la contracción muscular, la movilidad celular, la fertilización, la muerte celular o la plasticidad sináptica entre otros procesos (Petersen y Burdakova, 2002; Petersen *et al.*, 2005). Otro papel esencial del Ca^{2+} consiste en la activación de algunas de las enzimas del ciclo de Krebs, por lo que va a permitir regular el metabolismo energético de la célula (Rizzuto *et al.*, 2004). Todos estos procesos tienen lugar a consecuencia de las variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ citosólica ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$) caracterizados por su amplitud, duración, frecuencia y localización (Berridge *et al.*, 2000).

Al contrario que en el caso de la mayoría de los segundos mensajeros el Ca^{2+} no es metabolizable por la célula, por lo que el estudio de su señalización se centra, fundamentalmente, en su transporte hacia el citosol que tiene lugar tanto desde el exterior celular como desde los depósitos, principalmente, desde el retículo endoplásmico (RE). La entrada del Ca^{2+} en la célula desde el exterior está favorecida por un enorme gradiente electroquímico. Esto se debe a que en el exterior celular su concentración oscila entre 1 y 2 mM, sin embargo, en el citosol, ésta se encuentra en torno a 100 nM cuando la célula está en reposo. En un principio, se cree que la célula intentaba extraer el Ca^{2+} del citosol para que no precipitara junto con el fosfato, ya que su unión con el agua es bastante más débil que en el caso de otros iones divalentes como el Mg^{2+} (Clapham, 2007). Además del gradiente de concentración, cabe destacar que la membrana plasmática presenta un potencial negativo en su parte intracelular. En presencia de un estímulo la concentración citosólica puede verse incrementada de forma transitoria o durante períodos de tiempo prolongados dependiendo de la naturaleza de éste (Petersen y Burdakova, 2002). Por otro lado, la liberación de Ca^{2+} desde el RE se produce a favor de gradiente de concentración. Esto es debido a que el RE presenta, en reposo, concentraciones de Ca^{2+} similares a las del exterior celular, es decir, de 1-2 mM (de la Fuente *et al.*, 2013), por lo que es considerado el mayor depósito intracelular de este ión. En la célula existen otros compartimentos vesiculares que tienen capacidad de acumular grandes cantidades de Ca^{2+} y pueden liberarlo bajo determinadas condiciones como son el aparato de Golgi, granulos de secreción, lisosomas y vesículas endocíticas (Rizzuto y Pozzan *et al.*, 2006).

Sin embargo, en otros orgánulos subcelulares como en las mitocondrias y en el núcleo, la $[Ca^{2+}]$ es similar a la del citosol pudiendo incrementarse tan solo de manera transitoria tras la llegada de un estímulo (Montero *et al.*, 2000; Chamero *et al.*, 2002).

El incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ de la célula como consecuencia de la llegada de un estímulo tiene lugar, principalmente, a través de canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCs; del inglés, *Voltage-Operated Ca^{2+} Channels*) (Tsien, 1983; Triggler, 1990; Felix, 2005), por receptor (ROCs; del inglés *Receptor-Operated Ca^{2+} Channels*) (Bertolino y Linás, 1992), por segundo mensajero (SMOCs; *Second Messenger-Operated Ca^{2+} Channels*) (Sage, 1992) u otros canales operados por depósitos (SOCs; del inglés, *Store-Operated Ca^{2+} Channels*) (Parekh y Putney, 2005). Todos estos canales se encuentran situados en la membrana plasmática y se encargan de introducir Ca^{2+} en la célula desde el exterior celular. En los depósitos de Ca^{2+} se encuentran otra serie de canales de Ca^{2+} , entre los que destacan el receptor de IP_3 (IP_3R ; del inglés, *Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor*) (Joseph, 1996; Mikoshiba, 2007) y el receptor de rianodina (RyR; del inglés, *Ryanodine Receptor*) (McPherson y Campbell, 1993). Otro canal importante implicado en el control de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular es el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU; del inglés, *Mitochondrial Ca^{2+} Uniporter*) que permite su entrada en la matriz mitocondrial a favor de gradiente electroquímico (Patron *et al.*, 2013). Así, en torno a las fuentes de Ca^{2+} , la mitocondria constituye el principal sistema de retirada de éste desde el citosol tras la activación celular, al menos en algunos tipos celulares (Montero *et al.*, 2000; Villalobos *et al.*, 2002).

El desarrollo y la mejora de las técnicas de registro de Ca^{2+} intracelular han permitido estudiar en la célula la formación de microdominios de este ión. El término microdominio de Ca^{2+} se puede definir como cualquier incremento de Ca^{2+} localizado tan solo en una determinada región de la célula que puede estar próxima a canales de Ca^{2+} tanto de la membrana plasmática como de los depósitos intracelulares. La formación de microdominios de Ca^{2+} va a permitir reclutar determinados efectores para llevar a cabo acciones específicas en diferentes regiones celulares (Berridge, 2006).

Por otra parte, es importante mantener una $[Ca^{2+}]$ basal en el citosol tras la finalización del estímulo (Rizzuto y Pozzan, 2006), ya que un aumento prolongado puede dañar la célula de forma irreversible debido, precisamente, a la imposibilidad de su degradación. Para ello, la célula cuenta con sistemas de transporte, bombas e intercambiadores, capaces de transportar de forma activa este ión al medio extracelular o a los depósitos de Ca^{2+} . Entre las bombas destaca la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA; del inglés, *Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase*) que transporta Ca^{2+} desde el interior de la célula al medio extracelular (Guerini *et al.*, 1998). En los depósitos de Ca^{2+} destacan otras dos ATPasas de Ca^{2+} que introducen Ca^{2+} en su interior, la SERCA (del inglés, *Sarcoplasmic or Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase*) y la SPCA (del inglés, *Secretory pathway Ca^{2+} ATPase*) (Wuytack *et al.*, 2002). Además de estos sistemas de extrusión, la célula presenta una serie de proteínas que actúan como tampones de Ca^{2+} , se

unen al Ca^{2+} con distinta afinidad, puesto que contienen dominios mano EF. Estas proteínas pueden localizarse en el citosol como la calbindina, la calretinina y la parvalbúmina, sin embargo, otras aparecen en orgánulos subcelulares como el RE, por ejemplo, la calnexina, la calreticulina y la calsequestrina (Berridge *et al.*, 2003). Algunas proteínas que unen Ca^{2+} , entre las que destaca la calmodulina (CaM), son clave, también, en los procesos de señalización celular actuando como proteínas efectoras. Para ello, la calmodulina contiene cuatro dominios mano EF y presenta la capacidad de interactuar con cientos de proteínas (Clapham, 2007).

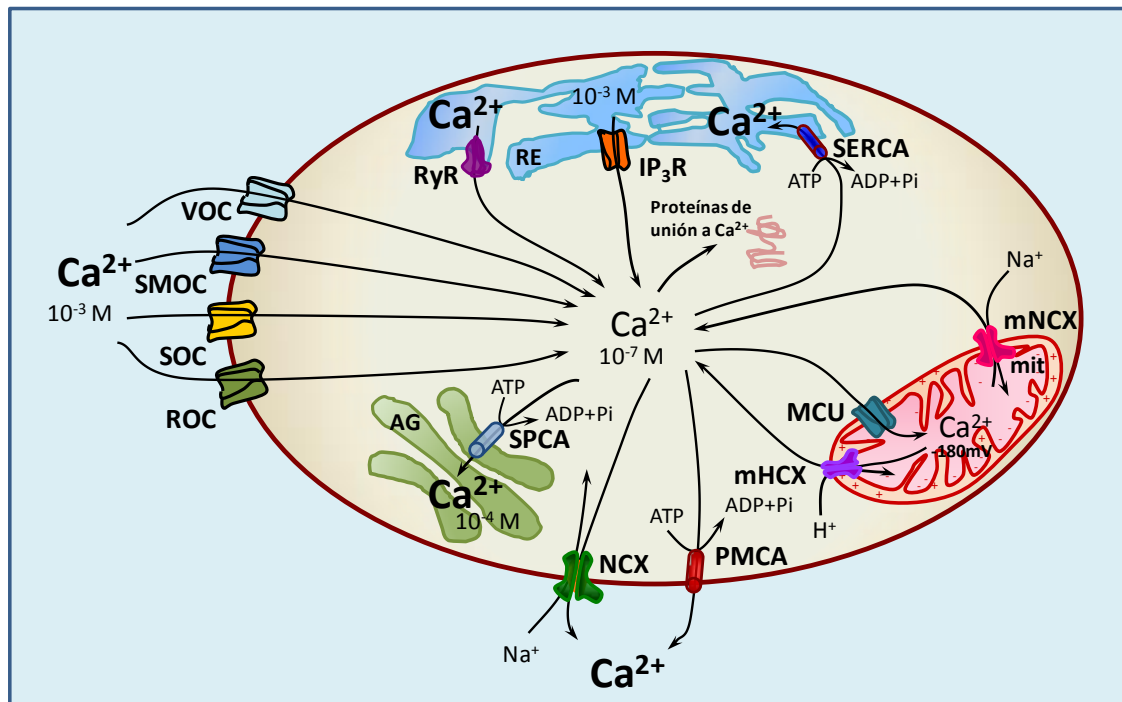


Figura 4. Homeostasis del Ca^{2+} intracelular. La $[\text{Ca}^{2+}]_c$ es aproximadamente tan solo de 100 nM, mientras que en el exterior es de 1 mM. Como consecuencia, el Ca^{2+} entra en el citosol a favor de gradiente de concentración a través de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCs), por segundos mensajeros (SMOCs), por depósitos (SOCs) o por receptor (ROCs) y es transportado hacia el exterior celular en contra de gradiente por medio de la bomba de Ca^{2+} PMCA y del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) situados en la membrana plasmática. El Ca^{2+} puede ser liberado desde el retículo endoplásmico, cuya $[\text{Ca}^{2+}]$ es similar a la del exterior celular, a través de los receptores de rianodina (RyR) y de IP_3 (IP_3R) y es reintroducido en este orgánulo por medio de la bomba de Ca^{2+} SERCA. En otros depósitos de Ca^{2+} como el aparato de Golgi se encuentra la SPCA, otra bomba que introduce Ca^{2+} en su interior. La mitocondria capta Ca^{2+} en su matriz a través del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU) gracias al valor tan negativo del potencial de membrana de la mitocondria (-180 mV). En cambio, el Ca^{2+} es transportado al exterior de la matriz mitocondrial por medio de los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mNCX) y $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mHCX). En el citosol se encuentran proteínas de unión a Ca^{2+} que controlan, también la $[\text{Ca}^{2+}]_c$. RE: retículo endoplásmico. AG: aparato de Golgi. mit: mitocondria. Figura modificada de Carafoli, 2002.

La participación del Ca^{2+} en numerosos procesos celulares implica que la alteración de su homeostasis es responsable de la aparición de infinidad de patologías (Brini *et al.*, 2012). Así por ejemplo, la expresión anormal de la SERCA da lugar a una alteración en la acumulación de Ca^{2+} en los depósitos que va a conducir a un fallo cardíaco al disminuir la capacidad contráctil de los miocitos (del Monte *et al.*, 2001). También, el remodelado vascular que tiene lugar durante el desarrollo de la aterosclerosis y la reestenosis está caracterizado por cambios que afectan a infinidad de transportadores de Ca^{2+} como VOCs y SOCs (Beech., 2007; Muñoz *et al.*, 2013). La enfermedad de Alzheimer, por otro lado, está relacionada con una serie de alteraciones en las que se encuentran implicadas diversas proteínas relacionadas con la señalización de Ca^{2+} , como los receptores de glutamato, las presenilinas (Paula-Lima *et al.*, 2013) y los VOCs. Éstos últimos están implicados, también, en otras enfermedades neurodegenerativas como la demencia vascular y la enfermedad de Parkinson (Yagami *et al.*, 2012). Por último, el papel del Ca^{2+} en procesos como la proliferación, la migración, la invasión, la angiogénesis y la apoptosis no dejan lugar a dudas de su directa implicación en el desarrollo del cáncer, caracterizado en muchos casos por un remodelado de los distintos sistemas de transporte del Ca^{2+} en la célula entre los que destacan los SOCs (Monteith *et al.*, 2012).

3. Sistemas de transporte de Ca^{2+} en la célula

3.1. Membrana plasmática

3.1.1. Canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática

La membrana plasmática constituye una barrera entre el medio extracelular y el citosol, lo que va a permitir que la concentración de Ca^{2+} sea hasta 20.000 veces mayor en el primero que en el segundo (Clapham, 2007). Por tanto, una forma de incrementar la concentración de Ca^{2+} intracelular tras la llegada de un estímulo a la célula va a ser a través de la entrada de Ca^{2+} desde el exterior. Esta entrada se va a materializar por la existencia de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática. Los canales de Ca^{2+} se caracterizan por ser proteínas transmembranales ubicuas que permiten el flujo selectivo a Ca^{2+} a favor de gradiente electroquímico. Como mencionamos anteriormente, estos canales se pueden clasificar de acuerdo a su mecanismo de activación principalmente en canales de Ca^{2+} operados por voltaje, por receptor, por segundo mensajero o por depósitos (Fig. 5) (Parekh y Putney, 2005).

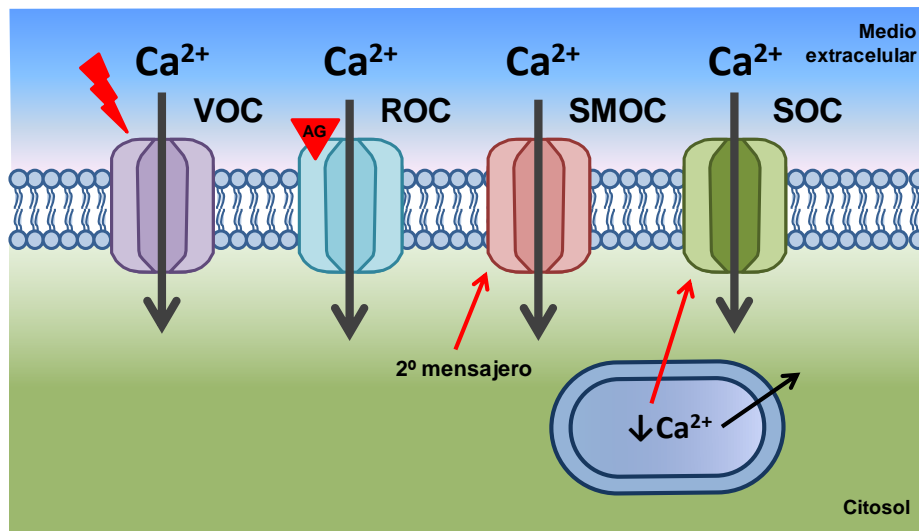


Figura 5. Canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática. Los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOC) son activados mediante la despolarización de la membrana, los canales de Ca^{2+} operados por receptor (ROC), por la unión de un agonista (AG), los canales de Ca^{2+} operados por segundo mensajero, por la acción de mensajeros intracelulares como nucleótidos cíclicos y compuestos derivados del metabolismo lipídico y los canales de Ca^{2+} operados por depósitos (SOC), por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} .

3.1.1.1. Canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCs)

Los canales de Ca^{2+} operados por voltaje están regulados por variaciones en el potencial de membrana de la célula. En general, permanecen cerrados cuando la membrana está hiperpolarizada y se abren con su despolarización. Estos canales se expresan principalmente en células excitables, pero también, aparecen en células no excitables. Entre las células excitables destacan las células del músculo esquelético, cardíaco y liso donde tienen un papel clave en la contracción muscular, así como las neuronas donde participan en la transmisión sináptica. Además, aparecen expresados en células endocrinas donde son importantes en la entrada de Ca^{2+} que desencadena la secreción hormonal. También, llevan a cabo procesos como la regulación de la actividad enzimática y la expresión génica en algunos tipos celulares (Catterall, 2011).

Los canales que median la entrada de Ca^{2+} operada por voltaje (VOCE; del inglés, *Voltage-Operated Ca^{2+} Entry*) pueden clasificarse desde un punto de vista funcional en: canales de bajo y alto umbral de activación. Los primeros, denominados tipo T (transitorios), son activados desde potenciales de membrana bastante negativos por pequeñas despolarizaciones. Por el contrario, los segundos se activan desde potenciales menos negativos que los anteriores y requieren una despolarización más intensa. Pueden ser tipo L (de larga duración), N (neuronal), P (en células de Purkinje), Q o R (residual). En el sistema cardiovascular los canales tipo L son esenciales para la contracción muscular (Catterall, 2000).

I. INTRODUCCIÓN

Los canales tipo T, en cambio, parece ser que participan en la proliferación en diferentes tejidos (Kuga *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2005; Lory *et al.*, 2006;).

A nivel molecular, estos canales de Ca^{2+} constituyen complejos de cuatro o cinco subunidades distintas codificadas por multitud de genes. La subunidad más característica es la α_1 , de alto peso molecular, en torno a los 200 kDa. Se trata de la subunidad que forma el poro del canal, incorporando, además el sensor de voltaje en el segmento S4, el cual permite la apertura del canal tras la despolarización, así como muchos de los sitios de regulación por segundos mensajeros, fármacos y toxinas. Hay varias subunidades α_1 que están codificadas por al menos 10 genes y van a permitir clasificar a los canales en tres grupos principales: Cav1 (tipo L), Cav2 (tipo N, P, Q/R) y Cav3 (tipo T). Así, por ejemplo, Cav1.2 (tipo L) posee una subunidad α_{1c} , mientras que Cav3.1 (tipo T) presenta una subunidad α_{1g} . También, la mayoría presentan una subunidad β intracelular, así como una α_2 , situada en el lado extracelular, y una δ que atraviesa la membrana. Por último, en el músculo esquelético ha sido encontrada una subunidad γ que pertenece a este tipo de canales (Fig. 6) (Catterall *et al.*, 2005).

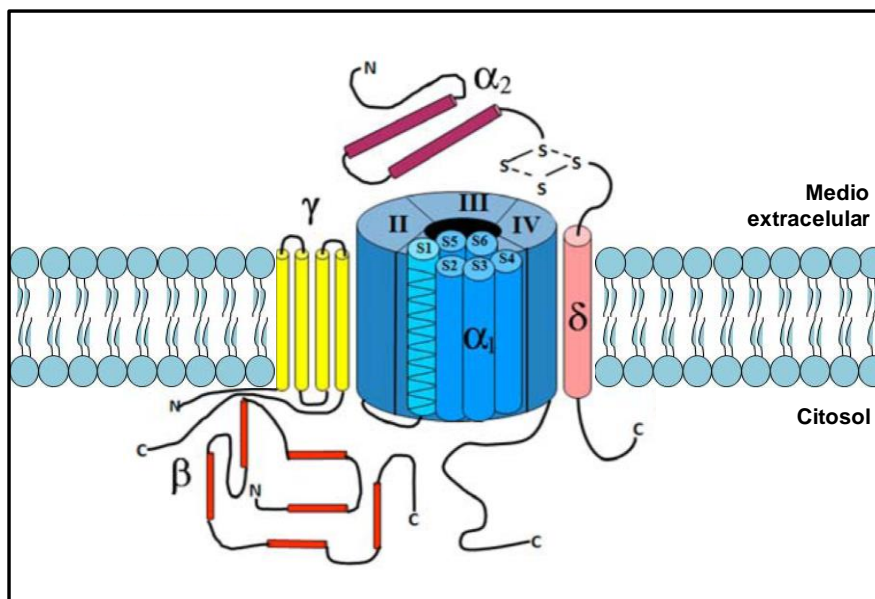


Figura 6. Estructura de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCs). El poro del canal lo forma la subunidad α_1 que se compone de 4 dominios homólogos (I-IV) formados cada uno por 6 hélices transmembrana (S1-S6). En el lado extracelular de la membrana plasmática se encuentra la subunidad α_2 y en el lado citosólico, la subunidad β . Además de la subunidad α_1 , en la membrana plasmática aparecen insertadas la subunidad γ y δ . Figura adaptada de Gurkoff *et al.*, 2013.

La alteración de la entrada de Ca^{2+} a través de los VOCs puede dar lugar al desarrollo de diferentes patologías. Así, parecen estar relacionados con enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis (Beech, 2007) y las arritmias cardíacas (Venetucci *et al.*, 2012). También, pueden cursar con enfermedades neurodegenerativas entre las que destacan la enfermedad

de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Yagami *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha sugerido un papel en desórdenes neurológicos como la esquizofrenia y la epilepsia (Siwek *et al.*, 2012). Además, se ha observado una elevada expresión tanto de los canales tipo L como de los tipo T en algunos tumores, lo que sugiere que pueden tener un papel en la tumorigénesis (Wang *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2008).

3.1.1.2. Canales de Ca^{2+} operados por receptor (ROCs)

Los canales de Ca^{2+} operados por receptor permiten la entrada de Ca^{2+} al citosol como consecuencia de la unión de un agonista externo, generalmente una hormona o un neurotransmisor (Sage, 1992; Berridge, 2014).

Entre los ROCs destacan los receptores purinérgicos P2X que permiten la entrada de Ca^{2+} tras la unión extracelular de su agonista, el ATP. El incremento de Ca^{2+} promovido por estos canales está estrechamente relacionado con la exocitosis y la secreción celular (Miklav *et al.*, 2013). Están ampliamente distribuidos, por lo que se han descrito funciones en neuronas, células gliales, hueso, músculo, endotelio, epitelio y células hematopoyéticas. Parecen estar involucrados en la propagación del impulso nervioso y, también, en la contracción muscular (Erb *et al.*, 2006). Estos canales tienen un papel importante en patologías como la enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes, isquemia, incluso en el desarrollo del cáncer (Burnstock, 2013) Además, participan en patologías del sistema nervioso como la enfermedad de Alzheimer y la de Parkinson (Diaz-Hernandez *et al.*, 2012).

Los receptores ionotrópicos nicotínicos se activan por la unión de la acetilcolina y de otros agonistas como la nicotina que les da su nombre. Son importantes tanto en la transmisión sináptica como en la unión neuromuscular, pero, también, participan en otras funciones en células no excitables como en la inmunidad (Berridge, 2014). Estos receptores están implicados en la esquizofrenia, epilepsia y también, en la enfermedad de Alzheimer (Stenlein y Bertrand, 2008). Además, se ha relacionado con el desarrollo de cáncer de pulmón y la adicción a la nicotina (Ambrosi y Becchetti, 2013).

Otros canales pertenecientes al grupo de los ROCs es la familia de receptores ionotrópicos del glutamato, los cuales se van a clasificar dependiendo del agonista que los active en receptores AMPA, NMDA o de kainato. Los receptores de glutamato llevan a cabo la transmisión sináptica excitatoria rápida y se expresan en neuronas y otras células del sistema nervioso central. Regulan un amplio espectro de procesos localizados en el cerebro, la espina dorsal, retina y en el sistema nervioso periférico. Estos canales participan en numerosas patologías nerviosas como son la enfermedad de Alzheimer, demencia vascular y enfermedad de Parkinson (Traynelis *et al.*, 2010).

3.1.1.3. Canales de Ca²⁺ operados por segundo mensajero (SMOCs)

Los canales de Ca²⁺ operados por segundo mensajero se activan a través de una señal difusible intracelular (Sage, 1992). Este grupo de canales pueden activarse por medio de nucleótidos cíclicos y mensajeros lipídicos como el diacilglicerol y ácido araquidónico (Parekh y Putney *et al.*, 2005).

Los canales activados por nucleótidos cíclicos juegan un papel importante en la transducción sensorial de señales visuales y olfatorias por lo que se ha observado su expresión tanto en los bastones de la retina como en los cilios olfatorios. Además, se expresan en otros órganos como el cerebro, los testículos y en el riñón. Se han relacionado con enfermedades como la retinitis pigmentosa y la acromatopsia (Berridge., 2014).

Algunos TRPCs como el TRPC2, TRPC3, TRPC6 se han considerado SMOCs, ya que en células nerviosas (neuronas y astrocitos) se ha observado que están regulados por diacilglicerol de manera independiente a la PKC (Grimaldi *et al.*, 2003; Lucas *et al.*, 2003; Beskina *et al.*, 2007). También, TRPC7 ha sido propuesto como un canal activado por diacilglicerol. Este canal presenta una gran homología con TRPC3 y TRPC6 y se expresa ampliamente en el sistema nervioso central, así como en algunos tejidos periféricos (Zhang y Trebak, 2014).

Los canales regulados por ácido araquidónico han sido identificados en células parótidas y acinares pancreáticas (Berridge, 2014). Aunque la entidad molecular de estos canales todavía está por dilucidar en los últimos años se ha propuesto que ORAI1 y ORAI3, canales de Ca²⁺ con una clara participación en la ECC, como posibles componentes del canal activado por ácido araquidónico (Shuttleworth, 2009).

3.1.1.4. Canales de Ca²⁺ operados por depósitos (SOCs)

Los canales de Ca²⁺ operados por depósitos se activan como consecuencia de una disminución del contenido de Ca²⁺ de los depósitos, en concreto del RE. La entrada de Ca²⁺ a través de este mecanismo se creyó que era principalmente para asegurar los niveles de Ca²⁺ del RE tan necesario en la síntesis y el plegamiento de las proteínas. Así, una bajada prolongada en los niveles de Ca²⁺ del RE puede provocar estrés de retículo y apoptosis. Sin embargo, más tarde, se ha observado que el Ca²⁺ que entra en la célula a través de estos canales está implicado en la señalización de distintos procesos. Entre las funciones de los SOCs destacan la exocitosis, regulación de la actividad enzimática, transcripción de diversos genes y la proliferación y la apoptosis. Los SOCs están ampliamente distribuidos y parecen tener un papel esencial en la fisiología de las células eucariotas. Se expresan tanto en células excitables como en no excitables, pero en estas últimas constituyen el mecanismo de entrada de Ca²⁺ más importante (Parekh y Putney, 2005).

Estos canales se pueden clasificar por sus características electrofisiológicas en dos grandes grupos. El mejor caracterizado es el de los canales CRAC (del inglés, *Ca²⁺ release-activated channel*) que permiten el paso de la corriente I_{CRAC} caracterizada por su independencia del voltaje, baja conductancia y alta selectividad a Ca^{2+} (Hoth y Penner, 1992). La entidad molecular de las proteínas que median la I_{CRAC} ha sido descubierta varios años después a la caracterización de la corriente y corresponde a las proteínas STIM y Orai (Peinelt *et al.*, 2006; Prakriya *et al.*, 2006). Otro grupo de canales sería los que median una corriente diferente a I_{CRAC} , que se caracteriza por su baja selectividad a Ca^{2+} . Entre estos canales estarían involucrados varios integrantes de la superfamilia de los TRPs (Salido *et al.*, 2009). Las características de los SOCs serán ampliamente tratadas en otro apartado más adelante.

La alteración de la entrada de Ca^{2+} a través de los SOCs está relacionada con un gran número de patologías debido a su importancia funcional y su amplia distribución. Por ejemplo, puede dar lugar a enfermedades como pancreatitis aguda, inmunodeficiencia primaria, neurofibromatosis y desordenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer. Además, por su papel en proliferación y apoptosis podría ser clave en el desarrollo de numerosos tipos de cáncer (Targos *et al.*, 2005).

3.1.2. Sistemas de extrusión de Ca^{2+} de la membrana plasmática

La extrusión del Ca^{2+} hacia el exterior de la célula es esencial para el mantenimiento de la concentración basal de Ca^{2+} del citosol, en especial, después de la llegada de un estímulo con el objeto de finalizar la señalización iniciada. Este cometido es llevado a cabo en contra de gradiente electroquímico principalmente a través de dos sistemas de transporte localizados en la membrana plasmática. Uno es el transporte a través de las bombas Ca^{2+} /ATPasas PMCA y el otro lo constituyen los intercambiadores Na^+ / Ca^{2+} y Na^+ / Ca^{2+} - K^+ (Rizzuto y Pozzan, 2006).

3.1.2.1. Bomba Ca^{2+} /ATPasa de la membrana plasmática (PMCA)

La PMCA se caracteriza por permitir la salida de Ca^{2+} hacia el exterior celular en contra del enorme gradiente electroquímico mediante el gasto de ATP. Consume una molécula de ATP por cada ión Ca^{2+} que transporta. Se expresa de manera ubicua. Pertenece a la familia de las ATPasas tipo P que se caracterizan por la formación de un intermediario aspartil fosfato durante la reacción de hidrólisis del ATP. Dentro de esta familia, se la considera miembro de la subfamilia P_{2B} . Presenta una alta afinidad por el Ca^{2+} , con una K_D de 0,2-0,5 μ M en condiciones óptimas de actividad (Carafoli, 1992; Brini y Carafoli, 2009).

La PMCA presenta una estructura de 10 segmentos transmembrana, con un par de lazos intracelulares y una cola extendida en el extremo carboxilo terminal que constituye un

dominio regulador por Ca^{2+} -CaM (Carafoli y Brini, 2000; Strehler y Zacharias, 2001; Brini y Carafoli, 2009). Se encuentra autoinhibida y, tras una elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, se incrementa la unión a CaM a través del dominio regulador que incrementa la actividad de la bomba (Strehler *et al.*, 2007). Las PMCA están codificadas por una familia de cuatro genes, *ATP2B1-4*, las cuales dan lugar a las isoformas PMCA1-4. Además, existen aproximadamente unas 30 variantes generadas por *splicing* alternativo que se expresan de manera específica en determinados tejidos y tipos celulares (Strehler y Zacharias, 2001).

Distintas alteraciones de la PMCA han sido ampliamente relacionadas con enfermedades como el cáncer, hipertensión, neurodegeneración, disfunciones cardíacas, sordera y ataxia cerebelar (Giacomello *et al.*, 2013; Brini *et al.*, 2013). Además, cambios en la expresión de la PCMA se han relacionado con algunos tipos de cáncer (Lee *et al.*, 2011).

3.1.2.2. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ transporta Ca^{2+} al exterior celular en contra de gradiente electroquímico aprovechando el gradiente de Na^+ . En concreto, intercambia un Ca^{2+} por cada tres Na^+ que se introducen al citosol a favor de gradiente electroquímico. Su afinidad por el Ca^{2+} es unas 10 veces menor que la de la PMCA, sin embargo presenta una capacidad de transporte mayor que ésta. De manera fisiológica, también, tiene la capacidad de funcionar de manera inversa, introduciendo Ca^{2+} al interior de la célula, dependiendo del gradiente electroquímico y del potencial de membrana (Philipson y Nicoll, 2000; Philipson *et al.*, 2002).

El intercambiador presenta 9 segmentos transmembrana con un lazo intracelular entre el quinto y el sexto que contiene, un dominio de inactivación por Na^+ , un dominio de *splicing* alternativo y dos dominios de unión a Ca^{2+} , lo que va a permitir que su función pueda ser regulada, también, por este ión. Tres genes codifican para el NCX, lo que va a dar lugar a tres isoformas (NCX1, 2 y 3) y, además, existen distintas variantes de *splicing* para NCX1 y NCX3 (Quednau *et al.*, 2004). Las distintas isoformas y sus variantes se expresan de manera específica de tejido regulando la fuerza contráctil del corazón, la memoria a largo plazo del cerebro, la presión sanguínea, la reabsorción de Ca^{2+} renal, la respuesta inmune, la secreción de insulina, incluso procesos celulares como la proliferación y la apoptosis. Como consecuencia de la gran cantidad de funciones en las que interviene, este transportador se ha relacionado con distintas patologías como arritmias, fallo cardíaco, isquemia cardíaca y cerebral, infarto e hipertensión entre otras (Khananshvili, 2013).

3.1.2.3. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$ (NCKX)

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$ extrae Ca^{2+} del citosol en contra de gradiente electroquímico favoreciéndose de los gradientes de Na^+ y K^+ . Transporta tres iones Ca^{2+} junto con un ión K^+ hacia el exterior celular e introduce 4 iones Na^+ (Altimimi y Snchetkamp, 2007).

Su estructura consiste en dos grupos de 5 segmentos transmembrana separados por un lazo intracelular. Está codificado por una familia de 5 genes que dan lugar a 5 isoformas y, además, se han descrito diversas variantes de *splicing* para algunas de ellas (Altimimi y Snchetkamp, 2007). Tienen un papel fisiológico en distintos procesos como la visión, ya que se expresan en conos y bastones; el olfato, la consolidación de la memoria y la pigmentación de la piel. Interviene en algunas patologías de la retina, así como en la hipertensión (Snchetkamp, 2013).

2.2. Depósitos intracelulares de Ca^{2+}

El Ca^{2+} puede ser almacenado en el interior de determinados orgánulos subcelulares que funcionan como depósitos con el objeto de controlar y mantener baja la concentración de este ión en el citosol. Además, el Ca^{2+} contenido en los depósitos puede ser liberado en respuesta a numerosos estímulos desencadenando diferentes procesos. Entre los depósitos de Ca^{2+} el mejor estudiado y el mayor almacén es el RE, una red de sáculos y túbulos continua con la membrana nuclear (Carafoli, 1987). El RE es capaz de alcanzar una $[\text{Ca}^{2+}]$, incluso, superior a 2 mM en alguna de sus regiones, pero aproximadamente la mitad del mismo presenta una $[\text{Ca}^{2+}]$ como máximo de 1 mM (de la Fuente *et al.*, 2013). El Ca^{2+} contenido en el RE, además, presenta un papel clave en las funciones de este compartimento, puesto que participa en el plegado, secreción y modificación postraduccional de las proteínas, en la síntesis de lípidos, en el estrés de RE y en la sensibilidad a la apoptosis (Michalak *et al.*, 2002; Corbett *et al.*, 2000). El RE en las células musculares toma el nombre de retículo sarcoplásmico y presenta ciertas peculiaridades adaptadas a la función de estas células (Sorrentino, 2004). Otro depósito que contribuye al incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ tras la llegada de un estímulo sería el aparato de Golgi (Missiaen *et al.*, 2004). Este compartimento de la vía secretora puede presentar concentraciones de Ca^{2+} libre similares a las del RE. En células HeLa se ha observado que puede presentar una concentración de 300 μM (Pinton *et al.*, 1998). Por último, diversos orgánulos que presentan un pH ácido pueden ser considerados depósitos de Ca^{2+} , principalmente vesículas de secreción, endosomas y lisosomas (Patel y Docampo, 2010).

El Ca^{2+} puede ser liberado de los depósitos principalmente a través de los receptores de IP_3 (IP_3Rs) y de los receptores de rianodina (RyR). Además, se ha descrito una salida pasiva de Ca^{2+} en reposo a través de los canales *leak* cuya identidad molecular no está todavía clara.

Para mantener la concentración de Ca^{2+} de los depósitos y oponerse a esa salida pasiva la célula presenta dos tipos de bombas, la SERCA y la SPCA (Rizzuto y Pozzan, 2006).

2.2.1. Canales de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares

2.2.1.1. Receptores de IP_3 (IP_3Rs)

La unión de IP_3 a los IP_3R permite la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos al citosol. El IP_3 es producido como consecuencia de la activación de receptores acoplados a proteína G y receptores tirosina quinasa. La estimulación de estos receptores da lugar a la activación de la enzima fosfolipasa C que hidroliza el fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) dando lugar a IP_3 y además, a diacilglicerol (DAG) (Fig. 7) (Banerjee y Hasan, 2005).

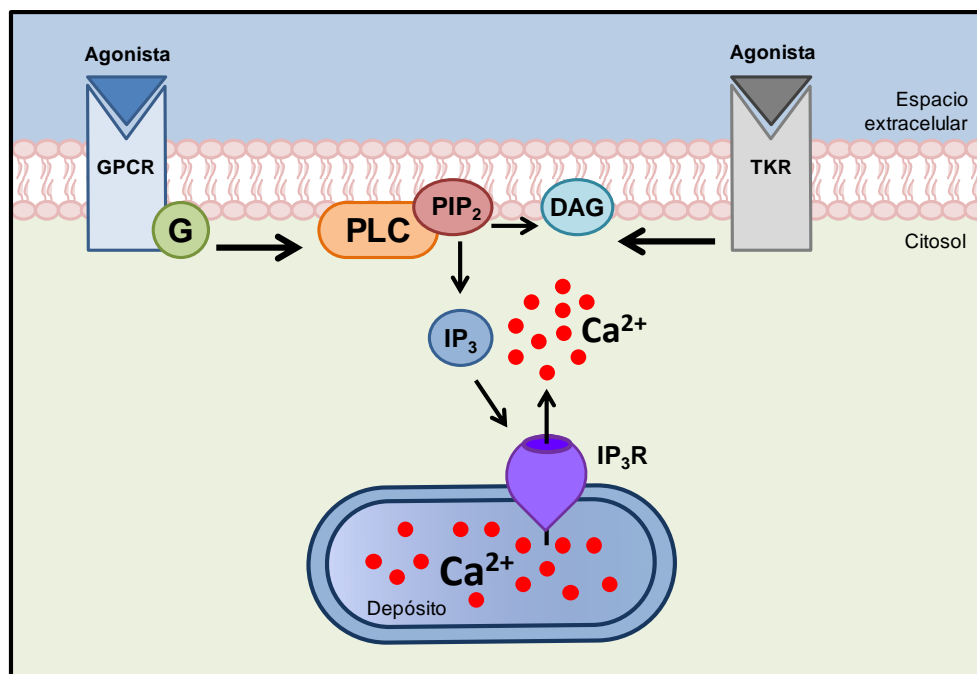


Figura 7. Activación de la liberación de Ca^{2+} a través del receptor de IP_3 (IP_3R). La estimulación de un receptor acoplado a proteína G (GPCR) o tirosina quinasa (TKR) por la unión de su agonista da lugar a la activación de la fosfolipasa C (PLC). Como consecuencia, la PLC hidroliza el fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) produciendo IP_3 y diacilglicerol (DAG). El IP_3 se une al IP_3R lo que provoca su activación dando lugar a la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos.

La expresión de estos receptores en el RE está clara, pero hay mayor controversia acerca su existencia en otros depósitos (Rizzuto y Pozzan, 2006). Algunos trabajos apoyan la expresión del IP_3R tanto en el aparato de Golgi (Pinton *et al.*, 1998; Missiaen *et al.*, 2001) como en vesículas de secreción (Gerasimenko *et al.*, 1996). Hay tres genes que codifican para los IP_3Rs , lo que da lugar a tres isoformas diferentes ($\text{IP}_3\text{R}1$, 2 y 3) con distintas variantes de

splicing. Estos canales pueden formar tanto homotetrámeros como heterotetrámeros (Patel *et al.*, 1999; Patterson *et al.*, 2004). La mayoría de los tipos celulares expresan más de una isoforma y su distribución en el interior celular va a estar condicionada por la función fisiológica que desempeñan (Vermassen *et al.*, 2004).

Los IP₃Rs presentan una estructura común de seis dominios transmembrana (TM1-6) y entre el TM5 y el TM6 se encuentra el dominio que forma el poro. Unido al TM1 aparece el extremo N-terminal citosólico caracterizado por su enorme longitud y por presentar el dominio donde se une el IP₃. Este extremo se encuentra unido al TM1 por medio de un dominio regulador donde ciertas moléculas que modulan la liberación del Ca²⁺ van a interactuar con el receptor. En su lado citosólico, también, contiene un extremo C-terminal más corto (Fig. 8). El canal funcional parece estar constituido por homo y heterotetrámeros (Taylor *et al.*, 2004).

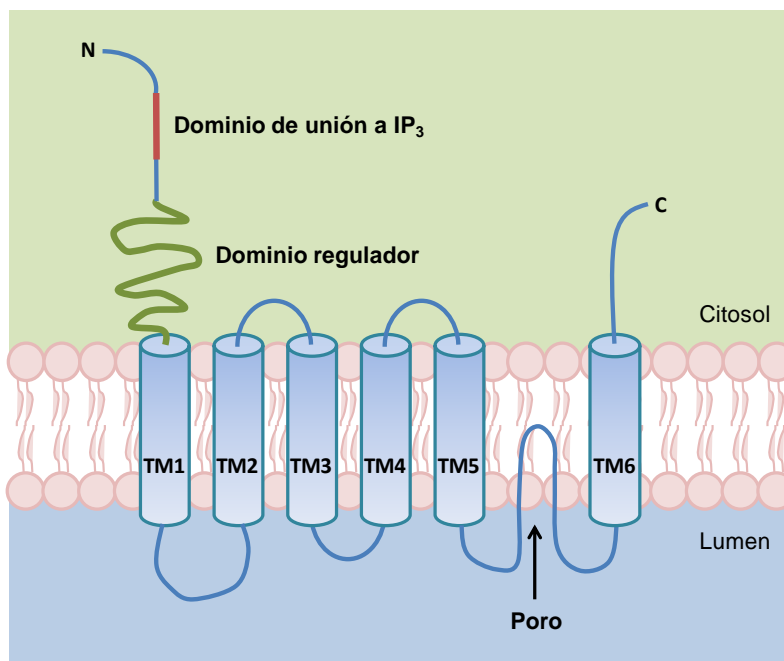


Figura 8. Estructura y topología del receptor de IP₃ (IP₃R). El IP₃R se encuentra insertado en la membrana de depósitos de Ca²⁺ como el RE. Presenta 6 dominios transmembrana (TM1-6) y los extremos N-terminal y C-terminal se localizan en el lado citosólico. El poro está localizado entre el TM5 y TM6. En el extremo N-terminal, se encuentra el dominio de unión a IP₃ y un dominio regulador.

Además del IP₃, se han descrito una serie de moduladores fisiológicos del IP₃R como el ATP, el Ca²⁺ citosólico y luminal, especies reactivas de oxígeno (ROS) y la adenofostina. Este último consiste en un producto fúngico que resulta ser unas 100 veces más activo que el IP₃. El Ca²⁺ citosólico puede funcionar estimulando la liberación si su concentración es baja, pero por encima de 300 nM actúa como inhibidor. Entre los antagonistas mejor caracterizados destacan el 2-APB, la xetospongina y la cafeína. La actividad del IP₃R puede ser, también, modulada

mediante su fosforilación por quinasas como las proteínas quinasa A y B (PKA y PKB). Así, cabe destacar la existencia de moléculas que van a regular la liberación de Ca^{2+} a través de estos receptores tales como el AMPc, GMPc y la superfamilia Bcl-2 (Mikoshiba, 2007; Berridge, 2014).

Los IP_3Rs van a desempeñar un papel clave en el proceso de apoptosis. La liberación de Ca^{2+} a través de estos canales y su posterior captación por la mitocondria debido a su estrecho acoplamiento constituye un paso determinante de numerosas señales apoptóticas (Hanson *et al.*, 2004). Como consecuencia, se ha descrito que en algunos casos una alteración de la liberación de Ca^{2+} a través de los IP_3Rs puede estar relacionada con una resistencia a la apoptosis de las células tumorales durante el desarrollo del cáncer (Kang *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2011). Otras enfermedades que cursan como consecuencia de alteraciones de estos receptores son la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington y la ataxia espinocerebelar (Foskett, 2010).

2.2.1.2. Receptores de rianodina (RyRs)

El Ca^{2+} es liberado de los depósitos intracelulares, también, a través de otros canales presentes en su membrana, los RyRs. Su nombre se debe a que estos canales tienen la característica de unirse fuertemente a un alcaloide denominado rianodina que a bajas concentraciones estimula la liberación de Ca^{2+} , pero a altas, la inhibe (Meissner *et al.*, 1986). Estos canales se expresan casi exclusivamente en el RE, no hay evidencias claras de su existencia en otros depósitos intracelulares de Ca^{2+} , excepto en gránulos de secreción de insulina (Mitchell *et al.*, 2001; Mitchell *et al.*, 2003; Rizzuto y Pozzan, 2006).

Estos canales se caracterizan por presentar un alto peso molecular, >2000 KDa. Hay tres isoformas de RyRs (RyR1, 2 y 3) codificadas por tres genes independientes que presentan una distribución específica de tejido (Sorrentino, 1995). RyR1 se expresa principalmente en músculo esquelético, aunque aparece, también, en otros tipos celulares como en el cerebelo (Ku wajima *et al.*, 1992) y en linfocitos B (Sei *et al.*, 1999). RyR2 se expresa en el músculo cardíaco (Otsu *et al.*, 1990) y en menor cantidad, en cerebro (Furuichi *et al.*, 1994). En cambio, RYR3 aparece expresada en menor proporción en numerosos tejidos como el músculo y en neuronas, en combinación con las otras dos isoformas (Sorrentino y Volpe, 1993).

Las tres isoformas presentan una estructura similar con una homología de aproximadamente un 65%. Ésta consiste en una región transmembrana con cinco o seis hélices α localizada en el extremo C-terminal que forma el poro del canal y que constituye aproximadamente una quinta parte del canal. En su lado citosólico posee un extremo N-terminal bastante largo que contiene un dominio regulador donde se pueden unir una amplia cantidad de moléculas que modulan la actividad del canal. El canal funcional se encuentra

formado por cuatro subunidades iguales dando lugar a un homotetrámero (Hamilton y Serysheva, 2008; Lanner *et al.*, 2010).

El Ca^{2+} es uno de los agonistas fisiológicos de los RyRs mejor caracterizados, puesto que lleva a cabo un mecanismo de activación denominado liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR; del inglés, *Ca²⁺-induced Ca²⁺ release*) (Ma *et al.*, 1988; Gyorke *et al.*, 1994; Hamilton, 2005). El incremento de Ca^{2+} que activa CICR está mediado por VOCs en las células musculares y es clave en el proceso de contracción (Cheng y Wang, 2002). En las neuronas dicho aumento de Ca^{2+} es llevado a cabo, también por los VOCs (Berrout e Isokawa, 2009), pero además, puede producirse a través del receptor de NMDA (Raymond y Redman, 2006). Otros agonistas capaces de activar los RyRs son la cafeína, el ATP, la ADP ribosa y el óxido nítrico (Hamilton, 2005). Además, el receptor de dihidropiridinas, la CaM, la PKA y algunas FKBP (del inglés, FK506-binding proteins) pueden modular la liberación de Ca^{2+} actuando sobre los RyRs (Lanner *et al.*, 2010).

La importancia de los RyRs en el proceso de excitación-contracción de las células musculares nos lleva a pensar a que alteraciones en estos canales pueden dar lugar a una serie de enfermedades relacionadas entre las que destacan la hipertermia maligna y las arritmias cardíacas. Además, se ha descrito que la expresión alterada de algunas de sus isoformas puede cursar con la enfermedad de Alzheimer (Amador *et al.*, 2013).

2.2.2. Bombas de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares

2.2.2.1. ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico (SERCA)

La SERCA es una ATPasa tipo P englobada dentro de la superfamilia $\text{P}_{2\text{A}}$. Es capaz de introducir dos iones Ca^{2+} en el interior de los depósitos intracelulares por cada molécula de ATP hidrolizada, puesto que presenta dos sitios de transporte de Ca^{2+} , lo que la diferencia de otras ATPasas de Ca^{2+} (Toyoshima, 2009). Se expresa principalmente en el RE, pero también, aparece en el aparato de Golgi, tanto en el *cis* como en el Golgi intermedio (Van Baelen *et al.*, 2004).

Su estructura se puede dividir en tres partes principales, una gran cabeza en el lado citosólico unida por un tallo a la región transmembrana de la proteína. Tan solo presenta algunos lazos en su lado luminal. Contiene tres dominios principales típicos de las ATPasas tipo P en su cabeza citosólica: un dominio de unión a nucleótidos, otro de fosforilación y otro de actuación, que va a catalizar la desfosforilación del segundo. Su región transmembrana está formada por diez hélices hidrofóbicas que anclan la proteína a la membrana y que van a formar el poro a través del cual entra el Ca^{2+} en el depósito. En esta región, también, se encuentran los dos sitios de unión a Ca^{2+} (Fig. 9) (Toyoshima *et al.*, 2000; Martonosi y Pikula, 2003; Vandecaetsbeek *et al.*, 2011).

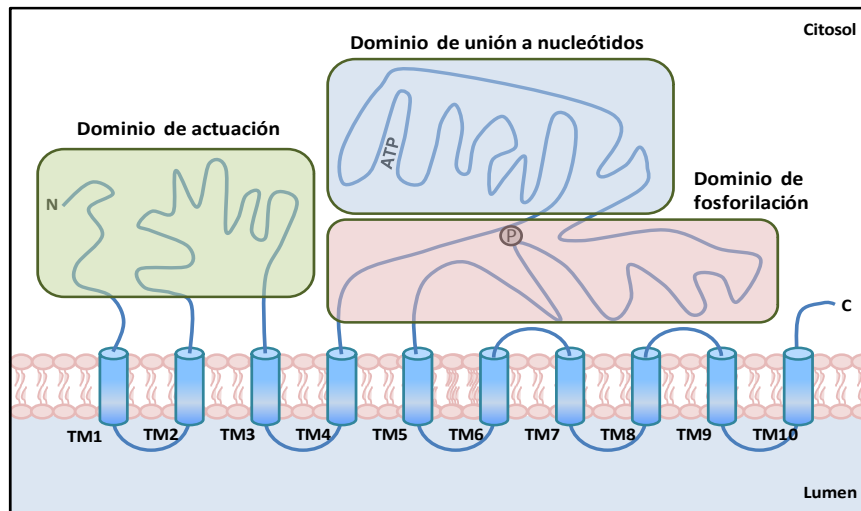


Figura 9. Estructura y topología de la SERCA. La SERCA se encuentra insertada en la membrana del RE y del aparato de Golgi. La región transmembrana se compone de 10 hélices α (TM1-10). En su lado citosólico, contiene un dominio de actuación formado por el extremo N-terminal y el lazo que une el TM2 y el TM3, así como un dominio de unión a nucleótidos y otro de fosforilación situado entre el TM4 y TM5.

La familia de las SERCAs está codificada por tres genes distintos, los cuales van a dar lugar a tres isoformas: *ATP2A1* que codifica para la SERCA1, *ATP2A2*, para la SERCA2, y *ATP2A3*, para la SERCA3 (Brini y Carafoli, 2009). La SERCA1 parece expresarse en casi todas las fibras de músculo esquelético de contracción rápida de todos los vertebrados. Presenta dos variantes de *splicing*, SERCA1a y SERCA1b. La SERCA1a parece hallarse tan solo en músculo neonatal o regenerado (Zador *et al.*, 2007). Presenta cuatro variantes, SERCA2a-d. La SERCA2a se expresa principalmente en músculo esquelético de contracción lenta, en músculo cardíaco y en menor proporción en músculo liso y en neuronas. La SERCA2b es la variante con mayor afinidad por el Ca^{2+} y es considerada como *housekeeping*, puesto que aparece en todos los tejidos. Las SERCA2c (Dally *et al.*, 2006) y SERCA2d (Kimura *et al.*, 2005) se expresan en corazón, pero podrían aparecer en otros tejidos dado que su descubrimiento es bastante reciente. Por último, la expresión SERCA3 es específica de tejido y, además, dependiente del estado de diferenciación celular. Aparece en células sanguíneas como linfocitos y mastocitos, en células endoteliales, en células epiteliales del intestino o del tracto respiratorio y en células de Purkinge. De esta isoforma se han encontrado seis variantes de *splicing*, SERCA3a-f (Vandecaetsbeek *et al.*, 2011).

Se tiene constancia de varios inhibidores selectivos de la SERCA como son la tapsigargina, la 2,5-di(tert-butil)-1,4-benzohidroquinona (TBH) y el ácido ciclopiazónico (CPA; del inglés, *cyclopiazonic acid*). La tapsigargina fue identificada en la planta *Thapsia garganica* y se trata de un inhibidor irreversible que estabiliza a la SERCA en una conformación con baja afinidad para el Ca^{2+} . En cambio, la TBH y el CPA son inhibidores reversibles de menor afinidad

que la tapsigargina. Estos inhibidores son ampliamente utilizados en el estudio de la señal de Ca^{2+} (Michelangeli y East, 2011). Especialmente son usados para activar la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos, ya que permiten el vaciamiento pasivo de los depósitos independientemente del IP_3R .

Existen numerosas patologías en las que se ve afectada la SERCA. Su papel fundamental en el tejido muscular perteneciente a distintos órganos puede dar lugar al desarrollo de diferentes desórdenes relacionados con la alteración de su función. Así por ejemplo, la importancia de la SERCA en el músculo cardíaco implica que su alteración puede producir hipertrofia cardíaca o fallo cardíaco (Kranias y Bers, 2007). En cuanto a las patologías relacionadas con el músculo liso vascular parece estar relacionada con enfermedades como la aterosclerosis (House *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha observado que la disfunción de la SERCA, además, ocurre en diversos tipos de cáncer (Monteith *et al.*, 2007).

2.2.2.2. ATPasa de Ca^{2+} de la vía secretora (SPCA)

La SPCA es una ATPasa tipo P perteneciente a la subfamilia P_{2A} al igual que la SERCA. Se diferencia de ésta en que transporta un solo ión Ca^{2+} por molécula de ATP hidrolizada y que, además, transporta Mn^{2+} (Wuytack *et al.*, 2002; Brini y Carafoli, 2009; Vangheluwe *et al.*, 2009). La SPCA se expresa en todas las regiones del aparato de Golgi, incluyendo el *trans*-Golgi (Missiaen *et al.*, 2007), y en vesículas de secreción (Mitchell *et al.*, 2001). Como su propio nombre indica, es la principal bomba de Ca^{2+} de los compartimentos de la vía secretora.

La estructura de la SPCA es similar a la de la SERCA. La principal diferencia reside en que en su dominio transmembrana contiene tan solo un sitio de unión a Ca^{2+} correspondiente al sitio II de la SERCA con ligeras diferencias para permitir, también, el transporte de Mn^{2+} (Wei *et al.*, 2000; Van Baelen *et al.*, 2001).

Las SPCAs están codificadas por dos genes independientes: *ATP2C1* que da lugar a la SPCA1 y *ATP2C2* que codifica para la SPCA2 (Vandecaetsbeek *et al.*, 2011). La SPCA1 se expresa en todo tipo de tejidos, por lo que es considerada un *housekeeping*. En humanos muestra cuatro variantes de *splicing*, SPCA1a-d que solo difieren en su extremo carboxilo terminal (Fairclough *et al.*, 2003). En cambio, la expresión de SPCA2 es más restringida, por lo que puede que lleve a cabo funciones fisiológicas más especializadas. Esta isoforma, aparece expresada en el tracto digestivo, en la tráquea, en el tiroides, en glándulas salivares, en la próstata y en glándulas mamarias (Vanoevelen *et al.*, 2005). En estas últimas, se sobreexpresa durante el período de lactancia atendiendo a una actividad secretora mayor (Faddy *et al.*, 2008).

La patología más clásica asociada a una alteración de la SPCA es la enfermedad de Haley-Haley en la que se ve afectada la piel por una mutación en el gen *ATP2C1* (Hu *et al.*,

2000). Otra enfermedad que se ha relacionado con la SPCA es el trastorno específico del lenguaje (Newbury *et al.*, 2009). También, ha sido relacionada con el cáncer (Feng y Rao, 2013).

2.3. Mitocondria

La mitocondria se trata de un orgánulo subcelular delimitado por dos membranas, la membrana mitocondrial interna y la externa, cada una con un papel bien distinto. Ambas van a dar lugar a dos compartimentos, la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana. Desde un punto de vista histórico, la mitocondria ha sido considerada como un orgánulo productor de energía, puesto que en su interior se llevan a cabo el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa que van a permitir la síntesis aeróbica del ATP. Además de esta característica, en las últimas décadas se ha puesto de manifiesto su capacidad para captar Ca^{2+} y, como consecuencia, la implicación en la regulación de la homeostasis de este ión (Deluca y Engstrom, 1961; Vasington y Murphy, 1962; Contreras *et al.*, 2010). La entrada de Ca^{2+} hacia la matriz mitocondrial se produce gracias a que el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{\text{mit}}$) es aproximadamente de -180 mV (Pozzan *et al.*, 2000), por lo que tiene lugar a favor de gradiente fundamentalmente eléctrico. El $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ es consecuencia del flujo de H^+ a través de la membrana mitocondrial interna generado por la cadena de transporte electrónica. La acumulación de H^+ en el espacio intermembrana permite que se genere un gradiente de H^+ aprovechado por la ATP sintasa para obtener energía en forma de ATP (Mitchell y Moyle, 1967).

El Ca^{2+} captado por la mitocondria permite regular procesos que tienen lugar en este orgánulo, entre los que destaca la producción de energía de la célula necesaria para llevar a cabo innumerables procesos fisiológicos. Esta particularidad se debe a que la actividad de tres deshidrogenasas de la matriz depende del Ca^{2+} captado por la mitocondria. Así, la piruvato deshidrogenasa está regulada por una fosfatasa dependiente de Ca^{2+} . Además, tanto la α -cetoglutarato deshidrogenasa como la isocitrato deshidrogenasa dependen directamente de este ión. Estas enzimas van a catalizar reacciones que producen el NADH necesario para la síntesis de ATP mediante fosforilación oxidativa (McCormack y Denton, 1979; Jouaville *et al.*, 1999). Asimismo, el Ca^{2+} puede regular el metabolismo mitocondrial a través de los intercambiadores de aspartato/glutamato que se encuentran en la membrana interna mitocondrial. En respuesta a un incremento de la concentración de Ca^{2+} se puede incrementar el transporte de metabolitos necesarios para la síntesis de ATP (Lasorsa *et al.*, 2003).

La mitocondria, además, puede regular numerosos procesos fisiológicos actuando como tampón de Ca^{2+} . Esta función se basa en la existencia de zonas de proximidad entre el RE y la mitocondria y entre ésta última y la membrana plasmática donde se pueden llegar a generar microdominios de Ca^{2+} . En estos lugares la mitocondria puede regular tanto la liberación de Ca^{2+} a través de los IP_3Rs (Jouaville *et al.*, 1995) y de los RyRs (Pacher *et al.*, 2002)

como la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular a través de canales como los SOCs (Hoth *et al.*, 1997) y los VOCs (Wu *et al.*, 1999). Por tanto, la mitocondria puede regular la actividad de diferentes canales de Ca^{2+} controlando la distribución espacial y temporal de los incrementos de la concentración de Ca^{2+} (Rizzuto y Pozzan, 2006). Existen evidencias de que las mitocondrias se distribuyen de forma específica en la célula para evitar que los incrementos de Ca^{2+} se extiendan hacia determinadas localizaciones quedándose concentrados en una región específica (Rizzuto *et al.*, 2012). Esto ocurre en el caso de algunas células polarizadas como en las neuronas donde las mitocondrias se encuentran próximas a los receptores de NMDA en los terminales sinápticos (David y Barrett, 2003; Sung *et al.*, 2008) y en las células acinares pancreáticas donde aparecen en mayor proporción aislando la región secretora (Tinel *et al.*, 1999).

Otra de las funciones de la captación de Ca^{2+} mitocondrial es el control de la supervivencia celular (Rizzuto *et al.*, 2012). Una sobrecarga de Ca^{2+} por parte de la mitocondria puede provocar la apertura del poro de permeabilidad transitoria (PTP; del inglés, permeability transition pore) y la liberación a través de éste de nucleótidos de pirimidina y citocromo c, lo que da lugar a la muerte celular por apoptosis o necrosis (Kroemer *et al.*, 2007). Esta sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria puede producirse por diferentes señales como son la isquemia o la excitotoxicidad neuronal que van a desencadenar la necrosis o un estrés oxidativo que puede provocar apoptosis. Además, el Ca^{2+} que entra en la mitocondria puede regular la supervivencia celular a través de la autofagia, un proceso que tiene lugar en condiciones de baja producción de energía por parte de la mitocondria (Decuypere *et al.*, 2011b).

La entrada de Ca^{2+} en el interior de la mitocondria tiene lugar, primero, a través de la membrana mitocondrial externa. El paso a través de esta barrera es posible debido a la existencia en la misma de canales aniónicos dependientes de voltaje (VDACs; del inglés, *voltage-dependent anion channels*). Estos canales no solo permiten el paso de Ca^{2+} hacia el espacio intermembrana, sino que dejan pasar solutos de hasta 5 KDa. El transporte de Ca^{2+} hacia la matriz mitocondrial es llevado a cabo por el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU), un canal selectivo a Ca^{2+} localizado en la membrana mitocondrial interna. En cambio, la salida de Ca^{2+} de la mitocondria se produce al menos a través de dos intercambiadores catiónicos situados, también, en la membrana mitocondrial interna, el intercambiador mitocondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mNCX) y el intercambiador mitocondrial $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mHCX). El Ca^{2+} podría salir de la mitocondria, además, a través del PTP, el cual tiene un papel relevante en la muerte celular (Fig. 10) (Rizzuto *et al.*, 2012).

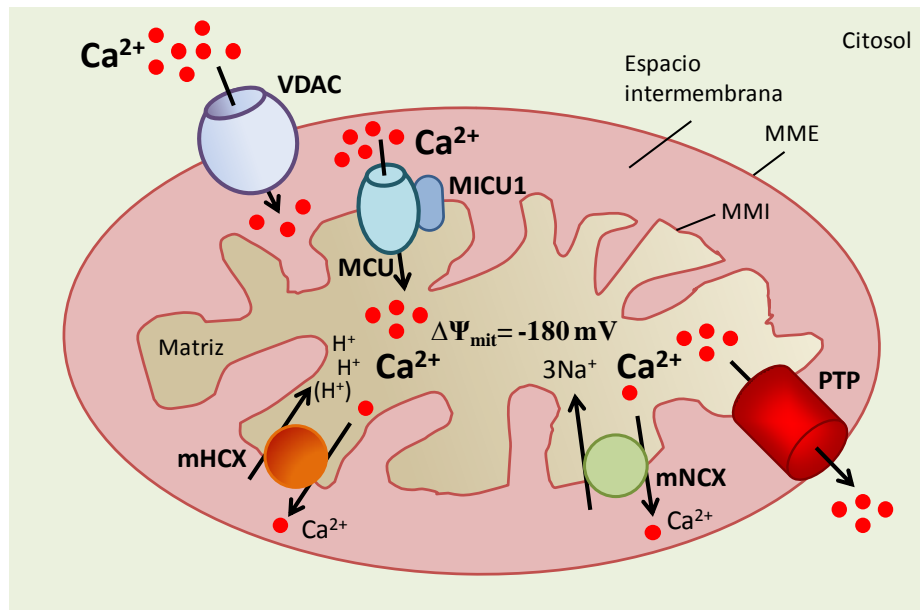


Figura 10. Sistemas implicados en el transporte de Ca^{2+} en la mitocondria. En la membrana mitocondrial externa (MME) se encuentra situado el VDAC (canal aniónico dependiente de voltaje) que permite el paso de Ca^{2+} a través de la primera barrera mitocondrial, además de transportar diversos solutos. En la membrana mitocondrial interna (MMI) aparece el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU) que transporta Ca^{2+} hacia la matriz mitocondrial a favor de gradiente gracias al valor de potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_{\text{mit}} = -180 \text{ mV}$). El MCU está regulado por diversas proteínas entre las que destaca MICU1. Además, en la MMI se encuentran dos sistemas que transportan Ca^{2+} hacia el espacio intermembrana, el intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mHCX) y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mNCX). El Ca^{2+} , también, puede ser transportado desde la matriz mitocondrial hacia el citosol a través del poro de permeabilidad mitocondrial (PTP).

En un principio la mitocondria fue propuesta como depósito de Ca^{2+} intracelular, pero hoy en día se ha desestimado esta posibilidad. Es cierto que la mitocondria puede alcanzar una concentración de Ca^{2+} del orden de decenas o incluso de centenas de μM , pero tan solo de manera transitoria (Montero *et al.*, 2000). Además, no podemos considerar que la mitocondria acumule Ca^{2+} en su interior para su posterior liberación en respuesta a un estímulo como puede ocurrir en el caso del RE. Este último compartimento presenta canales que permiten la salida regulada de Ca^{2+} a favor de gradiente electroquímico, lo que no ocurre en el caso de la mitocondria (Rizzuto y Pozzan, 2006).

2.3.1. Uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU)

El MCU permite el paso de Ca^{2+} hacia la matriz de la mitocondria a través de la membrana mitocondrial interna. Se caracteriza por su alta selectividad y por su baja conductancia a Ca^{2+} (Kirichok *et al.*, 2004). Se expresa en todos los tejidos de vertebrados.

Además, es inhibido por rojo de rutenio y lantánidos. Presenta baja afinidad por el Ca^{2+} , ya que su K_d está en torno a 10-20 μM (Gunter y Gunter, 2001). Por tanto, en condiciones fisiológicas, donde la concentración de Ca^{2+} es aproximadamente 100 nM, la captación de Ca^{2+} a través del MCU solo es posible debido a la existencia de microdominios. Así, en lugares en los que la mitocondria está próxima a canales de Ca^{2+} tanto de los depósitos como de la membrana plasmática se forman microdominios donde la concentración de Ca^{2+} alcanza niveles que permiten la entrada de este ión a través del MCU (Rizzuto *et al.*, 1993).

La identidad molecular del MCU ha sido recientemente descubierta, después de varios años discutiendo acerca de esta cuestión, proponiendo infinidad de candidatos. Se trata de una proteína de 40 kDa codificada por el gen *CCDC109A*. Consta de dos dominios transmembrana altamente conservados separados por un pequeño lazo rico en residuos cargados negativamente (Baughman *et al.*, 2011; De Stefani *et al.*, 2011).

Antes de ser identificado el MCU, fue descubierta otra proteína que interactúa con este canal y que constituye un elemento regulador del mismo, la proteína MICU1 (del inglés, *mitochondrial Ca^{2+} uptake 1*) (Perocchi *et al.*, 2010). La función de MICU1 actualmente es motivo de controversia. Puede que regule la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria de manera diferente dependiendo de la concentración de Ca^{2+} citosólica (de la Fuente *et al.*, 2014). De esta forma, en el estado basal MICU1 actuaría reduciendo la entrada de Ca^{2+} a través del MCU (Mallilankaraman *et al.*, 2012), sin embargo cuando aumenta la concentración de Ca^{2+} en el citosol tras la estimulación con un agonista parece incrementar la captación de Ca^{2+} mitocondrial (Perocchi *et al.*, 2010; Csordas *et al.*, 2013). Además, existen otra serie de proteínas descubiertas muy recientemente que han sido relacionadas con la regulación de la captación de Ca^{2+} mitocondrial a través del MCU cuya función todavía es objeto de estudio. Por tanto, además de MICU1, se ha descrito que el MCU interacciona con MICU2 (del inglés, *mitochondrial Ca^{2+} uptake 2*), MCUB (del inglés, *mitochondrial Ca^{2+} uniporter b*), EMRE (del inglés, *essential MCU regulator*) y MCUR1 (del inglés, *mitochondrial Ca^{2+} uptake regulator 1*). Parece que todas estas proteínas, a excepción de la última, se encuentran asociadas formando parte de un complejo macromolecular (Marchi y Pinton, 2014).

La alteración de la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria a través del MCU puede dar lugar a varias enfermedades. Así, por ejemplo, el MCU ha sido relacionado con el cáncer, ya que su expresión se ha visto reducida en muestras de adenocarcinoma de colon (Marchi *et al.*, 2013). Por otra parte, se ha observado que un incremento en la captación de Ca^{2+} a través del MCU parece tener un papel clave en la muerte de las células de miocardio, la cual puede dar lugar a un fallo cardíaco. Este hecho es consecuencia de que el aumento de la entrada de Ca^{2+} supone un incremento de la actividad de la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} -calmodulina (CaMKII; del inglés, *Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II*) (Joiner *et al.*, 2012). Además, al parecer la alteración de los reguladores del MCU, también, puede conducir a un estado patológico. En el caso de MICU1, mutaciones que provocan una pérdida de su función dan

lugar a una enfermedad caracterizada por una miopatía proximal, dificultades en el aprendizaje y un desorden del movimiento extrapiramidal (Logan *et al.*, 2014).

2.3.2. Intercambiadores mitocondriales de Ca^{2+}

El marcado carácter negativo del potencial de membrana mitocondrial permitiría a la mitocondria alcanzar una concentración de Ca^{2+} en el equilibrio de 0,1 M (Pozzan *et al.*, 2000). Sin embargo, esta concentración nunca se alcanza debido en parte a la presencia de dos sistemas de extrusión de Ca^{2+} en la mitocondria en contra de gradiente electroquímico. El primer sistema que transporta Ca^{2+} fuera de la mitocondria se trata del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (mNCX) encontrado de manera predominante en tejidos excitables. Permite la salida de un ión Ca^{2+} por la entrada de tres iones Na^+ , por tanto, constituye un sistema electrogénico (Brierley *et al.*, 1994). Este intercambiador se ha identificado como el NLCX, una isoforma del NCX de la membrana plasmática (Palty *et al.*, 2010). El segundo sistema de extrusión es el intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (mHCX) cuya identidad molecular ha sido identificada como la proteína LETM1 (Jiang *et al.*, 2009). Se encuentra con mayor frecuencia en tejidos no excitables e intercambia 1 ión Ca^{2+} por 2 ó 3 H^+ (Puskin *et al.*, 1976).

LETM1 ha sido relacionado con el desarrollo del cáncer escamoso de cabeza y cuello (Chen *et al.*, 2014b), así como con el cáncer de mama triple negativo (Wang *et al.*, 2015a). Además, se ha descrito que una delección en el gen de LETM1 da lugar al síndrome de Wolf-Hirschhorn que se caracteriza por defectos craneofaciales, retraso mental y del crecimiento e hipotonía muscular (Jiang *et al.*, 2013).

4. Entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC)

La historia de la entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC) o entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE; del inglés, *store operated calcium entry*) comienza en los años 80 cuando mediante técnicas de imagen se observa una relación entre la producción de IP_3 que tiene lugar tras la llegada de un estímulo a la célula y la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática (Berridge *et al.*, 1984; von Tscharner *et al.*, 1986). El mecanismo por el cual se producía esa entrada de Ca^{2+} en la célula no se descubrió hasta 1986 por Putney quien propuso el concepto de entrada capacitativa de Ca^{2+} (Putney, 1986). El modelo de Putney proponía que el Ca^{2+} entraba directamente en los depósitos desde el exterior, es decir, sin pasar por el citosol, de ahí el nombre original de entrada capacitativa de Ca^{2+} y, cuando el IP_3 se unía a su receptor, se liberaba el Ca^{2+} . Esta conexión directa entre el exterior y los depósitos de Ca^{2+} fue descartada más tarde con la realización de experimentos de electrofisiología acoplada a imagen de fluorescencia que demostraban que la entrada de Ca^{2+} ocurría con un retraso tras la

estimulación del receptor de IP₃ (Penner *et al.*, 1988). Además, se hizo evidente que la estimulación del receptor de IP₃ no era necesaria para la activación de la ECC. Experimentos con tapsigargina, un inhibidor de la SERCA, mostraron que el vaciamiento pasivo de los depósitos de Ca²⁺ era suficiente para inducir la entrada de Ca²⁺ en la célula indistinguible de la inducida por agonistas (Takemura *et al.*, 1989). Más tarde, otros inhibidores de la SERCA como la TBH (Oldershaw *et al.*, 1990) y el CPA (Deng *et al.*, 1991) apoyaron esta idea. Los inhibidores de la SERCA siguen siendo una herramienta excelente para el estudio funcional de la ECC, en especial, la tapsigargina.

Todas esas observaciones dieron pie a que en 1990 se revisara el mecanismo de activación de la ECC que proponía que la entrada de Ca²⁺ tenía lugar como consecuencia del vaciamiento de los depósitos (Putney, 1990). Al principio se desconocían las bases moleculares por las que el vaciamiento de los depósitos de Ca²⁺ activaba la ECC, por lo que se propusieron al menos tres modelos que permitían su explicación. El primero, el modelo del mensajero difusible, sugería que el vaciamiento de los depósitos generaba un factor de bajo peso molecular denominado CIF (del inglés, *Ca²⁺ influx factor*) el cual provocaba la entrada de Ca²⁺ en la célula (Randriamampita y Tsien, 1993). Otro modelo, conocido como modelo de fusión vesicular, proponía que los canales operados por depósitos se encontraban en vesículas intracelulares, que tras el vaciamiento de los mismos se fusionaban con la membrana permitiendo su inserción y la consecuente entrada de Ca²⁺ (Patterson *et al.*, 1999). Por último, el modelo de acoplamiento conformacional exponía que el vaciamiento provocaba un cambio conformacional de los receptores de IP₃ que estaban en contacto físicamente con los canales de Ca²⁺ de la membrana plasmática, lo que conducía a la entrada de Ca²⁺ (Irvine, 1990).

En 1992, fue caracterizada por primera vez una corriente iónica activada por el vaciamiento de los depósitos, la corriente de Ca²⁺ activada por la liberación de Ca²⁺ (*I_{CRAC}*, del inglés, *Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current*). Este hecho, fue posible gracias al uso de técnicas electrofisiológicas como *patch-clamp*, una técnica desarrollada a principios de los años 80 y que propició la concesión del premio Nobel de Fisiología y Medicina a sus inventores, Bert Sakmann y Erwin Neher en 1991. La corriente fue descrita utilizando quelantes como el EGTA que permitían vaciar los depósitos de manera pasiva impidiendo la inactivación dependiente de Ca²⁺, aquella que tiene lugar como consecuencia del incremento de la [Ca²⁺] en el citosol. Además, el vaciamiento de los depósitos se llevó a cabo, también, con IP₃, con tapsigargina o con ionomicina, un ionóforo de Ca²⁺ (Hoth y Penner, 1992). Más tarde, fueron descritas otras corrientes operadas por depósitos a las que, simplemente, se las denominó corrientes de Ca²⁺ operadas por depósitos (*I_{SOc}*, del inglés, *store-operated Ca²⁺ current*) (Parekh y Putney, 2005).

La ECC fue descrita, inicialmente, en células no excitables, en las cuales, apenas se tenía constancia sobre la existencia de otros tipos de entrada de Ca²⁺. Hoy en día, sabemos que se trata de la entrada de Ca²⁺ más importante en estas células. Por supuesto, también está presente en células excitables como son las musculares o las neuronas. Además, es

prácticamente ubicua en los organismos eucariotas, es decir, aparentemente existe en todos ellos, desde levaduras hasta humanos. (Parekh y Putney, 2005).

4.1. ORAI y STIM

Ninguno de los modelos de activación de la entrada de Ca^{2+} anteriormente descritos fue demostrado y, por lo tanto, ninguno llegó a ser ampliamente aceptado. La búsqueda de la identidad molecular de un sensor de Ca^{2+} en el RE que permitiera la activación de la ECC culminó en el año 2005 con la descripción de STIM1, una proteína transmembrana que se encuentra en ese orgánulo (Liou *et al.*, 2005; Roos *et al.*, 2005). Este hecho tuvo lugar en células S2 de *Drosophila* (Liou *et al.*, 2005) y en células HELA (Liou *et al.*, 2005) mediante un cribado con RNA de interferencia. Un año más tarde, se identificó el primer canal de Ca^{2+} activado por el vaciamiento de depósitos, ORAI1. Este descubrimiento fue posible gracias al análisis genético de pacientes con inmunodeficiencia combinada severa, los cuales esencialmente carecían de ECC (Feske *et al.*, 2006).

La activación fisiológica de la ECC en la que participan ORAI1 y STIM1 tiene lugar como consecuencia de la estimulación de un receptor situado en la membrana plasmática. Estos receptores, los cuales pueden ser acoplados a proteínas G o con actividad tirosina quinasa, ejercen su acción a través de la fosfolipasa C. Ésta va a dar lugar a la formación de IP_3 , lo que provoca la activación del IP_3R situado en la membrana del RE, permitiendo así la liberación de Ca^{2+} hacia el citosol (Venkatachalam *et al.*, 2002). En estado de reposo, las moléculas de STIM1 se distribuyen de manera uniforme por la membrana del RE, moviéndose rápidamente a lo largo de la misma y, además, están unidas a Ca^{2+} a través de un dominio mano-EF. Cuando se produce una reducción en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ tras la estimulación fisiológica del receptor, STIM1 se libera de la unión a Ca^{2+} , reduce su movimiento y oligomeriza formando unas estructuras denominadas puncta, halladas en zonas cercanas a la membrana plasmática. En estas estructuras, apreciadas mediante técnicas de imagen, STIM1 se encuentra interaccionando con ORAI1 que, también, oligomeriza consigo mismo. Por último, la interacción de STIM1 y ORAI1 va a permitir la entrada de Ca^{2+} a través de este canal operado por depósitos. El rellenado de nuevo de los depósitos parece revertir esta situación hacia el estado inicial de reposo (Fig. 11) (Hewavitharana *et al.*, 2007; Putney, 2009; Muik *et al.*, 2012). Además del rellenado de los depósitos, el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ es clave para la desoligomerización de STIM1 y la finalización de la ECC (Shen *et al.*, 2011).

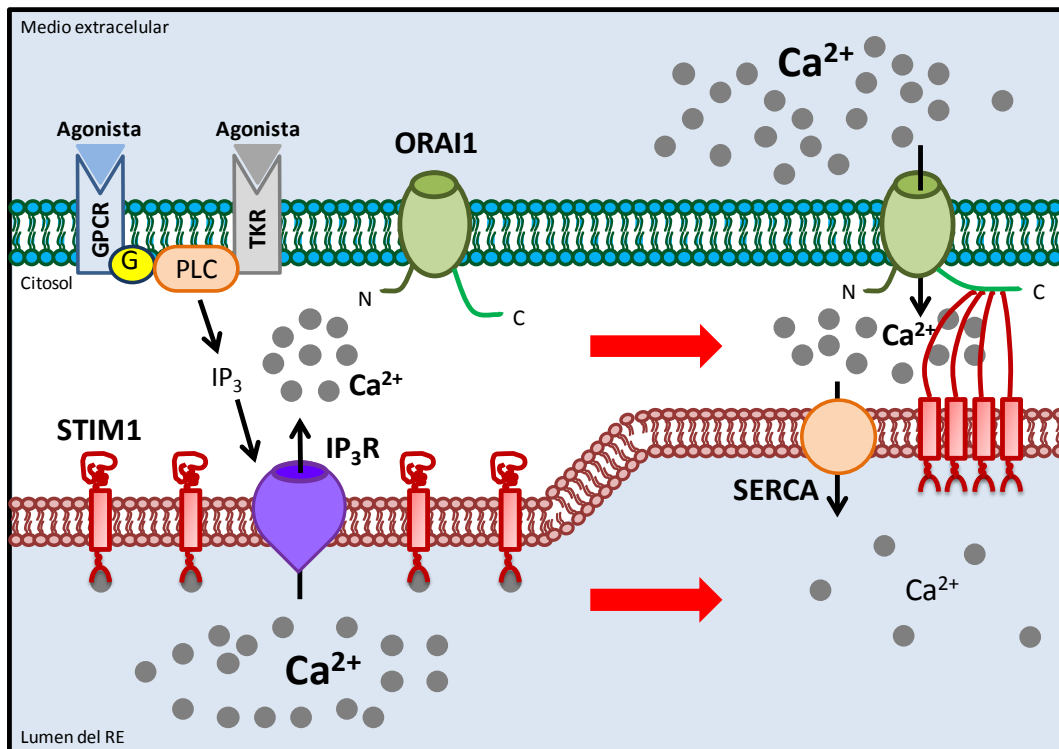


Figura 11. Entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC). La activación tanto de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) como de los receptores tirosina quinasa (TKRs) situados en la membrana plasmática por la unión a un agonista puede dar lugar a la formación de IP_3 a consecuencia de la acción de la fosfolipasa C (PLC). El IP_3 se une a su receptor (IP_3R) e induce la liberación de Ca^{2+} desde el RE provocando su vaciamiento. El vaciamiento de Ca^{2+} del RE da lugar a la disociación del Ca^{2+} unido a STIM1, un sensor de Ca^{2+} situado en la membrana del RE. Como consecuencia, STIM1 oligomeriza e interacciona con Orai1, un canal de Ca^{2+} situado en la membrana plasmática, activando la entrada de Ca^{2+} hacia el interior del citosol. El Ca^{2+} es transportado, de nuevo, al RE a través de la SERCA lo que provoca el regreso al estado de reposo.

Además de Orai1, hay otras dos isoformas pertenecientes a la familia Orai, Orai2 y Orai3, que pueden funcionar como SOCs. De la misma forma, ha sido identificada otra isoforma de la familia STIM a la que se denominó STIM2. Sin embargo, hay bastante controversia sobre la función e implicación de estas isoformas en la ECC. Tanto las isoformas de Orai como las de STIM se expresan de manera ubicua en todos los tipos celulares, lo que sugiere que son importantes en la fisiología de la célula (Potier y Trebak, 2008).

Se ha reportado que estos canales pueden ser regulados por el Ca^{2+} que entra a través de la ECC, ya que muestran dos tipos de inactivación dependiente de Ca^{2+} (Watson y Parekh, 2012). Por un lado, presentan una inactivación rápida que consiste en un proceso biexponencial que se desarrolla en un periodo de tiempo muy corto, entre 10 y 100 ms. Se desarrolla por un incremento de Ca^{2+} muy localizado en el citosol, puesto que actúa a tan solo a 7 nm del poro (Zweifach y Lewis, 1995b; Fierro y Parekh, 1999). Por otro lado, sufren una inactivación lenta dependiente de Ca^{2+} que tiene lugar en decenas de segundos provocada por

un incremento de Ca^{2+} localizado en un volumen más amplio del citosol (Zweifach y Lewis, 1995a; Parekh, 1998; Quintana *et al.*, 2011).

4.1.1. ORAI1

ORAI toma su nombre de los tres guardianes de las puertas del cielo en la mitología griega. ORAI1 consiste en una proteína con cuatro dominios transmembrana (TM1-TM4) que presenta un extremo N-terminal y otro C-terminal situados en el lado citosólico. En su extremo N-terminal contiene un dominio rico en prolinas, un dominio de unión a Ca^{2+} -CaM, así como un aminoácido clave en la apertura del canal (K85). El dominio de unión a Ca^{2+} -CaM está implicado, también, en la unión al dominio CAD (del inglés, *CRAC activation domain*) de STIM1 y contiene residuos esenciales en la inactivación rápida dependiente Ca^{2+} . TM1 contiene los residuos que forman el poro del canal, entre los que se encuentran un aminoácido importante para la apertura (R91) y aquel que da lugar al filtro de selectividad iónica (E106). Además, en el lazo extracelular que une TM1 y TM2 aparecen 3 residuos de aspartato que participan en la selectividad a Ca^{2+} del canal gracias a la presencia de sus cargas negativas. Asimismo, TM3 presenta un residuo próximo al lado citosólico que está implicado en la apertura del canal (W176), además de otros dos residuos que participan en la selectividad a Ca^{2+} (G183 y E190). El lazo intracelular que une TM2 y TM3 participa en la inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} del canal. Por último, el extremo C-terminal muestra un probable dominio *coiled-coil* con residuos hidrofóbicos y ácidos que se van a unir al dominio CAD de STIM1 durante la interacción con el sensor de Ca^{2+} tras el vaciamiento de los depósitos (Fig. 12) (Lewis, 2011; Muik *et al.*, 2012; Shim *et al.*, 2014).

Diferentes estudios apuntan a que el canal ORAI1 está formado por varias subunidades. Algunos de esos estudios sugieren que el canal se trata de un tetrámero (Mignen *et al.*, 2008a; Maruyama *et al.*, 2009), sin embargo en los últimos años se ha contemplado la posibilidad de que esté formado por seis subunidades dando lugar a un hexámero (Hou *et al.*, 2012; Balasuriya *et al.*, 2014). Además, podría existir un canal de heterómeros formado por una combinación de las distintas isoformas de ORAI en lugar de por una sola (Schindl *et al.*, 2009). La interacción de los monómeros del canal tiene lugar a través del segmento transmembrana TM1 (Stathopulos e Ikura, 2013).

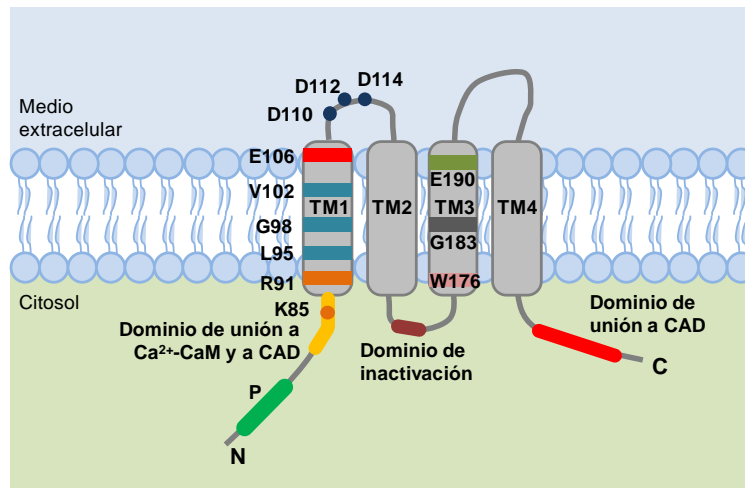


Figura 12. Topología y dominios de Orai1. Orai1 está situado en la membrana plasmática y presenta 4 dominios transmembrana (TM1-4). En su extremo N-terminal contiene un dominio rico en prolinas, seguido de un dominio de unión a Ca^{2+} -CaM y al dominio CAD de STIM1 con un residuo implicado en la apertura del canal (K85). En el TM1 se encuentran los residuos que forman el poro del canal (R91, L95, G98, V102 y E106). R91 participa en la apertura del canal y E106 forma el filtro de selectividad iónica. En el lazo que une TM1 y TM2 se encuentran tres residuos de aspartato (D110, D112 y D114) son importantes en la selectividad a Ca^{2+} del canal. En el lazo que une TM2 y TM3 se encuentra un dominio implicado en la inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} . El TM3 presenta un residuo que participa en la apertura del canal (W176), así como otros dos que participan en la selectividad a Ca^{2+} (G183 y E190). En el extremo C-terminal contiene un dominio de unión al dominio CAD de STIM1 formado por residuos ácidos e hidrófobos.

Orai1 fue identificado por primera vez como un canal operado por depósitos en el laboratorio de Feske utilizando pacientes con inmunodeficiencia combinada severa que presentaban un defecto en la ECC. Al sobreexpresar Orai1 en las células T de esos pacientes se restablecía la ECC. Asimismo, se realizó un análisis de cribado con RNA de interferencia en *Drosophila* que confirmó el papel de Orai1 como un canal implicado en la ECC (Feske *et al.*, 2006). A continuación, ese estudio fue apoyado por otros grupos, ya que utilizando RNA de interferencia para silenciar Orai1 mostraron una reducción tanto de la ECC como de la corriente operada por depósitos (Yeromin *et al.*, 2006; Vig *et al.*, 2006).

También, se ha reportado que Orai1 puede estar implicado en la entrada de Ca^{2+} independiente de depósitos. Así, su apertura puede estar regulada por la interacción en la superficie celular con la bomba ATPasa de la vía secretora SPCA2 (Feng *et al.*, 2010).

Además de su implicación en la inmunodeficiencia combinada severa, la deficiencia de Orai1 ha sido relacionada con otras patologías como la miopatía congénita, la enfermedad pulmonar crónica y la displasia ectodérmica anidrótica (Berna-Erro *et al.*, 2012). Por otro lado, Orai1 juega un papel importante en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca y en el fallo cardíaco (Horton *et al.*, 2014). La participación de Orai1 en el cambio fenotípico de las células

de músculo liso vascular indica que este canal está implicado en la aparición de algunas enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis (Ruhle y Trebak, 2013). En relación con el cambio fenotípico, una sobreexpresión del mismo puede provocar, incluso, asma (Spinelli *et al.*, 2012). También, ORAI1 parece ser importante en la adquisición de diferentes características de las células tumorales en numerosos tipos de cáncer (Liu *et al.*, 2011; Kondratska *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2014).

4.1.2. ORAI2 y ORAI3

ORAI2 y ORAI3 comparten con ORAI1 la misma estructura de cuatro dominios transmembrana con sus extremos N y C-terminal hacia el lado citosólico. Todas las isoformas de ORAI presentan una alta conservación del segmento transmembrana TM1 donde se encuentran los residuos que forman el poro del canal y el filtro de selectividad iónica. En cambio, ORAI2 y ORAI3 se diferencian bastante de ORAI1 en el extremo N-terminal, ya que ORAI2 y ORAI3 carecen del dominio rico en prolinas, así como de un tramo hidrofílico de unos 18 aminoácidos, ambos importantes para la reactivación que tiene lugar tras la inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} . El lazo que une las regiones transmembrana TM3 y TM4 en ORAI3 presenta mayor longitud que el de ORAI1 y ORAI2 (Hoth y Niemeyer, 2013). Por otro lado, las tres isoformas presentan un posible dominio *coiled-coil* en su extremo C-terminal, pero el que muestran ORAI2 y ORAI3 se predice con una probabilidad unas 5 ó 6 veces superior al de ORAI1 (Frischauf *et al.*, 2008). Este extremo C-terminal de ORAI2 y ORAI3, también, presenta residuos importantes en la inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} (Fig. 13) (Lee *et al.*, 2009).

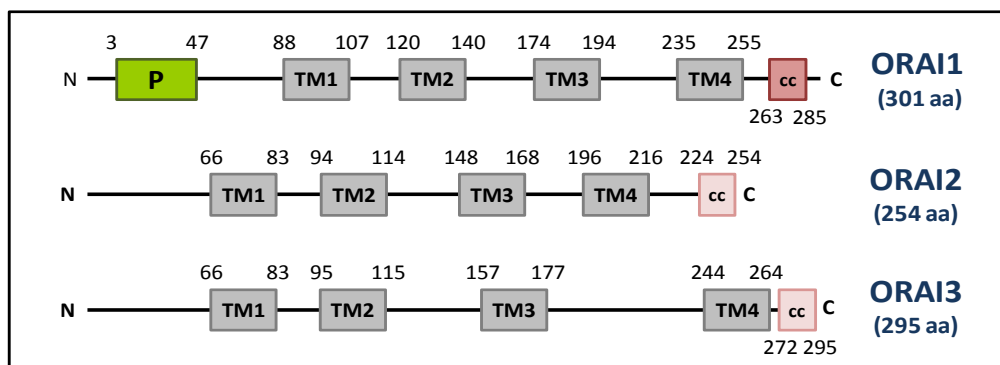


Figura 13. Dominios de las proteínas de la familia ORAI. Todos los miembros de la familia ORAI contienen 4 dominios transmembrana (TM1-4). El tamaño de ORAI1 es bastante superior al de ORAI2 y tan solo ligeramente mayor al de ORAI3. ORAI1 se diferencia de ORAI2 y ORAI3, también, debido a que presenta un dominio rico en prolinas (P) en su extremo N-terminal que no aparece en los demás miembros de la familia ORAI. Además, contiene un posible dominio *coiled-coil* (cc) en el extremo C-terminal que se predice con mayor probabilidad que en el caso de ORAI2 y ORAI3. Por otro lado, la longitud el lazo que une TM3 y TM4 en ORAI3 es considerablemente superior en ORAI3 que en ORAI1 y ORAI2. aa, aminoácidos.

En 2006, Feske describió conjuntamente con *ORAI1* dos genes homólogos a los que se les denominó *ORAI2* y *ORAI3*. Su implicación en la ECC se observó al coexpresar cada uno de ellos con STIM1 en células HEK293, ya que como resultado se obtuvo un incremento de esta entrada de Ca^{2+} . El aumento de la ECC fue mayor en el caso de la expresión de *ORAI2* que en el de *ORAI3*, pero ambos fueron menores que al expresar *ORAI1* (Mercer *et al.*, 2006). También, se demostró que *ORAI2* y *ORAI3*, al igual que *ORAI1*, presentan una alta selectividad a Ca^{2+} en una solución extracelular fisiológica. Sin embargo, la permeabilidad a Na^+ en un medio libre de iones divalentes es mayor en el caso de *ORAI3*, al compararla con la de las demás isoformas (Lis *et al.*, 2007). Además, *ORAI3* se diferencia de *ORAI1* y *ORAI2* en cuanto a la sensibilidad a 2-APB, un antagonista de la ECC. A altas concentraciones de 2-APB (50 μM) se inhibe por completo la corriente mediada por *ORAI1* y parcialmente la corriente de *ORAI2*, en cambio, se activa la de *ORAI3* (Lis *et al.*, 2007). *ORAI2* y *ORAI3* no muestran inactivación lenta dependiente de Ca^{2+} de manera significativa al contrario que *ORAI1*. En cuanto a la inactivación rápida por Ca^{2+} , la que presenta *ORAI3* es bastante superior a la de *ORAI1* y *ORAI2*, estando la de *ORAI2* ligeramente por encima de la de *ORAI1* (Lis *et al.*, 2007). Este hecho puede ser debido a que hay tres residuos de glutamato conservados en el extremo C-terminal de *ORAI2* y *ORAI3* que están implicados en la inactivación rápida y uno de ellos desaparece en *ORAI1* (Frischauf *et al.*, 2009).

En contraste, se han reportado estudios en los que no se contempla la participación de *ORAI2* y *ORAI3* en la ECC. Así, por ejemplo, Takahashi y colaboradores muestran que la expresión de *ORAI2* o de *ORAI3* conjuntamente con STIM1 en células HEK293 no provoca ningún incremento en la ECC algo que, en cambio, se obtiene con la expresión de *ORAI1* (Takahashi *et al.*, 2007a). Por otro lado, utilizando RNA de interferencia, el grupo de Golovina solo observa la implicación de *ORAI1* en la ECC de las células de músculo liso de arteria coronaria humana, descartando un posible papel de *ORAI2* y *ORAI3* en la misma (Barishnikov *et al.*, 2009).

ORAI3 parece formar heterómeros con *ORAI1* para dar lugar a una entrada de Ca^{2+} independiente de depósitos. Así, se ha descrito que ambas proteínas pueden formar un canal regulado por ácido araquidónico cuyas propiedades biofísicas son muy similares a las del canal SOC en cuanto a la alta selectividad a Ca^{2+} . Sin embargo, el canal regulado por ácido araquidónico se diferencia del SOC por la falta de sensibilidad a 2-APB (Mignen *et al.*, 2008b). Se ha descrito que estos canales regulados por ácido araquidónico están formados por pentámeros de tres subunidades de *ORAI1* y dos de *ORAI3* (Mignen *et al.*, 2009).

Apenas ha sido documentada la importancia de *ORAI2* en alguna de las innumerables patologías humanas estudiadas hasta el momento. Tan solo hay un estudio muy reciente que muestra la sobreexpresión de *ORAI2* en células de músculo liso de arteria pulmonar con fenotipo proliferativo, por lo que la alteración de su expresión puede estar relacionada con el desarrollo de resistencia vascular pulmonar en pacientes con hipertensión arterial (Fernández

et al., 2015). Sin embargo, hay varios trabajos que relacionan ORAI3 con el desarrollo de distintas enfermedades. De esta forma, por ejemplo, la expresión de ORAI3 se encuentra aumentada en las células de músculo liso con fenotipo proliferativo que están involucradas en la aparición de enfermedades vasculares (Gonzalez-Cobos *et al.*, 2013). Además, puede estar implicado en el desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, puesto que tiene un papel funcional en la respuesta de las células T a los antioxidantes (Bogeski *et al.*, 2010). Asimismo, se ha visto envuelto en hipertrofia cardiaca a través de su participación como canal de Ca^{2+} regulado por ácido araquidónico (Saliba *et al.*, 2014). Por otra parte, ORAI3 ha sido relacionado con el desarrollo de algunos tipos de cáncer, destacando su implicación en el cáncer de mama (Fauzi *et al.*, 2011; Motiani *et al.*, 2010).

4.1.3. STIM1

Antes del descubrimiento de STIM1 como sensor de Ca^{2+} implicado en la ECC, su gen, denominado también *GOK*, había sido ya previamente identificado en humanos en la región cromosómica 11p15.5, la cual está asociada a la aparición de tumores (Parker *et al.*, 1996). STIM1 es el acrónimo en inglés de *Stromal interaction molecule 1*, consiste en una proteína transmembrana tipo I de 685 aminoácidos (77 KDa) situada en la membrana del RE. Presenta un dominio mano-EF conjuntamente con un motivo alfa-estéril (SAM; del inglés, *sterile-alpha motif*) en su parte luminal (extremo N-terminal). El dominio mano-EF se trata de un motivo hélice-giro-hélice con residuos cargados negativamente que permiten la unión del Ca^{2+} dándole la capacidad de funcionar como sensor de Ca^{2+} del RE. Por supuesto, contiene un segmento transmembrana que permite su inserción en la membrana. En su parte citosólica, muestra tres dominios *coiled-coil* (CC1-3), un dominio de inactivación y una región rica en prolina y serinas seguida de otra rica en lisinas en el extremo C-terminal (Muik *et al.*, 2012). En este extremo citosólico se han descrito tres regiones solapadas esenciales para su oligomerización y la activación de ORAI1, la región de activación STIM1-ORAI1 (SOAR; del inglés, *STIM1 ORAI1-activating region*), el dominio de activación CRAC (CAD; del inglés, *CRAC activation domain*) y la región CCb9 (del inglés, *coiled-coil domain containing region b9*) (Covington *et al.*, 2010). Estas regiones incluyen principalmente a los dominios CC2 y CC3 (Fig. 14). CC1 parece interactuar con CC2 y CC3 en el estado de reposo manteniendo a STIM1 en una conformación cerrada. Sin embargo, cuando se produce una disminución del Ca^{2+} contenido en los depósitos la conformación de STIM1 pasa a un estado abierto exponiendo los dominios CC2 y CC3 que interactúan con ORAI1 provocando su activación (Korzenowski *et al.*, 2011).

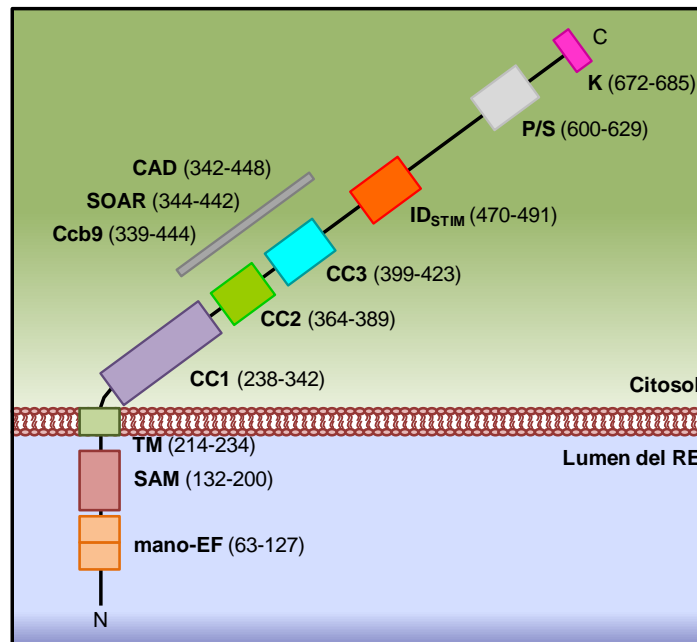


Figura 14. Topología y dominios de STIM1. STIM1 se encuentra insertado en la membrana del RE gracias a la presencia de un dominio transmembrana (TM). En su parte luminal presenta un dominio mano-EF (canónico y no canónico) y un motivo alfa estéril (SAM). En su parte citosólica contiene 3 dominios *coiled-coil* (CC1-3), un dominio de inactivación (ID_{STIM1}), un dominio rico en prolinas y serinas (P/S) y un dominio rico en lisinas (K). Además presenta tres dominios funcionales solapados, el dominio de activación CRAC (CAD), la región de activación STIM1-Orai1 (SOAR) y la región b9 conteniendo un dominio *coiled-coil* (Ccb9).

Por otra parte, la actividad de STIM1 puede ser regulada mediante fosforilación. Así, se ha descrito que la fosforilación puede activar o inactivar STIM1 dependiendo del tipo celular, la fase del ciclo celular en la que se encuentre o el residuo que está siendo modificado (Pozo-Guisado y Martín-Romero, 2013). Además, STIM1 presenta otra modificación postraduccional, un par de N-glicosilaciones en su dominio SAM (Dziadek y Jonhstone, 2007).

Aparte de encontrarse en la membrana del RE, aproximadamente del 10 al 20% del total de proteínas STIM1 se encuentran de forma constitutiva en la membrana plasmática. Esta fracción de STIM1 parece regular la entrada de Ca²⁺ a través de los canales operados por ácido araquidónico, una vía independiente de la ECC (Mignen *et al.*, 2007). La fracción encontrada en el RE, además de modular la ECC puede regular la entrada de Ca²⁺ operada por voltaje. De esta forma, STIM1 puede inhibir la apertura del canal Cav1.2 (Park *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010) e inhibir su expresión estimulando su internalización (Park *et al.*, 2010). Este proceso podría ser relevante en células de músculo liso vascular donde conviven canales SOC y VOC y cuya importancia relativa depende del fenotipo celular contráctil o proliferativo (Muñoz *et al.*, 2013).

STIM1 ha sido implicado en numerosas patologías relacionadas con el sistema inmune debido a la importancia de la ECC en la función de las células T. La deficiencia en STIM1 da lugar tanto a inmunodeficiencias como a enfermedades autoinmunes. Así, por ejemplo, en modelos animales se ha determinado que STIM1 puede jugar un papel en el desarrollo de la esclerosis múltiple. Otras enfermedades relacionadas con STIM1 son la hipertensión, diabetes, infarto debido a su participación en la expresión de SGK-1 (*serum and glucocorticoid inducible kinase 1*) (Mukherjee y Brooks, 2014). Por otra parte, un estudio revela que diferentes mutaciones en STIM1 dan lugar a una miopatía congénita (Hedberg *et al.*, 2014). Además, el cambio en la expresión de STIM1 es relevante en el remodelado fenotípico del músculo liso vascular importante en la aparición de enfermedades cardiovasculares (Lompre *et al.*, 2013). Por ejemplo, un incremento en la expresión de STIM1 en las células de músculo liso de arteria coronaria humana puede dar lugar al desarrollo de aterosclerosis en esa arteria que incrementa el riesgo de infarto de miocardio (Muñoz *et al.*, 2013). Por último, STIM1 ha sido relacionado con el desarrollo de numerosos tipos de cáncer (Chen *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Umemura *et al.*, 2014).

4.1.4. STIM2

El gen de STIM2 fue identificado realizando un cribado de secuencias relacionadas con STIM1 en humanos, en la región 4p15.1 (Williams *et al.*, 2001). STIM2 se expresa de manera ubicua en todos los tipos celulares al igual que STIM1, siendo la isoforma predominante en neuronas (Berna-Erro *et al.*, 2009) y células dendríticas (Bandyopadhyay *et al.*, 2011). La proteína STIM2 se trata de una proteína transmembrana tipo I (al igual que STIM1) de 746 aminoácidos (84 KDa). STIM2 presenta aproximadamente un 61 % de homología con STIM1 (Muik *et al.*, 2012). Así, los dominios mano-EF y SAM localizados en la región N-terminal muestran una alta homología con los de STIM1, por lo que su diferencia radica principalmente en la región C-terminal. En esta última, STIM2 contiene una región rica en prolinas e histidinas (P/H) que no se encuentra en STIM1. Por otro lado, no presenta el típico péptido señal N-terminal de las proteínas que residen en el RE, sino que tiene un péptido señal más largo y altamente conservado en animales placentarios. Además, STIM2 presenta un dominio SAM con mayor estabilidad que en el caso de STIM1. Otra diferencia con STIM1 radica en que STIM2 presenta un solo sitio de N-glicosilación en el dominio SAM en lugar de los dos que contiene STIM1 (Fig. 15) (López *et al.*, 2012; Soboloff *et al.*, 2012; Hoth y Niemeyer, 2013). Cuando el péptido señal no es eliminado de la secuencia inicial se genera una proteína denominada preSTIM2. Esto tiene lugar si la proteína una vez sintetizada no es transportada al RE, lo que provoca que permanezca en el citosol y no sea glicosilada. La cantidad citosólica de STIM2 es una fracción minoritaria del total de proteína y tiene la peculiaridad de activar ORAI1, pero a través de un modo independiente del vaciamiento de los depósitos (Graham *et al.*, 2011).

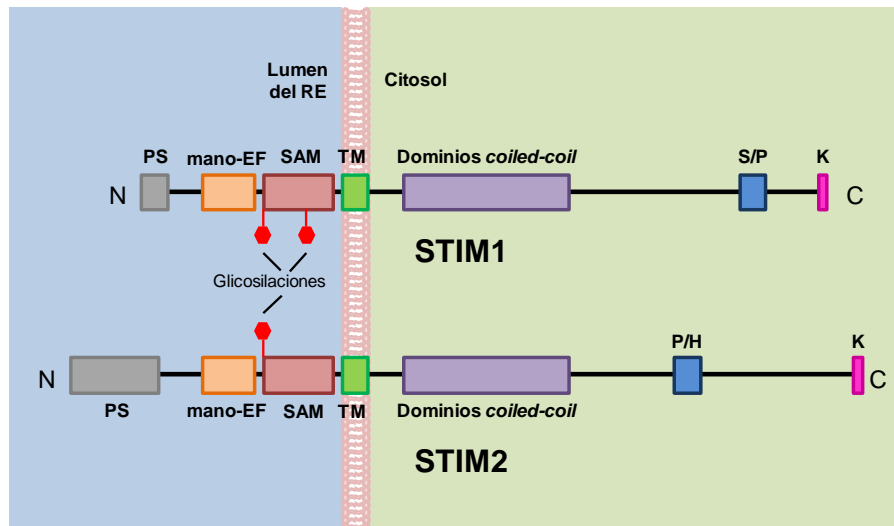


Figura 15. Topología y dominios de STIM1 y STIM2. Ambas proteínas presentan en su extremo N-terminal un dominio mano EF y un motivo alfa-estéril (SAM) y están ancladas a la membrana del RE por medio de un dominio transmembrana. El SAM de STIM1 contiene dos glicosilaciones, mientras que STIM2 solo presenta una. Asimismo, STIM2 contiene un péptido señal con una longitud mayor que STIM1. En su extremo C-terminal tanto STIM1 como STIM2 presentan dominios *coiled-coil* y un dominio rico en lisinas (K). Además, STIM1 contiene en ese extremo un dominio rico en serinas y prolinas (S/P), en cambio, STIM2 presenta un dominio rico en prolinas e histidinas (P/H).

Al igual que STIM1, STIM2 participa en la ECC, sin embargo se ha descrito que su sobreexpresión reduce la entrada de Ca^{2+} mediada por STIM1 (Soboloff *et al.*, 2006). En cambio, otros estudios muestran que la sobreexpresión de esta isoforma, también, produce un incremento en la ECC, pero provoca una activación de ORAI1 más lenta que la llevada a cabo por STIM1 (Parvez *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009). Además, STIM2 presenta menor afinidad por el Ca^{2+} . De esta forma, STIM2 responde a disminuciones más leves de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$, lo que le permite actuar como un regulador de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{C}}$ y del RE. Así, se ha descrito que la EC_{50} de STIM2 es de $406 \mu\text{M}$, mientras que la de STIM1 es de tan solo $210 \mu\text{M}$ (Brandman *et al.*, 2007). Esa menor afinidad por el Ca^{2+} permite a STIM2 mantener la ECC cuando los depósitos de Ca^{2+} se han rellenado tanto como para inactivar STIM1 (Oh-Hora *et al.*, 2008). También, la diferencia de afinidad de ambos STIM es importante, ya que, da lugar a la activación de uno o del otro dependiendo del agonista que provoca oscilaciones de Ca^{2+} en cada momento (Kar *et al.*, 2012). Así, STIM2 participa en las oscilaciones de Ca^{2+} generadas a consecuencia de un vaciamiento medio de los depósitos (Thiel *et al.*, 2013). Por otra parte, se ha demostrado que la oligomerización de STIM2 es más lenta que la de STIM1, lo que podría explicar que la activación de ORAI1 por STIM2 fuera, también, más lenta (Soboloff *et al.*, 2012). Muy recientemente, se ha descrito que las diferentes isoformas obtenidas por splicing de STIM2 pueden presentar distinta función en la ECC. De esta manera, STIM2.2 interacciona con ORAI1 tras el vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} dando lugar a su activación. En cambio, STIM2.1

presenta un papel inhibitorio en la ECC, ya que la interacción con ORAI1 no es suficiente para provocar la apertura del canal. Como consecuencia, este hecho podría arrojar más luz sobre la controversia acerca de la función de STIM2 en la ECC (Miederer et al., 2015).

En cuanto a las patologías en las que se ha visto involucrado a STIM2 destacan algunas enfermedades en las que se encuentra afectado el sistema nervioso. Así, por ejemplo, una mutación de la presenilina-1, la cual provoca enfermedad de Alzheimer familiar, puede llevar a cabo su acción a través de STIM2 (Ryazantseva *et al.*, 2013). Además, la expresión de STIM2 parece estar incrementada en modelos animales de epilepsia crónica, así como en el lóbulo temporal de pacientes con epilepsia (Steinbeck *et al.*, 2011). STIM2, también, puede estar implicado en enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple según se desprende de estudios con modelos animales (Ma *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha apuntado una posible participación de STIM2 en la progresión de algunos tipos de cáncer (Motiani *et al.*, 2010; Stanisiz *et al.*, 2014).

4.2. Superfamilia de los canales TRPs

El estudio de los canales iónicos de la superfamilia TRP (del inglés, *transient receptor potencial*) tiene su origen en la identificación de un canal implicado en la fototransducción en *Drosophila* donde fue clonado por primera vez. La existencia de una mutación en el gen *trp* que provoca la ceguera de la mosca permitió su identificación en la misma. Así, la absorción de un fotón por parte de la rodopsina activa una cascada de la fosfolipasa C que conduce a una primera despolarización mediada por Na^+ seguida de una despolarización sostenida debida a la entrada de Na^+ y Ca^{2+} . La mutación en el gen *trp* de *Drosophila* impide que se produzca la despolarización sostenida durante la fototransducción, lo que sugería que *trp* estaba implicado en la entrada de Ca^{2+} que tiene lugar durante esa fase (Montel y Rubin 1989; Hardie y Minke, 1993).

Una vez que se descubrió que el canal *trp* presentaba una cierta selectividad para Ca^{2+} conjuntamente con la idea de que en *Drosophila*, este canal es activado a través de la acción de la fosfolipasa C se comenzó a especular sobre su posible participación en la ECC. Como consecuencia, el canal *trp* de *Drosophila* fue expresado en células de insecto Sf9, lo que provocó un aumento en la entrada de Ca^{2+} inducida por tapsigargina confirmando la implicación del canal en la ECC (Vaca *et al.*, 1994; Parekh y Putney, 2005). Sin embargo, otros estudios en *Drosophila* descartan que el *trp* sea un canal operado por depósitos, ya que muestran que es activado por productos de la fosfolipasa C como el diacilglicerol. Este hecho aporta una gran controversia acerca de la participación del canal *trp* en la ECC (Hardie, 2003; Montell, 2003; Parekh y Putney, 2005), la cual todavía no ha sido resuelta

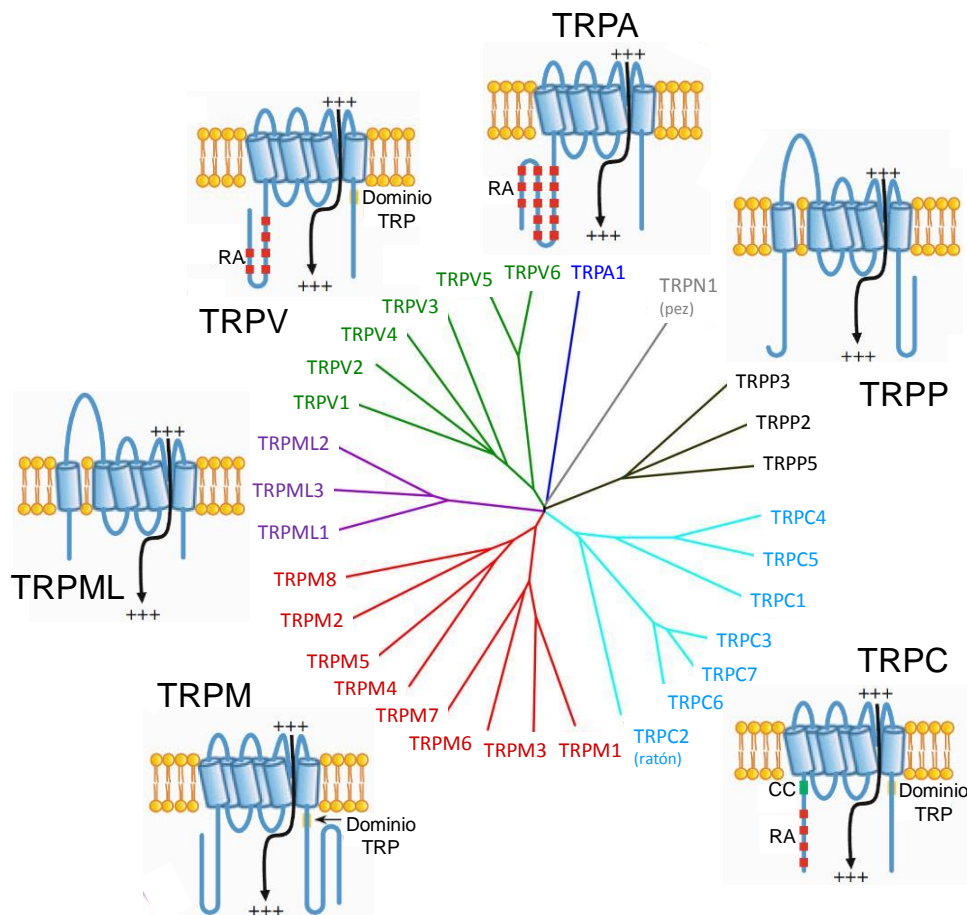


Figura 16. Árbol filogenético y estructura de los miembros de la superfamilia de canales TRP en humanos. El *TRPC2* es un pseudogen en humanos y *TRPN* no está presente en mamíferos por lo que para la realización del árbol fue tomado el *TRPC2* de *Mus musculus* y el *TRPN1* del pez *Danio rerio*. Todos los TRPs comparten una estructura de 6 dominios transmembrana con el extremo amino y carboxilo terminal en el lado citosólico y el poro del canal entre el quinto y el sexto dominio transmembrana. Los canales de las familias TRPA, TRPC y TRPV presentan repeticiones de anquirina (RA). Además, los canales TRPCs contienen un dominio *coiled-coil* (CC). Los canales TRPCs y TRPMs presentan un dominio TRP que se compone de las cajas 1 y 2, sin embargo los TRPVs solo contienen la caja 1. La figura fue adaptada de Nilius *et al.*, 2011 y de Venkatachalam *et al.*, 2014.

En mamíferos se han descrito 28 canales (27 en humanos) pertenecientes a la superfamilia TRP, los cuales tienen un papel esencial en la célula como sensores polimodales. Todos presentan una estructura común de seis segmentos transmembrana (S1-S6), conteniendo los residuos que forman el poro permeable a cationes entre los segmentos S5 y S6. La longitud de los extremos C y N-terminal, así como los dominios estructurales que presentan varían de forma significativa entre las familias de canales (Owsianik *et al.*, 2006). Asimismo, los TRPs se han clasificado en seis familias: TRPC (TRPC1-7), C de canónicos (o clásicos), llamados así por su similitud al *trp* de *Drosophila*; TRPV (TRPV1-6), V de vaniloides, por ser activados por compuestos vaniloides como la capsaicina; TRPM (TRPM1-8), M de

melastatina, que toma el nombre del gen del primer miembro descrito; TRPP (TRPP2-5), P de policistina, puesto que están mutados en la enfermedad renal poliquística; TRPML (TRPML1-3), M de mucolipina, por estar codificados por los genes de mucolipina; y TRPA (TRPA1), A de anquirina, haciendo referencia a que contienen varias repeticiones de anquirina, un dominio estructural (Fig. 16) (Flockerzi y Nilius, 2014).

Desde que se describieron todos los miembros de la superfamilia de los canales TRPs arriba mencionados, hay numerosos trabajos en los que se estudia su participación en la ECC expresando o silenciando, para ello, estos canales en diferentes tipos celulares. En algunos de ellos queda clara la implicación de ciertos TRPs en la ECC, sin embargo, ésta parece ser descartada en otros a pesar de ser realizados en condiciones muy similares. La polémica en torno a la participación de los TRPs en la ECC surgió, en parte, por el uso de agonistas de receptores acoplados a la vía de la fosfolipasa C, que pueden activar SOCs debido a la formación de IP_3 , pero también, podrían activar canales de manera independiente de depósitos, por medio de otros segundos mensajeros generados como el diacilglicerol y el PIP_2 (Lewis, 2011). Además, por lo general, la selectividad iónica y las propiedades farmacológicas de la corriente mediada por los TRPs difieren de las de la corriente I_{CRAC} característica de los canales ORAI (Parekh y Putney, 2005). En los siguientes subapartados nos centraremos en los estudios que relacionan a los TRPs con la ECC.

4.2.1. TRPCs

La familia de los canales TRPCs está formada por 7 proteínas en mamíferos. Sin embargo, en humanos incluye 6 miembros, los cuales se clasifican, a su vez, en dos subfamilias teniendo en cuenta su relación filogenética. Así, TRPC1, TRPC4 y TRPC5 se agrupan en una subfamilia y TRPC3, TRPC6 y TRPC7 en otra. *TRPC2* es un pseudogen en humanos, pero se expresa en otras especies de mamífero como el ratón o la rata (Cheng *et al.*, 2013).

La implicación de TRPC1 en la ECC parece ser la más sólida, ya que es la que más apoyo presenta por parte de los innumerables trabajos centrados en el estudio de los TRPs como SOCs. La primera evidencia que se tuvo de la participación de TRPC1 en la ECC fue a través de un estudio en el que se expresó TRPC1 en células COS y se observó un incremento de la entrada de Ca^{2+} inducida por tapsigargina. Más tarde, la expresión de TRPC1 fue reducida en células ductales de glándula submandibular humana, lo que provocó una disminución en la ECC indicando que el TRPC1 endógeno, expresado por las células, está implicado en la ECC (Liu *et al.*, 2000). Además, se ha reducido la ECC mediante el silenciamiento de TRPC1 confirmando su participación en dicha entrada de Ca^{2+} en otros tipos celulares como linfocitos B (Mori *et al.*, 2002), en músculo esquelético (Vandebrouck *et al.*, 2002), liso (Lin *et al.*, 2004), cardiaco (Ohba *et al.*, 2007), en queratinocitos (Cai *et al.*, 2006), en células epiteliales intestinales (Rao *et al.*, 2006), en endoteliales (Tiruppathi *et al.*, 2006), y en HEK293 (Zagranichnaya *et al.*, 2005). La

mutación de algunos de los residuos que forman el poro de TRPC1 provocó una reducción en la ECC, lo que sugiere que TRPC1 está involucrado directamente en esta entrada de Ca^{2+} aportando el poro del canal, no funciona solo como una proteína reguladora (Liu *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha reportado que TRPC1 permite la entrada de Ca^{2+} de una manera dependiente del vaciamiento de los depósitos a través de su interacción con STIM1. Esto fue demostrado mediante la co-inmunoprecipitación de STIM1 y TRPC1 tras el vaciamiento de los depósitos y a que el silenciamiento o la inhibición de STIM1 daba lugar a una reducción de la entrada de Ca^{2+} mediada por TRPC1 (Huang *et al.*, 2006; López *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2007). Incluso, se ha propuesto la formación de un complejo ternario entre STIM1, ORAI1 y TRPC1 que podría mediar ECC en células glandulares salivares (Ong *et al.*, 2007). Asimismo, se ha descrito un mecanismo que puede explicar la relación entre los miembros de ese complejo consistente en que la entrada de Ca^{2+} mediada por ORAI1 y STIM1 regulan la actividad de TRPC1 controlando la inserción de TRPC1 en la membrana plasmática (Cheng *et al.*, 2011).

TRPC4 y TRPC5, los cuales guardan una gran homología con TRPC1, también han sido relacionados con la ECC. En primer lugar, la expresión de TRPC4 provoca la activación de la corriente operada por depósitos en células HEK293 (Philipp *et al.*, 1996) y en CHO (Warnat *et al.*, 1999). Por otra parte, el silenciamiento de TRPC4 da lugar a una reducción de la corriente operada por depósitos en células de corteza adrenal bovina. En este caso, las propiedades de la corriente son similares a las de la I_{CRAC} mediada por ORAI, lo que sugiere que TRPC4 también pudiera estar implicada en la misma (Philipp *et al.*, 2000). Además el, silenciamiento de TRPC4 provoca una disminución de la ECC en células mesangiales de ratón (Wang *et al.*, 2004). TRPC5 fue descrito por primera vez como un SOC mediante su expresión en células HEK293 y el registro tanto de la corriente como de la entrada de Ca^{2+} (Philipp *et al.*, 1998). Su silenciamiento en monocitos humanos provoca una reducción en la ECC, apoyando la participación de TRPC5 en dicha entrada de Ca^{2+} (Liu *et al.*, 2007). Es interesante destacar que la actividad de TRPC5 está regulada por la entrada de Ca^{2+} inducida por ORAI1 y STIM1, en cuanto que ésta es importante para mantener una actividad sostenida de TRPC5 (Gross *et al.*, 2009). Al igual que en el caso de TRPC1, STIM1 parece interaccionar con TRPC4 y TRPC5 determinando su función como SOCs (Yuan *et al.*, 2007).

Los canales TRPCs pertenecientes a la otra subfamilia, TRPC3, TRPC6 y TRPC7 se pueden considerar como canales operados por segundo mensajero, ya que son activados por productos derivados de la actividad de la fosfolipasa C como el diacilglicerol. Sin embargo, unos pocos estudios apoyan su implicación en la ECC, principalmente en el caso de TRPC3 (Dietrich *et al.*, 2005; Eder *et al.*, 2008). Así, uno de los estudios que apoyan la participación de TRPC3 en la ECC consistió en la expresión de este canal en células HEK293, lo que dio lugar a la activación de una corriente inducida por taspigargina (Kiselyov *et al.*, 1999). Además, otro trabajo muestra que la delección de TRPC3 en un modelo de ratón reduce la ECC (Kim *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha descrito que al expresar TRPC3 en células T se incrementa la corriente inducida por IP_3 (Philipp *et al.*, 2003). Por otra parte, el silenciamiento de TRPC6

produce una reducción de la entrada de Ca^{2+} inducida por CPA inducida por en células de músculo liso de arteria pulmonar, lo que indica que TRPC6 está participando en la ECC en esas células (Yu *et al.*, 2003). Años más tarde, este hecho fue confirmado gracias al silenciamiento de TRPC6 en las mismas células que disminuyó el incremento de la ECC producido por hipoxia (Smith *et al.*, 2015). Además, TRPC6 parece estar implicado, también, en la ECC de las plaquetas como muestra un ensayo con un anticuerpo anti-TRPC6 (Jardín *et al.*, 2008). Mediante la expresión de TRPC7 en células HEK293 y su activación con taspigargina se mostró que esta proteína puede funcionar como un canal operado por depósitos, además de operado por receptor (Lievremont *et al.*, 2004). En cambio, un trabajo posterior del mismo laboratorio puso en duda que TRPC7 participe como canal en la ECC, ya que no fue activado ni con IP_3 , ni con ionomicina (DeHaven *et al.*, 2009).

También, se ha descrito que los canales TRPCs pueden estar compuestos por subunidades diferentes, formando heterómeros que están implicados en la ECC. De hecho, esto explicaría por qué en numerosos estudios de sobreexpresión de tan solo uno de los miembros de los canales TRPCs no se produce ningún efecto sobre la ECC. Esto podría ser debido a que el canal estudiado necesita de su heteromerización con otros miembros que no se expresan de manera suficiente de manera endógena en la célula (Parekh y Putney, 2005). Asimismo, los canales formados por TRPC1 y TRPC3 parecen participar en la ECC de las células ductales de glándula parótida humana (Liu *et al.*, 2005), así como en líneas celulares de hipocampo de rata (Wu *et al.*, 2004). Además, TRPC1 y TRPC4 dan lugar a heterómeros implicados en la ECC en células endoteliales (Sundivakkam *et al.*, 2012) y TRPC1, TRPC3 y TRPC7 en células HEK293 (Zagranichnaya *et al.*, 2005).

4.2.2. TRPV4 y TRPV6

En cuanto a la implicación de los TRPs vaniloideos o TRPVs en la ECC, TRPV4 parece contribuir a la entrada de Ca^{2+} inducida por taspigargina en células endoteliales a través de la formación de heterómeros con TRPC1 (Ma *et al.*, 2011a).

Otro miembro de la familia TRPV que también ha sido relacionado con la ECC es TRPV6, ampliamente conocido por su función en la absorción intestinal de Ca^{2+} (Peng *et al.*, 1999). Así, la expresión de TRPV6 en células CHO (línea celular de ovario de hámster chino) mostró que este canal está operado por depósitos, aunque solo durante las primeras horas tras la transfección. Además, las propiedades electrofisiológicas de la corriente mediada por el mismo son similares a las de la I_{CRAC} (Yue *et al.*, 2001). Por otro lado, el silenciamiento de TRPV6 reduce en un 50 % la ECC en células LNCaP, una línea celular derivada de cáncer de próstata, así como el aumento de su expresión en un 60 % con un tratamiento antiandrogénico provocó un 30 % de incremento de esa entrada de Ca^{2+} . Como consecuencia, los autores del

estudio concluyen que TRPV6 puede formar parte de un canal operado por depósitos conjuntamente con otros TRPs (Vanden Abeele *et al.*, 2003).

4.2.3. TRPM8

TRPM8 se trata de un canal con una clara función como receptor de frío en neuronas sensoriales. Uno de sus agonistas más conocidos es el mentol, el cual provoca sensación de frío como consecuencia de su papel como termoreceptor (Voets *et al.*, 2007). Hasta el momento, no se ha descrito que este miembro de la superfamilia de los TRPs pueda funcionar como un SOC. Sin embargo, se ha tenido en cuenta la posibilidad de que pueda participar de otra forma en la ECC. En un principio, se observó que en células LNCaP el mentol no activaba la corriente clásica mediada por TRPM8, en cambio, inducía una corriente cuyas propiedades electrofisiológicas son similares a una corriente I_{CRAC} . Este hecho se explica porque el TRPM8 en estas células puede estar localizado en el RE en lugar de en la membrana plasmática. Por tanto, el mentol induce la liberación de Ca^{2+} a través de su nueva localización en la célula dando lugar a la activación de la ECC. De esta manera, el TRPM8 situado en el RE puede estar implicado en la ECC actuando como un canal que permite la liberación de Ca^{2+} (Thebault *et al.*, 2005).

4.3. Corrientes operadas por depósitos

Los SOCs median diferentes corrientes iónicas dependiendo de sus propiedades biofísicas que pueden ser medidas mediante técnicas electrofisiológicas como el *patch-clamp*. La primera corriente operada por depósitos (I_{SOC}) descrita fue la corriente de Ca^{2+} activada por la liberación de Ca^{2+} conocida como I_{CRAC} , en mastocitos (Hoth y Penner, 1992). La I_{CRAC} se trata de una corriente de Ca^{2+} no activada por voltaje. El protocolo de activación de la misma consiste en rampas que comienzan en -100 mV y van hasta +100 mV en 50 ms (Fig. 17A). Su relación corriente-voltaje muestra una amplitud de corriente máxima a potenciales negativos que se aproxima a cero a potenciales mayores a +60 mV. Además, presenta una gran rectificación entrante a voltajes negativos (Fig. 17B) (Parekh y Penner, 1997). Esta rectificación entrante es consecuencia de la diferencia en la $[Ca^{2+}]$ entre las soluciones interna y externa con las que se lleva a cabo el registro electrofisiológico, así como de la inactivación dependiente de Ca^{2+} que muestran los canales (Parekh y Putney, 2005). A pesar de que la activación de la I_{CRAC} no tiene lugar tras una despolarización de la membrana, la magnitud de la corriente es dependiente del voltaje. De esta forma, la conductancia es menor a potenciales hiperpolarizantes que a potenciales despolarizantes (Bakowski y Parekh, 2000). Por otra parte, la I_{CRAC} presenta una alta selectividad a Ca^{2+} que parece patente al aproximarse a cero a potenciales muy positivos. La selectividad a Ca^{2+} fue comprobada al sustituir el Na^+ por un

I. INTRODUCCIÓN

cación orgánico de gran volumen como la N-metil-D-glucamina (NMDG⁺), ya que la amplitud y el potencial de reversión no varían (Hoth y Penner, 1993). En cambio, si el Ca²⁺ es sustituido por Na⁺ o Mg²⁺ la corriente desaparece por completo (Hoth y Penner, 1992; Zweifach y Lewis, 1993; Fierro y Parekh, 2000). La alta selectividad a Ca²⁺ sobre Na⁺ viene dada por un ratio de permeabilidad Ca²⁺: Na⁺ de 1000: 1 (Parekh y Putney, 2005). Al reemplazar el Ca²⁺ por Ba²⁺ o Sr²⁺ se observa una reducción de la corriente, por lo que la permeabilidad del canal CRAC a estos dos iones divalentes es menor que a Ca²⁺ (Zweifach y Lewis, 1993). No se aprecia una corriente saliente llevada a cabo por K⁺, lo que dificulta establecer un potencial de reversión de la corriente (Parekh y Penner, 1997). La conductancia de la I_{CRAC} es bastante baja comparada con otras corrientes de Ca²⁺, aproximadamente 0,02 pS en presencia de 110 mM de CaCl₂ (Parekh y Putney, 2005). El canal que media la I_{CRAC} es prácticamente impermeable a Cs⁺ (Bakowski y Parekh, 2002) y, de acuerdo con la baja conductancia, su tamaño de poro fue situado en torno a 3,9 Å (Prakriya y Lewis, 2006).

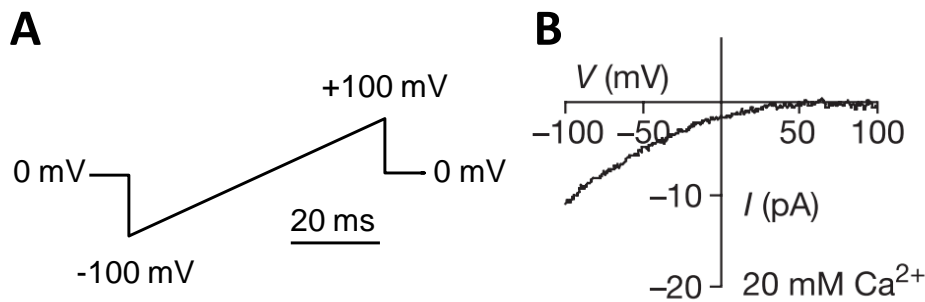


Figura 17. Registro electrofisiológico de la I_{CRAC}. A. Rampa de voltaje de -100 mV a +100 mV llevada a cabo para el registro de I_{CRAC}. B. Relación corriente-voltaje de la I_{CRAC} donde se aprecia que la amplitud de corriente máxima se alcanza a potenciales negativos y se aproxima a 0 a potenciales bastante positivos. Además, presenta una gran rectificación entrante a potenciales negativos. El registro fue tomado de Prakriya *et al.*, 2006.

Todas estas propiedades electrofisiológicas de la corriente I_{CRAC} se ajustaron perfectamente a la corriente mediada por ORAI1, lo que permitió identificarlo como un canal CRAC (Prakriya *et al.*, 2006; Yeromin *et al.*, 2006). A continuación, ORAI2 y ORAI3 también fueron clasificados como canales CRAC (Mercer *et al.*, 2006; Lis *et al.*, 2007). Previamente, TRPV6 fue propuesto como un canal CRAC por su alta selectividad a Ca²⁺ (Yue *et al.*, 2001), pero fue descartado, ya que es más permeable a Cs⁺, puesto que presenta un tamaño de poro de 5,5 Å superior al del canal CRAC (Voets *et al.*, 2001; Voets *et al.*, 2004).

Además de la corriente I_{CRAC}, se han descrito otras corrientes operadas por depósitos caracterizadas por presentar mayor conductancia y una baja selectividad a Ca²⁺ (Parekh y Putney, 2005). Aquí, haremos referencia a algunas de ellas. Así, en células de carcinoma epidermoide A461, se ha caracterizado una I_{SOC} con propiedades distintas a las de la I_{CRAC}. La

permeabilidad para Ca^{2+} y Ba^{2+} es muy similar, pero 1000 veces mayor que para K^+ y la conductancia es mayor que la de I_{CRAC} , 1 pS en presencia de 100 mM de CaCl_2 (Zaznacheyeva *et al.*, 2000). En esas mismas células, otro grupo reportó una I_{SOC} con una selectividad a Ba^{2+} mayor que a Ca^{2+} y con una conductancia de 2 pS con 160 mM de CaCl_2 (Lueckhoff y Clapham, 1994). En cambio, en células endoteliales de aorta bovina se registró una corriente con una alta conductancia, 11 pS en presencia de 10 mM de CaCl_2 , con un ratio de permeabilidad $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ mayor de 10:1 y una selectividad a Na^+ mayor que la I_{CRAC} (Vaca y kunze, 1994). Por otra parte, en miocitos de aorta de ratón y de conejo aparece una I_{SOC} con una conductancia de 2,7 pS en presencia de 90 mM de CaCl_2 cuya permeabilidad a Ca^{2+} es igual a la de Na^+ . Los canales que median esta corriente fueron selectivos para cationes, pero no discriminaban entre Na^+ , K^+ , Cs^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} o Sr^{2+} (Trepakova *et al.*, 2000; Trepakova *et al.*, 2001).

Las características de las corrientes operadas por depósitos distintas a I_{CRAC} parecen ser mediadas en la mayoría de los casos por diferentes TRPs, en especial por miembros de la familia de los TRPCs. Éstos han sido clasificados como canales catiónicos no selectivos, ya que presentan una selectividad para el Ca^{2+} baja comparada con la de los canales CRAC. La relación corriente-voltaje de las corrientes mediadas por los TRPCs es relativamente lineal, muy diferente a la de la I_{CRAC} , así como la conductancia que es bastante superior a ésta. Muestran potenciales de reversión próximos a 0 mV o ligeramente positivos siendo bastante más bajos que los de la I_{CRAC} . Las propiedades de la corriente catiónica no selectiva varían dependiendo de los canales TRPCs que estén implicados en la misma (Cheng *et al.*, 2013). Así, por ejemplo, la I_{SOC} mediada por TRPC1 en células HSG presenta una ligera rectificación entrante con un potencial de reversión aproximadamente de +15 mV y una conductancia de 20 pS (Liu *et al.*, 2003). La sobreexpresión de TRPC1 en células HEK293 da lugar a una corriente con una relación corriente-voltaje prácticamente lineal, un potencial de reversión de +30 mV y una conductancia de 16-17 pS (Skopin *et al.*, 2013). Por otro lado, el canal formado por la heteromerización de TRPC1 y TRPC3 en células de glándula salival parótida da lugar a una I_{SOC} no selectiva a Ca^{2+} con una relación corriente-voltaje lineal y un potencial de reversión próximo a 0 mV (Liu *et al.*, 2005). Otra corriente mediada por un heterómero es la del canal TRPC1/TRPC4, identificado en células endoteliales que da lugar a una corriente con una rectificación entrante y un potencial de reversión próximo a +40 mV cuando está interaccionando con ORAI1. Sin embargo, el silenciamiento de ORAI1 disminuye el potencial de reversión sugiriendo que ORAI1 contribuye a la selectividad a Ca^{2+} de ese canal TRPC1/TRPC4 (Cioffi *et al.*, 2012). También, los TRPCs pueden heteromerizar con otros miembros de la superfamilia de los TRPs para dar lugar a una corriente catiónica operada por depósitos no selectiva. Asimismo, la I_{SOC} obtenida al coexpresar TRPC1 y TRPV4 en células HEK293 presenta una relación corriente-voltaje, de nuevo, bastante lineal con un potencial de reversión de 0 mV (Fig. 18) (Ma *et al.*, 2011a). Además, muestra una gran conductancia, aproximadamente 83 pS para la corriente entrante y de 95 pS para la saliente (Ma *et al.*, 2011b).

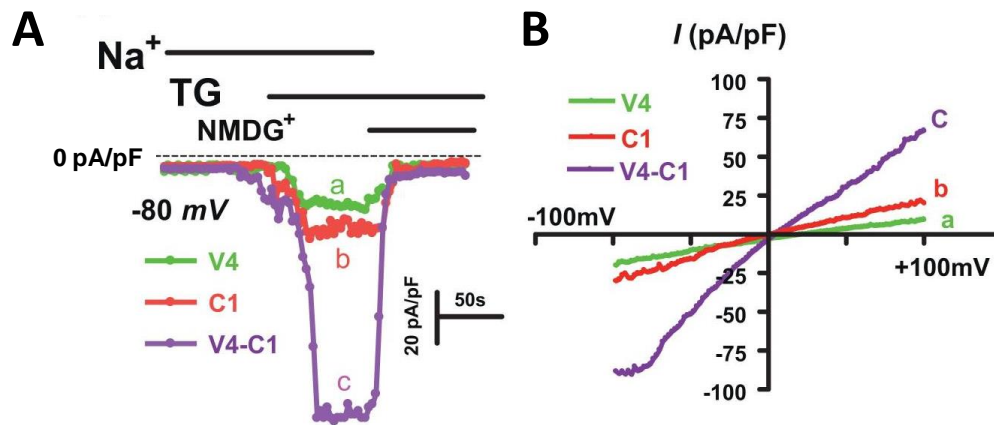


Figura 18. Corrientes operadas por depósitos (I_{50C}) no selectivas obtenidas al sobreexpresar TRPC1, TRPV4 o ambos en células HEK. A. Activación de las corrientes con tapsigargina. La corriente se ve incrementada considerablemente al sobreexpresar simultáneamente ambos canales. Presentan una baja selectividad a Ca^{2+} , ya que al sustituir el Na^+ por $NMDG^+$ se inhibe la corriente sugiriendo que en gran medida se componen de Na^+ . B. Relación corriente-voltaje de las I_{50C} no selectivas a Ca^{2+} . Presentan una relación corriente-voltaje altamente lineal con un potencial de reversión próximo a 0 mV. Ambas características son propias de las corrientes operadas por depósitos no selectivas medidas por los TRPs. Figura procedente de Ma *et al.*, 2011a.

4.4. Control mitocondrial de la entrada capacitativa de Ca^{2+}

La capacidad de la mitocondria para captar el Ca^{2+} de la célula permite que en condiciones fisiológicas éstas actúen como un tampón de Ca^{2+} regulando la ECC mediada por los canales CRAC. Por tanto, no solo los depósitos de Ca^{2+} controlan la ECC, sino también, la mitocondria que retira el Ca^{2+} proveniente de la entrada de este ión en la célula a través de los canales CRAC (Parekh, 2008). Este hecho queda patente al verse reducida la ECC cuando se despolariza la mitocondria con bloqueantes de la cadena respiratoria como la antimicina A (Glitsch *et al.*, 2002; Malli *et al.*, 2003) o con desacoplantes mitocondriales como el CCCP (Wasniewska *et al.*, 2000) y el FCCP (Glitsch *et al.*, 2002; Nuñez *et al.*, 2006) que introducen protones en la misma. Esta reducción de la ECC, también, es observada al silenciar o al bloquear con rojo de rutenio el MCU (Tang *et al.*, 2015). La regulación de los canales CRAC por parte de la mitocondria tiene lugar en varias etapas de la ECC.

La primera etapa en la que actúa la mitocondria se trata de la activación de los canales CRAC. La mitocondria se localiza en lugares próximos a los depósitos de Ca^{2+} , a menos de 20 nm, donde detecta los microdominios de Ca^{2+} que se forman en torno a los receptores de IP_3 (Rizzuto *et al.*, 1993; Rizzuto *et al.*, 1998; Moreau *et al.*, 2006). El incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ puede provocar la inactivación dependiente de Ca^{2+} de los receptores de IP_3 (Taylor y Traynor, 1995) y, por otra parte, permite a la SERCA bombear Ca^{2+} hacia el interior de los depósitos. Ambos procesos van a reducir la activación de los canales CRAC al oponerse al vaciamiento de los depósitos. Así, la simple estimulación de los receptores de la membrana plasmática o el uso

de IP_3 no son suficientes para la activación de la I_{CRAC} en células dializadas a no ser que las mitocondrias sean mantenidas en un estado energizado (Bakowski y Parekh, 2001; Glitsch *et al.*, 2002). La captación mitocondrial de Ca^{2+} reduce la inactivación dependiente de Ca^{2+} de los receptores de IP_3 , así como la cantidad de Ca^{2+} disponible que puede ser reintroducido en los depósitos por parte de la SERCA. De esta forma, la mitocondria permite una mayor liberación de Ca^{2+} de los depósitos y se dificulta su relleno, lo que favorece la activación de los canales CRAC (Gilabert *et al.*, 2001).

Además, se ha reportado que la mitocondria participa, también, en la inactivación lenta dependiente de Ca^{2+} de los canales CRAC. Así, la inactivación lenta se ve acelerada al inhibir la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria, tanto despolarizando la misma con FCCP o antimicina A como bloqueando el MCU con rojo de rutenio. En cambio, la energización de la mitocondria reduce esta inactivación lenta (Gilabert y Parekh, 2000). En células T jurkat se ha observado que la mitocondria se transloca hacia la membrana plasmática tras la entrada de Ca^{2+} a través de los canales CRAC, ya que previniendo la migración de la mitocondria con nocodazol, un despolimerizador de los microtúbulos, se acelera la inactivación lenta dependiente de Ca^{2+} (Quintana *et al.*, 2007). Por tanto, la mitocondria se dirige hacia los canales CRAC cuando se activa la ECC y tampona el Ca^{2+} frenando la inactivación lenta dependiente de Ca^{2+} (Watson y Parekh, 2012).

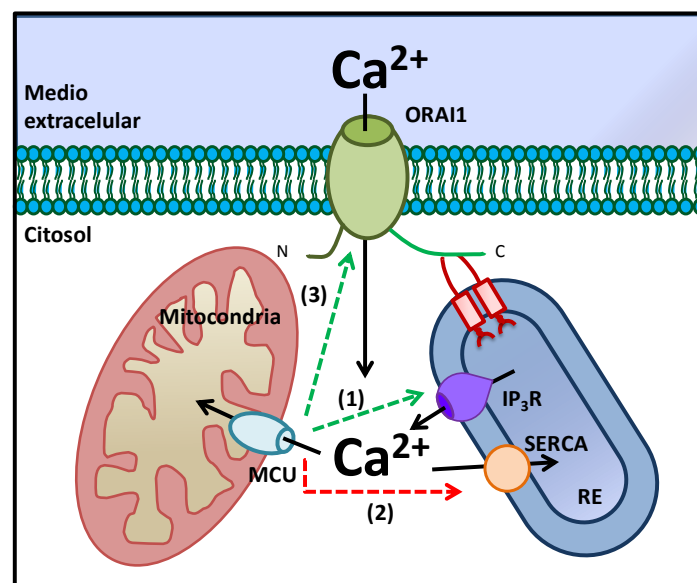


Figura 19. Regulación mitocondrial de la ECC mediante el tamponamiento de Ca^{2+} . La mitocondria regula la ECC actuando como un tampón de Ca^{2+} de tres formas diferentes. En primer lugar, la captación mitocondrial a través del MCU reduce la inactivación dependiente de Ca^{2+} del IP_3R lo que contribuye a la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos y, como consecuencia, a la activación de la ECC (1). Además, la mitocondria compite con el RE por el Ca^{2+} disminuyendo el relleno de los depósitos mediado por la SERCA lo que prolonga la activación y dificulta la finalización de la ECC (2). Por último, la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria disminuye la inactivación dependiente de Ca^{2+} de los canales CRAC favoreciendo la ECC (3).

Por otra parte, la mitocondria parece controlar la ECC de una manera independiente de su acción como tampón de Ca^{2+} . Asimismo, la despolarización de la mitocondria reduce la formación de la punta de STIM1 en la membrana plasmática, sin impedir su oligomerización, en un proceso en el que interviene la mitofusina-2, una proteína situada en la membrana externa mitocondrial. Como consecuencia, este hecho sugiere que la mitocondria es necesaria para el movimiento de STIM1 hacia zonas próximas a la membrana plasmática (Singaravelu *et al.*, 2011). También, la mitocondria podría regular la ECC a través de señales difusibles que pueden ser liberadas desde este orgánulo. El ATP procedente de la mitocondria puede ser utilizado por la SERCA para rellenar los depósitos de Ca^{2+} , lo que contribuye a la desactivación de la ECC (Landolfi *et al.*, 1998). Además, se ha descrito que el piruvato, un sustrato precursor de la respiración mitocondrial, reduce el alcance de la inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} de los canales CRAC, regulando así la ECC (Bakowski y Parekh, 2007).

4.5. Papel funcional de la entrada capacitativa de Ca^{2+} en la célula

La función más evidente de la ECC en la célula es el rellenado de los depósitos tras la liberación del Ca^{2+} como consecuencia de la unión de un agonista a su receptor en la membrana plasmática. Por tanto, tiene un papel importante en el mantenimiento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$, ya que una disminución prolongada de su concentración da lugar a estrés de retículo que puede desencadenar en apoptosis (Meldolesi, 1993; Parekh y Putney, 2005). Otra función bastante clara de esta entrada de Ca^{2+} es la de aumentar la señal de Ca^{2+} tras la estimulación con concentraciones bajas de agonistas fisiológicos (Putney, 2009). Además, la ECC parece ser clave en el mantenimiento de las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por esos agonistas (Bird y Putney, 2005).

La ECC regula la actividad de diversas enzimas. En células endoteliales, activa la NO sintasa dando lugar a la producción de NO que funciona como un mensajero intra e intercelular (Lin *et al.*, 2000). También, la ECC mediada por ORAI1 favorece la actividad de la fosfolipasa C y D regulando así, el TRPC6 en plaquetas (Chen *et al.*, 2014c). Otra enzima regulada por la ECC es la adenilato ciclasa, ya que en células de glioma, la entrada de Ca^{2+} inducida por tapsigargina inhibe la forma tipo VI y estimula la tipo I (Cooper *et al.*, 1998).

Un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{C}}$ provoca secreción en algunos tipos celulares, como consecuencia, se ha reportado en varios trabajos que la ECC participa en la exocitosis. Así, la entrada de Ca^{2+} a través de los canales CRAC provoca exocitosis en células RBL, una línea celular de leucemia basofílica de rata (Artalejo *et al.*, 1998). También, se observó que las células T mutantes que no presentan I_{CRAC} muestran una respuesta secretora anormal sugiriendo que la ECC participa en la secreción de las células T (Fanger *et al.*, 1995). Por otra parte, la ECC participa en el proceso de degranulación en mastocitos, por la que se secretan diversas sustancias importantes en la respuesta inmunoinflamatoria (Yang *et al.*, 2012). Al

margen del sistema inmune, la ECC está implicada en la secreción de células excitables como las células adenohipofisarias (Villalobos y García-Sancho, 1995) y las células cromafines adrenales (Fomina y Nowycky, 1999).

El incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ a consecuencia de la ECC activa la expresión de determinados genes en la célula a través de ciertos factores de transcripción dependientes de Ca^{2+} . En linfocitos T, el Ca^{2+} que entra a través de los canales CRAC, como consecuencia de la estimulación de su receptor TCR, se une a la CaM en el citosol y, a continuación el complejo Ca^{2+} -CaM activa la fosfatasa calcineurina. Ésta entra el núcleo y defosforila factores de transcripción como NFAT, NFκB y OctA, lo que da lugar a la expresión del gen de la interleuquina-2 (IL-2) y de su receptor provocando así la expansión clonal del linfocito T activado (Dolmetsch *et al.*, 1998, Lewis, 2001). También, la ECC se ha visto implicada en la expresión del factor de transcripción c-fos en mastocitos, que a su vez, regula la expresión de varias quimioquinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF α), importante que participan en la respuesta inmune (Kar y Parekh, 2013). Por otro lado, la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2) parece ser activada como consecuencia de la entrada de Ca^{2+} mediada por los canales operados por depósitos (Wang *et al.*, 2012a; Wang *et al.*, 2014b). La COX-2 está implicada en la síntesis de prostaglandinas por lo que participa en el proceso inflamatorio y en la liberación de citoquinas (Gilroy y Colville-Nash, 2000), así como en la carcinogénesis (Kojima *et al.*, 2001).

Otra función conocida en la que está implicada la ECC es la proliferación celular. Así, se ha reportado que la ECC participa en la expansión clonal de los linfocitos T caracterizada por la proliferación de estas células. Como se ha mencionado, este proceso tiene lugar tras la estimulación con un antígeno del receptor TCR de los linfocitos y la consecuente expresión de determinados genes como el IL-2 bajo el factor de transcripción NFAT (Feske *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2001). Además, se ha observado que la ECC está implicada en la progresión del ciclo celular en el neuroepitelio de la retina (Sugioka y Yamashita, 2003). Por otro lado, la ECC y la expresión de TRPC1 es mayor en miocitos de arteria pulmonar que presentan capacidad para proliferar sugiriendo que la ECC, mediada posiblemente por TRPC1, puede que sea importante en la proliferación de estas células (Golovina *et al.*, 2001). También, se ha descrito que la ECC llevada a cabo por STIM1 y ORAI1 está implicada en la proliferación de las células endoteliales (Abdullaev *et al.*, 2008). En células madre embrionarias la ECC participa en la proliferación mediada por estrógenos (Wong *et al.*, 2012). Por último, recientemente se ha reportado que la estimulación del receptor sensible a Ca^{2+} (CaSR; del inglés, Ca^{2+} -sensing receptor) induce ECC, la cual contribuye a la proliferación de los osteoblastos (Hu *et al.*, 2014).

El Ca^{2+} es esencial en el proceso de activación de las plaquetas que tiene lugar en la hemostasia y la formación del coágulo. Como consecuencia, se ha propuesto a la ECC como una entrada de Ca^{2+} importante en la función plaquetaria. La ECC parece participar en las respuestas tardías de las plaquetas como son la estabilización del trombo, la retracción del

cuáguulo, la actividad coagulante y el reclutamiento de otros tipos celulares hacia la zona donde se ha producido el daño (Varga-Szabo *et al.*, 2009).

También, la ECC parece ser importante en la reproducción a través de diferentes funciones. Por ejemplo, participa en la regulación de la motilidad del espermatozoide (Krasznai *et al.*, 2010). Además, dirige la reacción del acrosoma en la que se produce la exocitosis de las vesículas acrosomales desde el espermatozoide hacia la zona pelúcida del ovocito que tiene lugar durante la fertilización (Breibarth, 2002). Asimismo, STIM1 y ORAI1 están implicados en el papel de la ECC en la maduración de los ovocitos, así como en el proceso de fertilización (Martín-Romero *et al.*, 2012).

Por otra parte, se ha descrito que la ECC puede participar en algunas funciones propias de las células musculares. Asimismo, STIM1, a través de su papel en la ECC, está implicado en el desarrollo y la función contráctil del músculo esquelético (Stiber *et al.*, 2008). La ECC es unos cuantos órdenes de magnitud más rápida en el músculo esquelético que en las células no excitables (Launikonis y Ríos, 2007). De esta forma, se han propuesto modelos basados en la localización de STIM1 y ORAI1 en la triada muscular que explicarían esa cinética de activación más rápida que puede que sea importante en el proceso de acoplamiento excitación-contracción (Dirksen, 2009; Launikonis *et al.*, 2010). En cuanto al músculo liso, se ha observado que la ECC participa en la contracción del músculo de aorta (Tosun *et al.*, 1998), de arteria coronaria (Dominguez-Rodriguez *et al.*, 2012) y de los bronquios (Sweenwey *et al.*, 2002). Además, la ECC puede activar canales de Cl⁻ dependientes de Ca²⁺ en miocitos de arteria pulmonar, lo que permite la regulación del potencial de membrana y del tono muscular (Forrest *et al.*, 2010).

5. Participación del Ca²⁺ en la muerte celular

La muerte celular ha sido estudiada ampliamente por su papel tanto en procesos fisiológicos como en diversas patologías. Actualmente, se han propuesto unos doce tipos diferentes de muerte celular y el Ca²⁺ está claramente implicado al menos en tres de ellos: necrosis, apoptosis y autofagia. (Zhivotovski y Orrenius, 2011).

La necrosis se trata de un tipo de muerte celular relacionada con una perturbación de la homeostasis del Ca²⁺. En las células pancreáticas acinares se ha estudiado ampliamente la implicación del Ca²⁺ en el desencadenamiento de la necrosis. Así, niveles altos de colecistoquinina, ácidos biliares o ésteres etílicos de ácidos grasos en estas células provocan un elevado estrés en la célula que desencadena el proceso necrótico. Como consecuencia, el elevado estrés provoca una liberación de Ca²⁺ desde los depósitos y un incremento global y sostenido de la [Ca²⁺]_c debido a la posterior entrada de Ca²⁺ en la célula. Esto conlleva al colapso del potencial mitocondrial, lo que produce una pérdida irreversible de la función

mitocondrial que, a su vez, da lugar a una fuerte disminución de la síntesis de ATP en la célula. La caída de los niveles de ATP paraliza las bombas de Ca^{2+} y desencadena la necrosis. Por otra parte, la necrosis también se induce debido a la activación prematura de enzimas digestivas a consecuencia del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Criddel *et al.*, 2007).

Además, es bastante conocida la participación del Ca^{2+} en las diferentes etapas de la apoptosis, la cual ha sido descrita como una forma de suicidio celular. Este tipo de muerte celular se caracteriza morfológicamente por la condensación de la cromatina, la fragmentación del núcleo, la compactación del citoplasma y la formación de los cuerpos apoptóticos (Kerr *et al.*, 1972). La principal diferencia con la necrosis consiste en que este tipo de muerte celular normalmente no lleva asociado un proceso inflamatorio. Existen dos vías de señalización de la apoptosis, la vía extrínseca, activada por la estimulación de los receptores de muerte, y la vía intrínseca, en la que la mitocondria tiene un papel central (Elmore, 2007). La vía intrínseca de la apoptosis puede ser desencadenada a consecuencia de una sobrecarga del Ca^{2+} en la mitocondria. Ésta provoca la apertura del PTP, lo que produce la pérdida del $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ y la liberación de proteínas proapoptóticas como el citocromo c. El citocromo c se une a otras proteínas para formar el apoptosoma que da lugar a la activación de la caspasa iniciadora caspasa-9, la cual activa las caspasas efectoras como la caspasa-3. El Ca^{2+} , también, puede inducir apoptosis a través de la pérdida del $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ y liberación del citocromo c por medio de unas proteasas de cisteína dependientes de este ión denominadas calpainas. Estas proteasas van a provocar la escisión y activación de la proteína proapoptótica BID, así como una reducción de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL (Kondratskyi *et al.*, 2014). El RE tiene un papel importante en la inducción de la apoptosis de manera dependiente de la mitocondria debido al estrecho contacto entre ambos orgánulos a través de las membranas asociadas a la mitocondria (MAMs; del inglés, *mitochondria-associated membranes*). Así, se ha observado que distintos estímulos apoptóticos provocan una liberación de Ca^{2+} desde el RE por medio de los IP_3Rs , lo que conduce a un aumento de la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria y, como consecuencia, se induce apoptosis (Hajnockzky *et al.*, 2006). En relación con esto, algunas proteínas pueden controlar la apoptosis a través de la regulación del contenido de Ca^{2+} del RE y de la liberación a través de los IP_3Rs . De esta forma, las proteínas proapoptóticas Bax y Bak parece que favorecen el mantenimiento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ basal (Scorrano *et al.*, 2003), así como la liberación de Ca^{2+} a través de los IP_3R (Zong *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2007). Sin embargo, las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL reducen la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ (Foyouzi-Youssefi *et al.*, 2000) e inhiben la liberación de Ca^{2+} por medio de la interacción con los IP_3Rs (Chen *et al.*, 2004; White *et al.*, 2005; Rong *et al.*, 2009). Se ha descrito que Bcl-2 puede que disminuya el contenido de Ca^{2+} del RE al provocar un incremento del *leak* de Ca^{2+} de este orgánulo (Pinton *et al.*, 2000). Por otro lado, una alteración de la homeostasis de Ca^{2+} del RE que conduce a un estrés de retículo puede activar a la caspasa 12 y desencadenar apoptosis de una manera independiente de la mitocondria (Nakagawa y Yuan, 2000; Morishima *et al.*, 2002). La ECC parece ser una entrada de Ca^{2+} implicada en la apoptosis. Aunque hay estudios que apoyan que esta entrada

de Ca^{2+} induce apoptosis, otros, sin embargo, muestran que presenta un papel antiapoptótico. Asimismo, la inhibición de la ECC o el silenciamiento de STIM1 reducen la apoptosis inducida por H_2O_2 al evitar una sobrecarga de Ca^{2+} en el citosol en células HT22, una línea celular de neuronas de hipocampo (Rao *et al.*, 2013). En contraposición, el silenciamiento de STIM1 y ORAI1 incrementan la apoptosis inducida por sustancias quimioterapéuticas en líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas (Kondratska *et al.*, 2014).

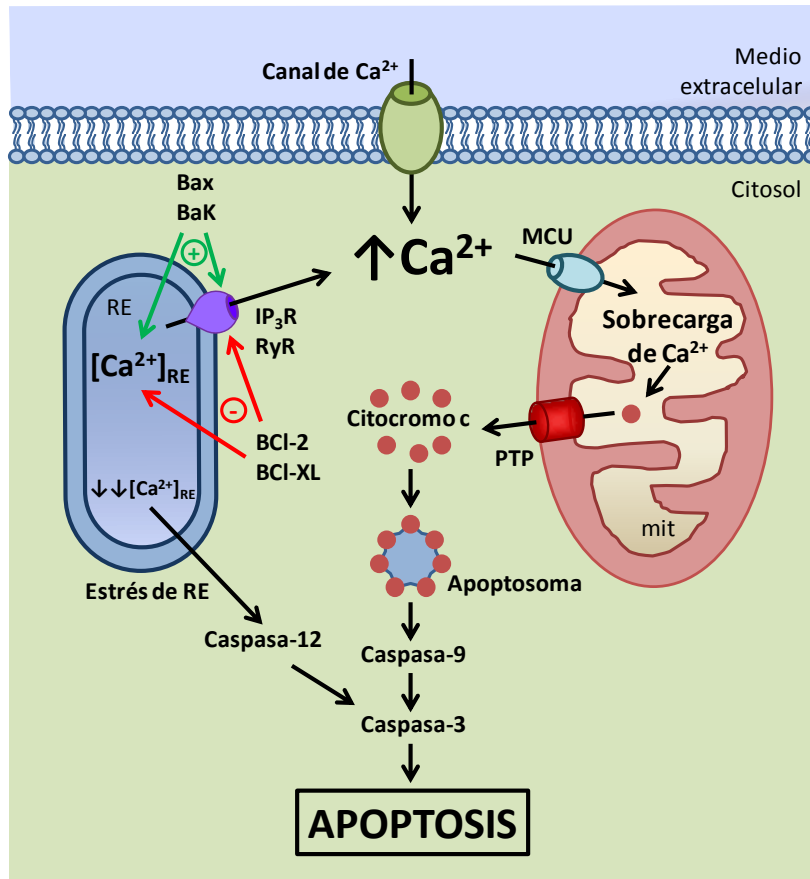


Figura 20. Participación del Ca^{2+} en la apoptosis. Tanto la liberación de Ca^{2+} a través de los IP_3R y RyR como la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular pueden desencadenar la vía intrínseca de la apoptosis cuando se produce una sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria, como consecuencia, de la elevada entrada de Ca^{2+} en este orgánulo mediante el MCU. La sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria provoca la apertura del poro de permeabilidad transitoria (PTP) y la liberación al citosol del citocromo c. El citocromo c se une a una serie de proteínas para formar el apoptosoma que da lugar a la activación de la caspasa-9 que, a su vez, activa la caspasa-3. Esta última se trata de una caspasa efectora que lleva a cabo el proceso apoptótico. Las proteínas proapoptóticas Bax y Bak favorecen el mantenimiento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ y la liberación de Ca^{2+} a través de los IP_3Rs incrementando la susceptibilidad de la célula a la apoptosis. Por el contrario, las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL parece que reducen la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ e inhiben la liberación de Ca^{2+} a través de los IP_3Rs aumentando así, la resistencia a la apoptosis. Además, la excesiva disminución de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ puede provocar estrés de retículo lo que conduce a la activación de la caspasa-12. La activación de esta caspasa desencadena la apoptosis a través de la caspasa-3. RE: retículo endoplásmico. mit: mitocondria.

La disminución de los niveles de energía de la célula da lugar a un proceso de muerte celular conocido como autofagia que se caracteriza por la formación de autofagosomas. Este proceso tiene lugar para producir energía a través de la fagocitosis de orgánulos celulares y proteínas (Levine y Klionsky, 2004). El Ca^{2+} regula la autofagia de manera diferente dependiendo del estado en el que se encuentre la célula. En condiciones óptimas, se produce una liberación constitutiva de Ca^{2+} desde el RE a través de los IP_3Rs hacia la mitocondria, lo que permite una normal producción de ATP en esta última. Cuando se interrumpe el flujo de Ca^{2+} entre el RE y la mitocondria se reduce la síntesis de ATP. Con ello, se incrementa el ratio AMP/ATP, lo que provoca la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK; del inglés, *AMP-activated protein kinase*) y se induce la autofagia. Sin embargo, en condiciones de estrés, cuando se produce un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se pueden activar una variedad de proteínas estimuladoras de la autofagia como la proteína quinasa de la quinasa dependiente de Ca^{2+} -CaM β (CaMKK β ; del inglés, *Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase kinase β*) que activa la AMPK (Decuyper *et al.*, 2011a).

6. Papel del transporte de Ca^{2+} en el cáncer

Las células tumorales presentan seis características adquiridas según Hanahan y Weinberg (Hanahan y Weinberg, 2000) que les confieren grandes ventajas de supervivencia frente a las células normales:

1. Capacidad para evadir la apoptosis.
2. Señalización de crecimiento autosuficiente.
3. Potencial de división sin límite.
4. Insensibilidad a señales que se oponen al crecimiento.
5. Capacidad para invadir y metastatizar.
6. Promoción de la angiogénesis.

En varios trabajos se ha reportado que la señalización del Ca^{2+} podría estar implicada de manera directa o indirecta en muchos, si no en todos estos procesos característicos de las células cancerosas (Monteith *et al.*, 2012). Como consecuencia, numerosos estudios muy recientes, la mayoría de ellos publicados durante el desarrollo de esta tesis doctoral, sugieren que durante la carcinogénesis tiene lugar un remodelado del Ca^{2+} intracelular. Probablemente este remodelado sea consecuencia de los cambios que se producen en el genoma, la influencia de la epigenética, los factores ambientales o las respuestas adaptativas que inicia el cáncer. Sin embargo, las alteraciones que se producen en el transporte de Ca^{2+} son procesos clave en la progresión del mismo, puesto que son necesarios para la proliferación, resistencia a la apoptosis y la expansión del tumor (migración, invasión y angiogénesis) (Chen *et al.*, 2013; Prevarsakaya *et al.*, 2014). El remodelado del transporte de Ca^{2+} en el cáncer puede consistir en un cambio de expresión de los canales y las bombas de Ca^{2+} que de manera normal

aparecen en la célula. Además, puede producirse una alteración en la actividad de los participantes moleculares del transporte de Ca^{2+} a consecuencia de mutaciones génicas y modificaciones postraduccionales (Monteith *et al.*, 2012). Todos estos cambios podrían contribuir a la progresión del cáncer a través de la alteración de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Lee *et al.*, 2011).

6.1. Extrusión de Ca^{2+} y cáncer

Las distintas isoformas de la PMCA, encargada de la extrusión del Ca^{2+} hacia el exterior celular, han sido relacionadas con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer. Así, se han observado varios cambios de expresión de esta bomba de Ca^{2+} en algunos tumores (tabla 1). La primera vez que se tuvo constancia de este hecho fue en 1997 al mostrar una reducción de expresión de la PMCA en fibroblastos de piel y pulmón transformados con el virus SV40 para inducir tumorigénesis con respecto a los fibroblastos control (Reisner *et al.*, 1997). Más tarde, se observó que la PMCA tiene un papel en la regulación de la proliferación de las células de cáncer de mama MCF-7, ya que al inhibir la PMCA tiene lugar una reducción en la proliferación de esta línea celular (Lee *et al.*, 2005b). Además, es posible que la PMCA2 aumente la resistencia a la apoptosis de las células tumorales como demuestra su sobreexpresión en células de cáncer de mama. La pérdida de expresión de PMCA2 aumenta los niveles de Ca^{2+} citosólico y hace más sensibles a la apoptosis a las células epiteliales mamarias. Por el contrario, su sobreexpresión reduce el Ca^{2+} intracelular protegiendo de la apoptosis a las células de cáncer de mama T47D (VanHouten *et al.*, 2010). De nuevo en células de cáncer de mama, la PMCA2 induce resistencia a la apoptosis mediante la interacción con la calcineurina y la inhibición de NFAT, lo que reduce la expresión de proteínas proapoptóticas (Baggot *et al.*, 2012).

El silenciamiento de la PMCA1 provoca un aumento en la necrosis inducida por ionomicina en células de cáncer de mama. En esas mismas células el silenciamiento de PMCA4 incrementa la apoptosis inducida por un inhibidor de la proteína antiapoptótica Bcl-2. Estos resultados sugieren que ambas isoformas de la PMCA regulan la muerte celular de las células tumorales de mama (Curry *et al.*, 2012). Por otro lado, la PMCA puede contribuir a la tumorigénesis a través de una reducción en su expresión como sugiere la disminución de la expresión de PMCA1 en cáncer oral (Saito *et al.*, 2006) y de PMCA4 en cáncer de colon (Aung *et al.*, 2009). De esta forma, la sobreexpresión de PMCA4 reduce la proliferación en células de adenocarcinoma de colon HT29, mientras que su silenciamiento no afecta a la regulación de la apoptosis. Por tanto, la reducción de la expresión de PMCA4 en las células tumorales de colon disminuye la extrusión de Ca^{2+} , lo que puede contribuir a la proliferación de estas células sin hacerlas más sensibles a la apoptosis (Aung *et al.*, 2009). Además, la diferenciación de las células tumorales MCF-7 provoca un incremento en la expresión de la PMCA4b, lo que acelera el regreso de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ a su estado basal tras la estimulación de esas células. Esto es

consistente con el hecho de que una reducción en la expresión de PMCA4 puede conducir a la aparición de un fenotipo tumorigénico (Varga *et al.*, 2014). También, la PMCA4 puede estar implicada en la angiogénesis del tumor, ya que reduce ésta a través de la interacción con la calcineurina inhibiendo la vía de NFAT (Baggott *et al.*, 2014).

Isoforma	Tipo de cáncer	Modelo de estudio	Cambio	Referencia
PMCA1	Mama	Líneas celulares	↑ mRNA	Lee <i>et al.</i> , 2002
	Oral	Líneas celulares y muestras de tejido de pacientes	↓ mRNA y proteína	Saito <i>et al.</i> , 2006
PMCA2	Mama	Líneas celulares	↑ mRNA	Lee <i>et al.</i> , 2005a
		Líneas celulares y muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA y proteína	VanHouten <i>et al.</i> , 2010
PMCA4	Colon	Diferenciación de línea celular y muestras de tejido de pacientes	↓ mRNA	Aung <i>et al.</i> , 2009
		Diferenciación de línea celular	↓ mRNA y proteína	Ribiczey <i>et al.</i> , 2007
	Gástrico	Diferenciación de línea celular	↓ mRNA y proteína	Ribiczey <i>et al.</i> , 2007
	Mama	Diferenciación de línea celular	↓ proteína	Varga <i>et al.</i> , 2014

Tabla 1. Cambios de expresión de las distintas isoformas de PMCA en cáncer respecto a células o tejido normal. ↑, aumento y ↓, disminución de expresión.

6.2. Secuestro de Ca^{2+} hacia los depósitos y cáncer

El contenido de Ca^{2+} de los depósitos puede ser modificado a consecuencia de los cambios de expresión de la bomba que introduce Ca^{2+} en el RE, la SERCA. La disminución de la expresión de la SERCA podría reducir el contenido de Ca^{2+} de los depósitos aumentando la resistencia a la apoptosis de las células tumorales (Prevarskaya *et al.*, 2014). Así, por ejemplo, la expresión de SERCA2 está disminuida en células de carcinoma escamoso oral como consecuencia de una metilación aberrante (Endo *et al.*, 2004). También, la expresión de la SERCA3 se reduce durante la tumorigénesis en cáncer de mama (Papp y Brouland, 2011). Estos y otros cambios de expresión que tienen lugar en el cáncer se recogen en la tabla 2. La importancia de la expresión de la SERCA en la resistencia a la apoptosis queda patente al sobreexpresar la proteína antiapoptótica Bcl-2 en células LNCaP, puesto que se reduce la expresión de la SERCA2b (Vanden Abeele *et al.*, 2002). Por otra parte, la proteína oncogénica KRAS regula la expresión precisamente de esa isoforma de la SERCA, ya que la supresión de KRAS aumenta la expresión de SERCA2b (Pierro *et al.*, 2014). Además, la proteína supresora tumoral p53 regula la apoptosis precisamente a través de su unión a la SERCA modificando su estado de oxidación aumentando así, la carga de Ca^{2+} en el RE (Giorgi *et al.*, 2015).

I. INTRODUCCIÓN

Isoforma	Tipo de cáncer	Modelo de estudio	Cambio	Referencia
SERCA2	Colorrectal	Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA	Chung <i>et al.</i> , 2006
		Diferenciación de línea celular y muestras de tejido de pacientes	↑ proteína	Fan <i>et al.</i> , 2014a
	Colon	Muestras de tejido de pacientes	↓ mRNA	Korosec <i>et al.</i> , 2006
	Oral	Líneas celulares y muestras de tejido de pacientes	↓ mRNA y proteína	Endo <i>et al.</i> , 2004
	Tiroides	Líneas celulares	↓ mRNA y proteína	Pacifico <i>et al.</i> , 2003
	Pulmón	Muestras de tejido de pacientes	↓ mRNA	Korosec <i>et al.</i> , 2006
SERCA3	Mama	Muestras de tejido de pacientes	↓ proteína	Papp <i>et al.</i> , 2011
	Pulmón	Diferenciación de línea celular	↓ proteína	Arbabian <i>et al.</i> , 2013
	Colon	Diferenciación de línea celular y muestras de tejido de pacientes	↓ proteína	Gélébart <i>et al.</i> , 2002
	Colorrectal	Líneas celulares y muestras de tejido de pacientes	↓ mRNA y proteína	Gou <i>et al.</i> , 2014

Tabla 2. Cambios de expresión de las distintas isoformas de SERCA en cáncer respecto a células o tejido normal. ↑, aumento y ↓, disminución de expresión.

También, se ha observado un incremento de la expresión de la SERCA, por lo que en ese caso puede tener un papel importante en la tumorigénesis distinto al relacionado con la resistencia a la apoptosis. La expresión de la SERCA2 es superior en células de cáncer de colon HT29 desdiferenciadas que en las diferenciadas. Asimismo, la sobreexpresión de la SERCA2 en células SW480, otra línea celular tumoral de colon, aumenta la proliferación y migración de las mismas, sin embargo, su silenciamiento reduce ambos procesos (Fan *et al.*, 2014a). Por tanto, el incremento de la SERCA en los tumores puede contribuir a su progresión aumentando la capacidad proliferativa y migratoria de sus células. Por otro lado, es importante tener en cuenta la variación de la expresión de unas isoformas de la SERCA con respecto a otras. La diferenciación de las células de adenocarcinoma de pulmón reduce el contenido de Ca^{2+} de los depósitos debido a un cambio en la expresión de la SERCA3. Esta alteración se explica debido a que la expresión de la SERCA3 en las células diferenciadas aumenta con respecto a las desdiferenciadas, teniendo en cuenta que la afinidad por el Ca^{2+} de esta isoforma es menor que la de la SERCA2, la cual no varía. Así, el aumento de la isoforma con una menor afinidad por el Ca^{2+} , la SERCA3, con respecto a la isoforma con una afinidad mayor, la SERCA2, se traduce en una disminución del contenido de los depósitos en las células diferenciadas (Arbabian *et al.*, 2013). En cambio, la transición epitelio-mesenquimal de las células de cáncer de mama, un proceso por el cual las células adquieren un fenotipo más invasivo, provoca un incremento de la expresión de la SERCA2 y un descenso de la SERCA3 (Davis *et al.*, 2013).

Otra bomba de Ca^{2+} implicada en el remodelado del transporte de Ca^{2+} en el cáncer es la SPCA, presente en el aparato de Golgi. La SPCA1 tiene un papel importante en la proliferación de las células de cáncer de mama, puesto que su silenciamiento en las mismas disminuye su proliferación. La inhibición de la proliferación puede ser debida a una alteración en los niveles de Ca^{2+} del lumen del aparato de Golgi, donde el Ca^{2+} está implicado en la regulación de las enzimas que contiene y que pueden participar en el procesamiento de proteínas importantes en la progresión tumoral (Grice *et al.*, 2010). También, se ha visto implicada en el remodelado del transporte de Ca^{2+} a la SPCA2, aunque parece participar en la tumorigénesis de manera diferente a la SPCA1. El silenciamiento de la SPCA2 en células MCF-7 reduce su proliferación y el crecimiento *in vitro* e *in vivo*. En contraposición a su papel de introducir Ca^{2+} en el interior del aparato de Golgi, el incremento de la expresión de SPCA2 en este caso contribuye a la entrada de Ca^{2+} de manera independiente de depósitos a través de su interacción con ORAI1 (Feng *et al.*, 2010). Los estudios que tratan el remodelado de la expresión de las isoformas de la SPCA aparecen reflejados en la tabla 3.

Isoforma	Tipo de cáncer	Modelo de estudio	Cambio	Referencia
SPCA1	Mama	Líneas celulares y muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA	Grice <i>et al.</i> , 2010
SPCA2	Mama	Líneas celulares y muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA y proteína	Feng <i>et al.</i> , 2010

Tabla 3. Cambios de expresión de las distintas isoformas de SPCA en cáncer respecto a células o tejido normal. ↑, aumento y ↓, disminución de expresión.

6.3. Liberación de Ca^{2+} desde los depósitos y cáncer

La disminución de la liberación de Ca^{2+} mediante la reducción de la expresión o de la actividad del IP_3R provoca un aumento de la resistencia a la apoptosis de las células tumorales. Así, el silenciamiento de $\text{IP}_3\text{R1}$ en células de cáncer de vejiga aumenta la resistencia a la apoptosis de estas células (Tsunoda *et al.*, 2005). En cáncer colorrectal puede darse un remodelado de las isoformas de los IP_3R mediado por la proteína oncogénica KRAS. Así, la delección de esta proteína provoca un incremento de la liberación de Ca^{2+} como consecuencia de un aumento de la expresión de $\text{IP}_3\text{R3}$ y una disminución de $\text{IP}_3\text{R1}$. Por tanto, en las células tumorales, KRAS podría reducir la expresión de $\text{IP}_3\text{R3}$ y aumentar la de $\text{IP}_3\text{R1}$ dando lugar a una disminución de la liberación de Ca^{2+} , lo que podría incrementar la resistencia a la apoptosis de las células de cáncer colorrectal (Pierro *et al.*, 2014).

Por otro lado, la proteína antiapoptótica Bcl-2, sobreexpresada en algunos cánceres y considerada oncogénica, ejerce su acción a través de la interacción con el IP_3R inhibiendo su apertura, lo que reduce la liberación de Ca^{2+} desde el RE (Rong *et al.*, 2009). Este proceso tiene

I. INTRODUCCIÓN

lugar, por ejemplo, en la leucemia linfocítica crónica (Zhong *et al.*, 2011). Además, la sobreexpresión de Bcl-2 aumenta el *leak* de Ca^{2+} del RE, lo que disminuye su contenido en este ión incrementando, de esta forma, la resistencia a la apoptosis de las células tumorales (Pinton *et al.*, 2000; Palmer *et al.*, 2004).

El supresor tumoral BRCA1, también, se une al IP_3R aumentando la sensibilidad a su ligando y favoreciendo así la liberación de Ca^{2+} que puede dar lugar a la apoptosis. Esto sugiere que la disminución de BRCA1 en los tumores reduce la liberación de Ca^{2+} , lo que aumenta la resistencia a la apoptosis (Hedgepeth *et al.*, 2015). En cambio, $\text{IP}_3\text{R3}$ parece expresarse solo en muestras de cáncer colorrectal al compararlas con muestras de mucosa normal y se ha observado una correlación entre su expresión y la agresividad del tumor. Asimismo, el silenciamiento de esta isoforma del IP_3R en células de cáncer de colon caco-2 aumenta la apoptosis, sugiriendo que su expresión en los tumores confiere resistencia a la apoptosis (Shibao *et al.*, 2010). De otra forma, el incremento de la expresión del IP_3R en las células tumorales puede tener un efecto sobre el aumento de su proliferación. De esta manera, el incremento de la expresión de $\text{IP}_3\text{R3}$ de las células MCF-7 tratadas con estradiol podría explicar el aumento de la proliferación de las mismas (Szatkowski *et al.*, 2010). El incremento de la expresión de $\text{IP}_3\text{R3}$ puede estar implicado, también, en el aumento de la invasión de las células tumorales como se ha demostrado en glioblastoma, ya que ésta disminuye al inhibir este receptor con cafeína (Kang *et al.*, 2010). También, la expresión de $\text{IP}_3\text{R3}$ conjuntamente con la de $\text{IP}_3\text{R1}$ aumenta durante la transición epitelio-mesenquimal de las células de cáncer de mama, por la cual las células adquieren un fenotipo más invasivo (Davis *et al.*, 2013). Además, los IP_3Rs pueden estar implicados en la angiogénesis, puesto que la expresión de todas sus isoformas disminuye en las células progenitoras endoteliales procedentes de pacientes con carcinoma renal con respecto a las procedentes de pacientes control (Lodola *et al.*, 2012; Moccia y Poletto, 2014).

La tabla 4 muestra el remodelado de las distintas isoformas del IP_3R encontrado en el cáncer.

Isoforma	Tipo de cáncer	Modelo de estudio	Cambio	Referencia
$\text{IP}_3\text{R1}$	Glioblastoma	Muestras de tejido de pacientes	↓ mRNA	Kang <i>et al.</i> , 2010
	Glioblastoma	Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA	Kang <i>et al.</i> , 2010
$\text{IP}_3\text{R3}$	Colorrectal	Líneas celulares y muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA y proteína	Sakakura <i>et al.</i> , 2003
		Muestras de tejido de pacientes	↑ proteína	Shibao <i>et al.</i> , 2010

Tabla 4. Cambios de expresión de las distintas isoformas del IP_3R en cáncer respecto a células o tejido normal. ↑, aumento y ↓, disminución de expresión.

La implicación de los RyRs en el cáncer ha sido menos estudiada que los IP₃Rs, ya que se expresan principalmente en células excitables, sin embargo, hay algunos trabajos que los relacionan con la progresión tumoral. Así, se ha observado que las células de cáncer de próstata LNCaP expresan dos isoformas de RyRs, RyR1 y RyR2, capaces de movilizar Ca²⁺ desde los depósitos y de controlar la apoptosis sugiriendo un posible papel en estas células tumorales (Mariot *et al.*, 2000). Además, en cáncer de mama la expresión de los RyRs se ha correlacionado con la agresividad del tumor (Abdul *et al.*, 2008). Asimismo, la isoforma RyR2 aumenta su expresión de manera considerable mediante la transición epitelio-mesenquimal de las células de cáncer de mama (Davis *et al.*, 2013).

6.4. Transporte de Ca²⁺ en la mitocondria y cáncer

Aunque la identificación del MCU es bastante reciente, ya se ha reportado que este canal de Ca²⁺ situado en la mitocondria puede participar en la carcinogénesis. En el cáncer de colon parece sobreexpresarse un microRNA que se dirige específicamente al MCU, el miR-25. Este hecho provoca una reducción de la expresión del MCU disminuyendo la entrada de Ca²⁺ en la mitocondria y, como consecuencia, se incrementa la resistencia a la apoptosis (Marchi *et al.*, 2013). Por el contrario, el silenciamiento del MCU potencia la muerte independiente de caspasas en células de cáncer de mama. De manera consistente, el MCU se encuentra sobreexpresado en los cánceres de mama con peor pronóstico, lo que ofrece un incremento de la supervivencia de sus células, puesto que les confiere cierta resistencia a la muerte (Curry *et al.*, 2013). Además, a consecuencia del papel de la regulación de la ECC por parte de la mitocondria se ha descrito que el MCU contribuye a la migración dependiente de esta entrada de Ca²⁺ en células de cáncer de mama. Así, la expresión de MCU se correlaciona con el grado de invasión y de metástasis del cáncer de mama (Tang *et al.*, 2015). También, la proteína reguladora del uniportador MICU1 puede tener un papel importante previniendo la apoptosis en las células tumorales de ovario (Arvizo *et al.*, 2013).

En cuanto el transporte de Ca²⁺ hacia el exterior de la matriz mitocondrial, la proteína intercambiadora LETM1 se encuentra sobreexpresada en cáncer de mama, esófago, estómago, colon, recto, ovario, útero, hígado y pulmón con respecto al tejido normal según un estudio realizado mediante inmunohistoquímica (Piao *et al.*, 2009). Además, parece ser importante en la progresión del cáncer de escamoso de cara y cuello, ya que el incremento de su expresión está relacionada con un peor pronóstico del mismo (Chen *et al.*, 2014b). También, la sobreexpresión de LETM1 ha sido asociada con la progresión del cáncer de mama triple negativo, así como con un peor pronóstico de la enfermedad (Wang *et al.*, 2015a).

6.5. Entrada de Ca²⁺ en la célula y cáncer

6.5.1. Canales de Ca²⁺ operados por voltaje

La expresión de algunos de los canales operados por voltaje se ha visto alterada en diferentes cánceres (tabla 5). Por ejemplo, en cáncer de colon la expresión del canal tipo L Ca_v1.2 parece estar aumentada (Wang *et al.*, 2000), mientras que en los cánceres gástrico y colorrectal disminuye la expresión del canal tipo T Ca_v3.1 (Toyota *et al.*, 1999). Este último podría funcionar como un supresor tumoral en determinados cánceres. La sobreexpresión de Ca_v3.1 en células de cáncer de mama MCF-7 disminuye la proliferación de las mismas, mientras que su inhibición o silenciamiento la incrementa. Además, la sobreexpresión de este canal provoca un aumento de la apoptosis. Estos resultados sugieren que su expresión reduce la proliferación y promueve la apoptosis de las células tumorales de mama. (Ohkubo y Yamakazi, 2012). Otro canal tipo T que puede ser importante en la progresión del cáncer es el Ca_v3.2, ya que está implicado en la proliferación de células de cáncer próstata formando un acoplamiento funcional con canales de K⁺ de larga conductancia (Gackière *et al.*, 2013). Este resultado es consistente con el aumento de expresión del Ca_v3.2 reportado, precisamente, en cáncer de próstata (Gackière *et al.*, 2008). Sin embargo, este canal parece no participar en la proliferación de las células de cáncer de mama (Ohkubo y Yamakazi, 2012).

Isoforma	Tipo de cáncer	Modelo de estudio	Cambio	Referencia
Ca _v 1.1	Colorrectal	Líneas celulares y muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA	Zhang <i>et al.</i> , 1997
Ca _v 1.2	Colon	Líneas celulares y muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA	Wang <i>et al.</i> , 2000
Ca _v 3.1	Colorrectal	Líneas celulares y muestras de tejido de pacientes	↓ mRNA	Toyota <i>et al.</i> , 1999
	Gástrico	Líneas celulares y muestras de tejido de pacientes	↓ mRNA	Toyota <i>et al.</i> , 1999
Ca _v 3.2	Próstata	Muestras de tejido de pacientes	↑ proteína	Gackière <i>et al.</i> , 2008

Tabla 5. Cambios de expresión de los VOCs en cáncer respecto a células o tejido normal. ↑, aumento y ↓, disminución de expresión.

6.5.2. Canales TRPs

Los canales iónicos de la superfamilia TRP han sido ampliamente relacionados con procesos clave en las células tumorales como son la proliferación, la resistencia a la apoptosis, la migración e invasión y la angiogénesis (Chen *et al.*, 2014a). Además, se ha reportado la existencia de un remodelado de los TRPs en diversos tipos de cáncer (tablas 6 y 7).

Isoforma	Tipo de cáncer	Modelo de estudio	Cambio	Referencia
TRPC1	Mama	Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA y proteína	Dhennin-Duthille <i>et al.</i> , 2011
TRPC3	Ovario	Muestras de tejido de pacientes	↑ proteína	Yang <i>et al.</i> , 2009b
	Mama	Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA	Aydar <i>et al.</i> , 2009
TRPC4	Renal	Líneas celulares	↓ mRNA	Veliceasa <i>et al.</i> , 2007
	Esófago	Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA y proteína	Shi <i>et al.</i> , 2009 Zhang <i>et al.</i> , 2013
	Gástrico	Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA y proteína	Cai <i>et al.</i> , 2009
	Glioma	Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA y proteína	Ding <i>et al.</i> , 2010
	Hígado	Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA y proteína	El Boustany <i>et al.</i> , 2008
	Mama	Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA y proteína	Aydar <i>et al.</i> , 2009 Dhennin-Duthille <i>et al.</i> , 2011
	Líneas celulares y muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA y proteína	Guilbert <i>et al.</i> , 2008	
TRPC6	Próstata	Líneas celulares	↑ mRNA	Wang <i>et al.</i> , 2014a

Tabla 6. Cambios de expresión de las distintas isoformas de TRPC en cáncer respecto a células o tejido normal. ↑, aumento y ↓, disminución de expresión.

TRPC1 está implicado en la proliferación de algunos tipos de cáncer. Así, el silenciamiento de TRPC1 reduce la ECC y la proliferación en células de glioma dando lugar a una división celular incompleta, así como disminuye el tamaño de los gliomas (Bomben y Shontheimer, 2010). En células de carcinoma pulmonar microcítico la reducción de la expresión de TRPC1 provoca un arresto del ciclo celular en la fase G_0/G_1 , lo que se traduce en una disminución de la proliferación dependiente del factor de crecimiento epitelial (EGF; del inglés, *epithelial growth factor*) (Tajeddine y Gailly, 2012). Su silenciamiento en células de cáncer de ovario, también, reduce su proliferación (Zeng *et al.*, 2013). Además, TRPC1 parece estar implicado en la migración e invasión de las células tumorales. La entrada de Ca^{2+} mediada por este TRPC e inducida por TGF β (del inglés, *transforming growth factor β*) es importante en la invasión de células de cáncer de páncreas (Dong *et al.*, 2010). TRPC1 en asociación con balsas lipídicas en la membrana plasmática es esencial para la migración quimiotáctica de los gliomas tras la estimulación con EGF (Bomben *et al.*, 2011). También, en células de glioma, está implicado en la migración celular a través de la activación de corrientes de Cl^- (Cuddapah *et al.*, 2013). Por otra parte, el silenciamiento de TRPC1 disminuye la invasión de células tumorales de nasofaringe posiblemente a través de la reducción de la ECC (He *et al.*, 2012). Asimismo, TRPC1 está implicado en angiogénesis, puesto que parece sufrir un remodelado en células progenitoras endoteliales derivadas de pacientes con carcinoma renal, ya que su expresión está aumentada en éstas. Se ha observado que lleva a cabo su papel en la angiogénesis a través de la ECC, puesto que su supresión bloquea esta entrada de Ca^{2+} , la cual

participa en la proliferación de esas células progenitoras, así como en el proceso de tubulogénesis (Lodola *et al.*, 2012; Moccia y Poletto *et al.*, 2014).

TRPC3 se encuentra relacionado con la progresión del cáncer de pulmón, ya que su expresión puede ser un indicador de pronóstico favorable en pacientes con adenocarcinoma de pulmón (Saito *et al.*, 2011). Sin embargo, su expresión se correlaciona con un peor pronóstico en cáncer de ovario (Tao *et al.*, 2013). Además, contribuye a la progresión de este último, ya que la reducción de la expresión de TRPC3 en células de cáncer de ovario disminuye su proliferación, así como la formación de tumores tras su inyección en ratón (Yang *et al.*, 2009b; Zeng *et al.*, 2013).

TRPC4 está implicado en la proliferación de las células de cáncer de ovario, puesto que su silenciamiento o bloqueo reduce la proliferación, mientras que su sobreexpresión aumenta la formación de colonias (Zeng *et al.*, 2013). Asimismo, la expresión de TRPC4 está disminuida en células de carcinoma renal pudiendo así aumentar la angiogénesis en el tumor al verse reducida la secreción de un inhibidor de este proceso (Veliceasa *et al.*, 2007).

TRPC5 participa en la resistencia a diferentes agentes quimioterapéuticos que presentan algunas células tumorales. Así, este canal parece sobreexpresarse en células de cáncer de mama resistentes a quimioterapia induciendo la producción de glicoproteína P, una bomba implicada en eliminar drogas citotóxicas en las células tumorales (Ma *et al.*, 2012). También, aumenta su expresión en células de cáncer de colon resistentes en las que induce una mayor expresión de otra bomba que exporta sustancias tóxicas para la célula, la ABCB1 (*del inglés, ATP-binding cassette, subfamily B, member 1*) (Wang *et al.*, 2015b).

TRPC6 tiene un papel importante en la proliferación celular de distintos tipos de cáncer. De esta forma, en células de cáncer de próstata se ha observado que promueve la proliferación a través de NFAT (Thebault *et al.*, 2006). En células de cáncer hepático contribuye a la proliferación posiblemente controlando la ECC (El Boustany *et al.*, 2008). Además, se encuentra sobreexpresado en cáncer de mama y su silenciamiento reduce la proliferación de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 (Aydar *et al.*, 2009). Su expresión, también, está aumentada en cáncer esofágico y glioma. Por otra parte, su silenciamiento en líneas celulares de estos cánceres provoca una disminución en su proliferación, a consecuencia, en este caso, del arresto del ciclo celular en la transición G2/M (Shi *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2010). La disminución de la proliferación a causa del arresto en G2/M tiene lugar, además, en células de cáncer de riñón (Song *et al.*, 2013) y de cáncer gástrico (Cai *et al.*, 2009). Por otro lado, TRPC6, también, participa en el proceso de invasión y angiogénesis del tumor. Así, el aumento de expresión de TRPC6 en células de cáncer de próstata está implicado en la invasión y metástasis de estas células (Wang *et al.*, 2014a). Además, está implicado en la invasión de células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (Bernaldo de Quirós *et al.*, 2013). Asimismo, TRPC6 es requerido para la progresión del glioblastoma, ya que su silenciamiento inhibe el crecimiento, la invasión, así como la angiogénesis del glioma (Chigurupati *et al.*, 2010). Por último, es

importante en la angiogénesis mediada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF; del inglés, *vascular endothelial growth factor*), ya que su inhibición reduce la proliferación de las células endoteliales arrojando el ciclo celular en G2/M (Ge *et al.*, 2009).

TRPV4 participa en la migración de células endoteliales derivadas de cáncer de mama. Estas células muestran mayor entrada de Ca^{2+} inducida por un forbol agonista de TRPV4, además de presentar una mayor expresión de este canal. Por tanto, parece tener un papel clave en la angiogénesis de tumores de mama (Fiorio Pla *et al.*, 2012). En cambio podría funcionar como un supresor tumoral, ya que la disminución de su expresión puede ser importante en la progresión del cáncer de piel no melanoma (Fusi *et al.*, 2014) y de vejiga (Mizuno *et al.*, 2014).

TRPV6 controla la proliferación en células de cáncer de próstata a través de la vía de NFAT y la entrada de Ca^{2+} a través del mismo está implicada en la resistencia a la apoptosis de esas células como muestra su silenciamiento (Lehen'kyi *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2010). Este resultado es apoyado por un estudio en el que, expresando TRPV6 en otra línea celular de cáncer de próstata, se incrementa la proliferación y la resistencia a la apoptosis de la misma. En este caso, un mecanismo mediado por ORAI1 permite la translocación de TRPV6 a la membrana (Raphaël *et al.*, 2014). En cáncer de mama el silenciamiento de TRPV6, también, provoca una disminución en la proliferación. La expresión de TRPV6 parece ser superior en líneas celulares de cáncer de mama malignas. Además, una mayor expresión del mismo está asociada con un peor pronóstico de supervivencia de los pacientes (Peters *et al.*, 2012). En relación con la resistencia a la muerte, la expresión de TRPV6 en células de cáncer de mama podría aumentar su viabilidad celular, ya que ésta se ve reducida por el silenciamiento del canal (Bolanz *et al.*, 2008). Además, TRPV6 contribuye a la invasión en cáncer de mama como muestra su sobreexpresión en tejido invasivo y la reducción de este proceso como consecuencia de su silenciamiento (Dhennin-Duthille *et al.*, 2011).

TRPM8 fue de los primeros TRPs en relacionarse con el remodelado de los canales que tiene lugar en el cáncer, de hecho, fue identificado al verse sobreexpresado en cáncer de próstata, así como en cáncer de mama, colon, pulmón y piel (Tsavaler *et al.*, 2001). Recientemente, se ha observado que ese incremento de la expresión de TRPM8 en cáncer de próstata podría explicarse por una reducción de la presencia de ciertos microRNAs (Erdmann *et al.*, 2014). Además, la expresión de este canal parece estar regulada por hormonas tanto en cáncer de próstata como en cáncer de mama dependientes de éstas. Así, en el cáncer de próstata su expresión se incrementa con andrógenos (Bidaux *et al.*, 2005), mientras que en el cáncer de mama, aumenta por la presencia de estrógenos (Chodon *et al.*, 2010). Por otro lado, los niveles de expresión de TRPM8 en el cáncer de próstata disminuyen cuando el tumor pasa a ser independiente de andrógenos y se incrementa su agresividad (Henshall *et al.*, 2003; Prevarskaya *et al.*, 2007). Primero, se reportó que TRPM8 era requerido para la supervivencia de las células de cáncer de próstata (Zhang y Barritt, 2004). Asimismo, la presencia de TRPM8

I. INTRODUCCIÓN

en el RE de las células de cáncer de próstata podría incrementar la resistencia a la apoptosis reduciendo el contenido en Ca^{2+} (Bidaux *et al.*, 2007; Monteith *et al.*, 2012). Otra evidencia de la implicación de TRPM8 en procesos de muerte celular en el cáncer es la inducción de muerte en células de cáncer de vejiga mediada por el tratamiento con mentol, el agonista más clásico de este canal, a través de la despolarización de la membrana plasmática (Li *et al.*, 2009). El bloqueo o silenciamiento de TRPM8 en cualquier tipo de células de cáncer de próstata disminuye su proliferación, lo que sugiere que este canal es necesario para la misma (Valero *et al.*, 2012). Por el contrario, otro grupo observó que la sobreexpresión de TRPM8 en células de cáncer de próstata independiente de andrógenos parece reducir la proliferación mediante el arresto del ciclo celular en fase G_0/G_1 , lo que indica que en este tipo de cáncer la disminución de su expresión favorece la proliferación celular (Yang *et al.*, 2009c; Zhu *et al.*, 2011). También, la activación con mentol de TRPM8 en células de ese tipo de cáncer independiente de andrógenos reduce la proliferación de las mismas (Wang *et al.*, 2012b). La expresión de TRPM8 es requerida para la proliferación en células de cáncer de páncreas como muestra su silenciamiento en las mismas (Yee *et al.*, 2010). Por otra parte, TRPM8 parece reducir la progresión del cáncer a través de su papel en la migración de algunos cánceres. La activación de TRPM8 disminuye la motilidad de las células de cáncer de próstata como consecuencia de su estimulación por el antígeno específico de próstata (PSA; del inglés, *prostate specific antigen*) (Gkika *et al.*, 2010). La sobreexpresión de TRPM8 reduce la migración en células de cáncer de próstata independiente de andrógenos (Yang *et al.*, 2009c). Este resultado es consistente con el encontrado en células de adenocarcinoma pancreático ductal donde TRPM8 parece inhibir la migración, puesto que su silenciamiento aumenta la misma, mientras que su activación la reduce (Cucu *et al.*, 2014). En contraposición, otro laboratorio muestra que TRPM8 contribuye a la invasión del cáncer de páncreas (Yee *et al.*, 2014). También, TRPM8 contribuye a la migración e invasión de las células de cáncer escamoso oral, ya que ambas se inducen mediante su activación, mientras que disminuyen tras el bloqueo de este canal (Okamoto *et al.*, 2012). TRPM8 puede promover la metástasis en el cáncer de mama regulando la transición endotelial-mesenquimal (Liu *et al.*, 2014). TRPM8 participa, también, en la angiogénesis del tumor, puesto que su sobreexpresión causa la reducción de este proceso en cáncer de próstata independiente de andrógenos. Este resultado sugiere que la reducción de la expresión que tiene lugar en el mismo favorece la angiogénesis clave en la progresión del cáncer (Zhu *et al.*, 2011).

Isoforma	Tipo de cáncer	Modelo de estudio	Cambio	Referencia
TRPV4	Piel	Muestras de tejido de pacientes	↓ mRNA y proteína	Fusi <i>et al.</i> , 2014
	Vejiga	Muestras de tejido y línea celular de ratón	↓ mRNA y proteína	Mizuno <i>et al.</i> , 2014

La tabla continúa en la página siguiente.

Isoforma	Tipo de cáncer	Modelo de estudio	Cambio	Referencia	
TRPV6	Mama	Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA y proteína	Zhuang <i>et al.</i> , 2002 Bolanz <i>et al.</i> , 2008 Dhennin-Duthille <i>et al.</i> , 2011	
	Próstata	Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA	Peng <i>et al.</i> , 2001 Wissembach <i>et al.</i> , 2001	
		Muestras de tejido de pacientes	↑ proteína	Zhuang <i>et al.</i> , 2002	
	Tiroides	Muestras de tejido de pacientes	↑ proteína	Zhuang <i>et al.</i> , 2002	
	Colon	Muestras de tejido de pacientes	↑ proteína	Zhuang <i>et al.</i> , 2002	
	Ovario	Muestras de tejido de pacientes	↑ proteína	Zhuang <i>et al.</i> , 2002	
	Pulmón	Muestras de tejido de pacientes	↓ mRNA y proteína	Fan <i>et al.</i> , 2014b	
TRPM8	Páncreas	Líneas celulares y muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA y proteína	Yee <i>et al.</i> , 2010	
	Próstata	Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA y proteína	Tsavalier <i>et al.</i> , 2001 Fuessel <i>et al.</i> , 2003 Smhmidt <i>et al.</i> , 2006 Prevarskaya <i>et al.</i> , 2007	
		Próstata independiente de andrógenos	Muestras de tejido de pacientes	↓ mRNA	Prevarskaya <i>et al.</i> , 2007
		Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA y proteína	Tsavalier <i>et al.</i> , 2001 Dhennin-Duthille <i>et al.</i> , 2011	
	Mama	Líneas celulares y muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA y proteína	Chodon <i>et al.</i> , 2010	
		Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA y proteína	Tsavalier <i>et al.</i> , 2001	
		Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA	Tsavalier <i>et al.</i> , 2001	
	Colorrectal	Líneas celulares y muestras de tejido de pacientes	↑ proteína	Liu <i>et al.</i> , 2014	
		Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA	Tsavalier <i>et al.</i> , 2001	
		Pulmón	Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA	Tsavalier <i>et al.</i> , 2001

Tabla 7. Cambios de expresión de TRPV4, TRPV6 y TRPM8 en cáncer respecto a células o tejido normal. ↑, aumento y ↓, disminución de expresión.

6.5.3. Entrada capacitativa de Ca²⁺ mediada por STIM/ORAI

El primer estudio en el que se mostró un remodelado de la ECC en el cáncer data del 2003, antes de la identificación de ORAI y STIM como sus principales participantes moleculares. En el mismo, se observan diferencias en la ECC entre una línea celular tumoral y otra no tumoral de células de mama. Así, las células tumorales de mama presentaban una cinética de decaimiento de la ECC más retardada que las células normales (Baldi *et al.*, 2003). Más tarde, se mostraron otros casos en los que se produce un remodelado de la ECC asociado a un cambio en la expresión de sus componentes moleculares y que tiene como consecuencia una alteración en los procesos implicados en la carcinogénesis. El remodelado de las distintas isoformas de ORAI y de STIM en diferentes tipos de cáncer se recoge en la tabla 8.

Isoforma	Tipo de cáncer	Modelo de estudio	Cambio	Referencia
ORAI1	Mama	Líneas celulares	↑ mRNA	McAndrew <i>et al.</i> , 2011
	Glioblastoma	Líneas celulares y muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA	Motiani <i>et al.</i> , 2013a
	Glioma	Muestras de tejido de pacientes	↑ proteína	Zhu <i>et al.</i> , 2014b
	Melanoma	Líneas celulares	↑ proteína	Umemura <i>et al.</i> , 2014
	Renal	Muestras de tejido de pacientes	↑ proteína	Kim <i>et al.</i> , 2014
ORAI3	Mama	Líneas celulares y muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA	Faouzi <i>et al.</i> , 2011
	Próstata	Muestras de tejido de pacientes	↓ mRNA	Holzmann <i>et al.</i> , 2013
		Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA	Dubois <i>et al.</i> , 2014
STIM1	Glioblastoma	Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA	Scrideli <i>et al.</i> , 2008
	Cervix	Muestras de tejido de pacientes	↑ proteína	Chen <i>et al.</i> , 2011
	Mama	Líneas celulares	↑ mRNA	McAndrew <i>et al.</i> , 2011
	Pulmón	Muestras de tejido de pacientes	↑ proteína	Li <i>et al.</i> , 2013b
	Hepático	Líneas celulares y muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA	Yang <i>et al.</i> , 2013
	Melanoma	Líneas celulares	↑ proteína	Umemura <i>et al.</i> , 2014
	Colon	Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA y proteína	Wang <i>et al.</i> , 2014b
STIM2	Glioblastoma	Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA	Ruano <i>et al.</i> , 2006
	Colon	Muestras de tejido de pacientes	↑ mRNA	Aytes <i>et al.</i> , 2012

Tabla 8. Cambios de expresión de las isoformas de ORAI y STIM en cáncer respecto a células o tejido normal. ↑, aumento y ↓, disminución de expresión.

ORAI1 está implicado en la proliferación de las células procedentes de distintos tipos de cáncer. Por ejemplo, muy recientemente se ha observado que ORAI1 se sobreexpresa en células de cáncer de pulmón y su inhibición disminuye ECC y la proliferación celular (Hou *et al.*,

2011). Por otro lado, el silenciamiento de ORAI1 reduce esta entrada de Ca^{2+} y, como consecuencia, la proliferación en células de glioblastoma (Liu *et al.*, 2011), de carcinoma renal (Kim *et al.*, 2014), de carcinoma escamoso esofágico (Zhu *et al.*, 2014a) y de melanoma (Umemura *et al.*, 2014). Por tanto, ORAI1 contribuye a la proliferación celular en todas estas células tumorales a través de su papel en la ECC.

ORAI1, también, parece regular la apoptosis de las células tumorales. Así, la disminución de su expresión en células de cáncer de próstata independiente de andrógenos reduce la ECC e incrementa la resistencia a la apoptosis de las mismas (Flourakis *et al.*, 2010). En contraposición, el silenciamiento de ORAI1 disminuye la ECC y aumenta la sensibilidad a apoptosis de las células de glioblastoma, lo que sugiere que su expresión y, por tanto, la ECC contribuyen a la resistencia a la apoptosis. (Liu *et al.*, 2011). También, ORAI1, por medio de la ECC, favorece la resistencia a la apoptosis en células de adenocarcinoma pancreático (Kondratska *et al.*, 2014). Este hecho podría ser debido a que la entrada de Ca^{2+} mediada por ORAI1 permite el rellenado de los depósitos y evita el estrés de retículo que conduce a la apoptosis (Prevarskaya *et al.*, 2014).

Por otra parte, ORAI1, a través de la ECC, favorece la migración, invasión y la metástasis en cáncer de mama como muestra su silenciamiento (Yang *et al.*, 2009a). Otro estudio, también, en cáncer mama, propone que ORAI1 regula la migración celular a través del canal de K^+ *ether à gogo 1* (Hammadi *et al.*, 2012). Igualmente, el silenciamiento de Oct-4, un factor de transcripción relacionado con las células madre, aumenta la migración e invasión de las células de cáncer de mama al inducir la transición epitelio-mesenquimal aumentando la expresión de ORAI1 (Hu *et al.*, 2011). Además, el silenciamiento de ORAI1 provoca una notable reducción de la ECC e I_{CRAC} , así como de la invasión en células de glioblastoma indicando que la expresión de este canal es esencial en la invasión de estas células (Motiani *et al.*, 2013a). La participación de ORAI1 en la migración e invasión en células de glioma fue confirmada en otro trabajo en el que observaron que la ECC regula la renovación de las adhesiones focales y la transición epitelio-mesenquimal, procesos clave en la invasión, a través de la fosforilación de tirosina quinasa rica en prolina 2 (Pyk2) (Zhu *et al.*, 2014b). La expresión de ORAI1, también, es importante en la migración de células de melanoma (Stanisz *et al.*, 2014; Umemura *et al.*, 2014) y de carcinoma renal (Kim *et al.*, 2014). Asimismo, este canal media la oscilación de Ca^{2+} que permite la formación del invadopodio y la invasión en células de melanoma (Sun *et al.*, 2014). Como consecuencia, el incremento de la expresión de ORAI1 en las células con un fenotipo invasivo con respecto a las que presentan un fenotipo proliferativo parece ser clave en el desarrollo de metástasis en melanoma (Stanisz *et al.*, 2014). Por otra parte, el bisfenol A, un disruptor endocrino presente en algunos recipientes, incrementa la ECC y la migración mediante el aumento de la expresión de ORAI1 en células de cáncer de próstata (Derouiche *et al.*, 2013). Por último, ORAI1 ha sido implicado en la angiogénesis asociada a carcinoma renal, ya que media la ECC que está incrementada en las células endoteliales progenitoras

procedentes de pacientes con ese carcinoma (Lodola *et al.*, 2012; Moccia y Poletto *et al.*, 2014).

Al contrario que las demás isoformas de ORAI, ORAI2 apenas ha sido relacionado con el desarrollo del cáncer. De hecho, solo hay un estudio en el que muestra que la expresión de ORAI2 está modificada en tumores paratiroides tras la activación del receptor de estrógenos ER β 1 (Haglund *et al.*, 2012).

ORAI3, de manera similar a ORAI1, está implicado en la ECC de las células de determinados tumores, principalmente de mama, siendo importante en su progresión. La primera vez que se tuvo constancia de ello, fue en las células de cáncer de mama positivas para el receptor de estrógenos donde ORAI3 participa en la ECC y en la I_{CRAC}, y su expresión está incrementada. En cambio, ORAI1 parece mediar la ECC en células de cáncer mama receptor de estrógenos negativo (Motiani *et al.*, 2010). Más tarde, se observó que la expresión de ORAI3 se incrementa con la estimulación del receptor de estrógenos α , lo que además, aumenta la ECC. Igualmente, el silenciamiento de ORAI3 inhibe la fosforilación de ERK, la quinasa de adhesión focal y la actividad de NFAT solo en las células receptor de estrógenos positivo. (Motiani *et al.*, 2013b).

Asimismo, la expresión de ORAI3 contribuye a la proliferación de las células MCF-7, una línea de cáncer de mama positiva para el receptor de estrógenos, puesto que su silenciamiento provoca el arresto del ciclo celular en fase G₀/G₁ (Fauzi *et al.*, 2011). ORAI3 parece regular la proliferación de estas células a través de la vía del oncogen *MYC* (Faouzi *et al.*, 2013). También, está implicado en la proliferación de las células de cáncer de pulmón no microcítico a través de la ECC. La reducción de su expresión produce, de nuevo, un arresto en fase G₀/G₁ (Ay *et al.*, 2013).

Por otra parte, ORAI3 confiere resistencia a la apoptosis en células de cáncer de mama MCF-7, ya que la reducción de su expresión induce este proceso de muerte (Faouzi *et al.*, 2011). En contraposición, tipifarnib, un fármaco utilizado en quimioterapia, puede inducir apoptosis por medio de la entrada de Ca²⁺ a través de ORAI3 en células de leucemia mieloide y de mieloma múltiple. De esta forma, la expresión de ORAI3 está disminuida en las células resistentes a tipifarnib (Yanamandra *et al.*, 2011). El aumento de expresión de ORAI3 en células de cáncer de próstata puede reducir la ECC por el incremento de la formación de heterómeros ORAI1/ORAI3 y, como consecuencia, aumentar la resistencia a la apoptosis. Además, la sobreexpresión de ORAI3 provoca un aumento de la proliferación celular, pero debido a un incremento de la entrada de Ca²⁺ independiente de depósitos a consecuencia precisamente del aumento de la formación de heterómeros ORAI1/ORAI3 (Dubois *et al.*, 2014).

STIM1 fue identificado en un principio como un supresor tumoral, ya que su sobreexpresión causa una disminución del crecimiento en algunas células tumorales (Sabbioni *et al.*, 1997; Manji *et al.*, 2000). Más tarde, en cambio, se ha observado que STIM1 contribuye

a la proliferación de determinados tumores a través de su implicación en la ECC. Así, STIM1 participa en la proliferación de células de cáncer cervical, ya que la reducción de su expresión da lugar a un arresto del ciclo celular en las fases S y G₂/M (Chen *et al.*, 2011). El silenciamiento de STIM1 reduce la proliferación de las células de glioblastoma y hepatocarcinoma provocando un arresto del ciclo celular en fase G₁/G₀ indicando que su expresión contribuye a la proliferación (Liu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013a; Wu *et al.*, 2015). A través de la ECC, también, está implicado en la proliferación de las células de cáncer epidermoide (Yoshida *et al.*, 2012), renal (Kim *et al.*, 2014) y de melanoma (Umemura *et al.*, 2014) como indica su silenciamiento en todas estas células.

Además, STIM1 participa en la apoptosis de las células tumorales. De esta forma, STIM1 contribuye a la resistencia a la apoptosis en células de glioblastoma, puesto que la reducción de su expresión aumenta este proceso de muerte celular inhibiendo la ECC (Liu *et al.*, 2011). De manera similar, la expresión de STIM1 favorece la resistencia a la apoptosis inducida por dos agentes antitumorales, la cisplatina en células de cáncer de pulmón no microcítico (Li *et al.*, 2013b) y el 5-fluoracilo en células de cáncer pancreático (Kondratska *et al.*, 2014). También, contribuye a la resistencia a la apoptosis en células de cáncer de próstata, ya que su silenciamiento reduce la apoptosis disminuyendo el ratio Bcl-2/BAX, la expresión de la proteína survivina y activando la vía de la caspasa-3 (Gu *et al.*, 2014). Sin embargo, el silenciamiento de STIM1 reduce la ECC y la apoptosis inducida por butirato de sodio en células de cáncer de colon, lo que sugiere que la reducción de su expresión aumenta la resistencia a la apoptosis de estas células (Sun *et al.*, 2012).

Por otro lado, STIM1 promueve la migración y la invasión que dan lugar a la metástasis de distintos tumores. En cáncer de mama, el silenciamiento de Oct-4 provoca un incremento de la capacidad de migración e invasión por medio del aumento de expresión de STIM1 (Hu *et al.*, 2011). En cáncer cervical, STIM1 está implicado en la activación de la calpaina, una proteasa regulada por Ca²⁺ clave en procesos de invasión, así como de la quinasa Pyk2 que regula las adhesiones focales que tienen lugar en la migración (Chen *et al.*, 2011). En el mismo tipo de cáncer, STIM1 media la ECC que controla la fuerza contráctil en la migración celular promoviendo la fosforilación de la cadena ligera de miosina y la reorganización de la actimiosina (Chen *et al.*, 2013). En cáncer hepático, participa en la migración e invasión de las células favoreciendo la renovación de las adhesiones focales, puesto que la reducción de su expresión aumenta estas adhesiones inhibiendo la defosforilación de la quinasa FAK (del inglés, *focal adhesion kinase*) (Yang *et al.*, 2013). Igualmente, STIM1 media la ECC en células de glioblastoma y favorece su invasión (Motiani *et al.*, 2013a; Shi *et al.*, 2015). También, participa en la migración celular en cáncer epidermoide (Yoshida *et al.*, 2012) y renal (Kim *et al.*, 2014), así como en la migración y metástasis en melanoma (Umemura *et al.*, 2014) como muestra su silenciamiento. La reducción de la expresión de STIM1 inhibe la metástasis de melanoma en pulmón. Está implicado en la invasión de las células de melanoma regulando la actividad proteolítica del invadopodio (Sun *et al.*, 2014). Asimismo, STIM1 contribuye a la diseminación

del tumor a través de su implicación en la angiogénesis. De esta manera, tiene un papel importante en la angiogénesis en cáncer cervical (Chen *et al.*, 2011) y en cáncer renal (Lodola *et al.*, 2012; Moccia y Poletto *et al.*, 2014).

STIM2 parece ser importante en la tumorigénesis del glioblastoma multiforme, ya que muestra una dosis génica cinco veces mayor, lo que se traduce en una expresión más alta que en el tejido normal (Ruano *et al.*, 2006; Hoth y Niemeyer, 2013). En cáncer de mama, STIM2 está implicado solo en la ECC de las células receptor de estrógenos positivo, lo que implica que puede tener un papel clave en la progresión de este tipo de cáncer (Motiani *et al.*, 2010). Es importante tener en cuenta su expresión con respecto a la expresión de STIM1, puesto que el ratio STIM1/STIM2 se correlaciona con un peor pronóstico en el cáncer mama. (McAndrew *et al.*, 2011). Un estudio del estroma del cáncer de próstata muestra que STIM2 está situado en una zona que presenta pérdida de heterocigosidad y desequilibrio alélico, lo que indica que puede ser clave para la progresión de ese cáncer. Además, los autores apuntan que su expresión disminuye en la transición de grado de Gleason de moderado a alto (más agresivo, su apariencia difiere totalmente de la del tejido normal) sugiriendo que podría actuar como un supresor tumoral (Ashida *et al.*, 2012). Por otro lado, STIM2 regula de forma inversa el crecimiento y la migración de las células de melanoma por medio del control de la $[Ca^{2+}]_c$ basal. Su silenciamiento reduce la $[Ca^{2+}]_c$ basal provocando un aumento de la proliferación celular y una reducción de su potencial migratorio e invasivo. Además, STIM2 parece sobreexpresarse en la zona más invasiva del melanoma, por lo que puede ser asociado con un fenotipo invasivo del tumor (Stanisz *et al.*, 2014).

6.6. Remodelado de la entrada capacitativa de Ca^{2+} en el cáncer colorrectal

Se han publicado tan solo dos trabajos acerca del remodelado de algunos de los componentes moleculares de la ECC en el desarrollo del cáncer colorrectal y ambos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

En 2012, Aytes y colaboradores estudiaron el papel de STIM2 en este tipo de cáncer. Observaron que *STIM2* se sobreexpresaba a nivel de mRNA de manera significativa en los tumores primarios colorrectales con respecto a la mucosa normal de colon del mismo paciente. Este cambio de expresión no fue debido a la presencia de mutaciones somáticas en el gen ni a un patrón anormal en la metilación del mismo. Sin embargo, *STIM2* presentaba una alta expresión en más de la mitad de los tumores analizados, los cuales estaban asociados con un fenotipo menos invasivo. Además, el silenciamiento de STIM2 en células de cáncer de colon DLD-1 aumentó su proliferación. Por otro lado, la sobreexpresión de STIM2 en células SW480 disminuyó el crecimiento celular tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, a pesar de que STIM2 se encuentre sobreexpresado en los tumores colorrectales parece funcionar como un supresor

tumoral. Este aumento de la expresión de *STIM2* puede tratarse de una característica que resulta en la supresión del crecimiento celular (Aytes *et al.*, 2012).

Recientemente, Wang y colaboradores investigaron la implicación de *STIM1* en la progresión del cáncer colorrectal. Mostraron que *STIM1* se sobreexpresaba en tejido con cáncer colorrectal respecto al tejido normal. Asimismo, el aumento de expresión de *STIM1* se correlacionaba con la invasión del tumor, el tamaño del mismo y la metástasis de los ganglios linfáticos. Además, el silenciamiento de *STIM1* en distintas líneas celulares de cáncer colorrectal disminuyó tanto la ECC como su migración. Por otra parte, la expresión exógena de *STIM1* incrementaba los niveles de *COX2* y la producción de prostaglandina E2 sugiriendo que este sensor de Ca^{2+} contribuye a la migración celular controlando la expresión de *COX2*. Este hecho fue confirmado por el rescate del efecto del silenciamiento de *STIM1* sobre la migración con la expresión de la *COX-2* o el tratamiento con prostaglandina E2. Como consecuencia, estos resultados sugieren que *STIM1* es importante en la progresión del cáncer colorrectal a través de la ECC (Wang *et al.*, 2014b).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El Ca^{2+} participa en numerosos procesos fisiológicos de la célula por lo que la alteración de su homeostasis se encuentra relacionada con numerosas patologías entre las que destaca el cáncer. De esta forma, determinados procesos importantes en el desarrollo y la progresión del cáncer como son la proliferación celular, la resistencia a la apoptosis, la migración e invasión celulares a otros tejidos están regulados, al menos en parte, por el Ca^{2+} intracelular (Monteith et al., 2012). Sin embargo, no están del todo claras cuáles son las bases moleculares y funcionales de la participación del Ca^{2+} intracelular en el desarrollo del cáncer. En los últimos años, se han publicado varios trabajos acerca del remodelado de la señal de Ca^{2+} en diferentes tumores. No obstante, apenas hay estudios sobre la alteración del transporte de Ca^{2+} en el cáncer de colon que en España se trata del cáncer más frecuente y la segunda causa de muerte por esta enfermedad. Como consecuencia, nuestra **hipótesis** de trabajo es que en el cáncer de colon se produce un remodelado del transporte de Ca^{2+} clave para el desarrollo de esta patología y centrado en la alteración de la entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC).

Para contrastar la hipótesis anterior nos planteamos como **objetivo general** caracterizar el remodelado del Ca^{2+} intracelular en el cáncer de colon y las bases celulares y moleculares del mismo. Como modelo experimental utilizaremos diversas líneas celulares humanas de epitelio normal de colon y líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano bien caracterizadas con las que nos proponemos alcanzar los siguientes **objetivos específicos**:

1. Comparar la ECC, la liberación y entrada de Ca^{2+} inducida por agonistas y el contenido de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares de las células normales y tumorales de colon y determinar su posible contribución a las características de las células tumorales.
2. Estudiar el posible remodelado de la captación mitocondrial de Ca^{2+} en las células tumorales con respecto a las normales y, si así fuera, estudiar sus causas.
3. Caracterizar las corrientes iónicas operadas por depósitos presentes en las células normales y tumorales de colon y su contribución a la ECC y a las características de las células tumorales.
4. Estudiar los cambios en la expresión de los posibles componentes moleculares de la ECC, así como su contribución al remodelado del Ca^{2+} intracelular y a la adquisición de características tumorales en el cáncer de colon.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Métodos

1.1. Cultivos celulares

NCM460: Es una línea celular normal derivada de epitelio de mucosa de colon humano. Proceden de un varón hispano de 68 años y fue seleccionada para crecimiento *in vitro* sin ser infectada o transfectada con ningún ácido nucleico exógeno. Estas células expresan citoqueratinas y villina, así como otros antígenos de epitelio de colon y no crecen en agar lo que confirma su condición de célula normal o no tumorigénica (Moyer *et al.*, 1996). La línea celular fue subcultivada tan solo aproximadamente 10 veces tras su descongelación, ya que su cultivo durante grandes periodos de tiempo puede dar lugar a una transformación de sus características. Por tanto, la proliferación celular fue controlada en cada subcultivo mediante conteo celular en una cámara de Neubauer.

NCM356: Se trata de una línea celular normal derivada de epitelio de mucosa de un varón negro de 65 años con adenocarcinoma rectal. Estas células no fueron infectadas ni transfectadas con información genética exógena. Expresa ciertos antígenos de mucosa de colon como citoqueratinas y villina. Además, algunas de las células son positivas para algunos antígenos asociados a tumores como mutante p53 y TAG72, pero no crecen en agar por lo que se pueden considerar células no tumorales (Stauffer *et al.*, 1995). Esta línea celular no fue subcultivada más de 10 veces para prevenir la adquisición de características de células no diferenciadas.

HT29: Es una línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano. Deriva de un tumor primario de colon en estadio C de Dukes y procedente de una mujer caucásica de 44 años (Fogh y Tempre, 1975). Presenta mutaciones en los genes relacionados con el cáncer *BRAF*, *PIK3CA*, *TP53* (Ahmed *et al.*, 2013) y *APC* (Brocardo *et al.*, 2005).

SW480-ADH: Es una línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano. Procede de la línea celular SW480 que deriva de un tumor primario de colon en estadio B de Dukes de un varón caucásico de 50 años (Leibovitz *et al.*, 1976) y con mutaciones en el oncogen *KRAS* y los genes supresores tumorales *TP53* (Ahmed *et al.*, 2013) y *APC* (Nishisho *et al.*, 1991). Estas células se caracterizan por expresar el receptor de la vitamina D (Pálmer *et al.*, 2001).

SW480-R: Se trata de una línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano que procede de la línea celular SW480, la cual deriva de un tumor primario de colon en estadio B de Dukes de un varón caucásico de 50 años (Leibovitz *et al.*, 1976). Se diferencian de las células SW480-ADH en la ausencia de expresión del receptor de la vitamina D y por presentar un aspecto más redondeado (Palmer *et al.*, 2001).

A549: Se trata de una línea celular de carcinoma de pulmón humano derivada de tejido carcinomatoso de pulmón procedente de un varón de 58 años (Giard *et al.*, 1973).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

hCASMC: Se trata de un cultivo primario de células de músculo liso de artera coronaria humana procedente de un varón caucásico de 21 años sin ninguna patología vascular conocida.

Todas las células arriba referenciadas son adherentes y fueron cultivadas en frascos de 25 cm² a excepción de las hCASMCs que, también, se cultivaron en frascos de 75 cm².

Las células NCM460, NCM356, HT29, SW480-ADH y SW480-R fueron cultivadas en medio DMEM (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) con glucosa 1 g/l suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS; del inglés, fetal bovine serum), L-glutamina 2 mM y una mezcla de penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 U/ml) y fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera con 90 % de aire y 10 % de CO₂. Las células A549 fueron cultivadas en medio RPMI1640 con la misma suplementación utilizada en el caso del medio DMEM y mantenidas a 37 °C en una atmósfera con 95% de aire y 5 % de CO₂. Además, las células NCM460 y NCM356, también se cultivaron para su mantenimiento y congelación en medio M3:10™ suplementado de igual forma e incubadas a 37 °C y atmósfera con 95 % aire y 5 % de CO₂. Para su subcultivo, todas estas células fueron lavadas con PBS y levantadas tras una incubación con tripsina-EDTA a 37 °C durante 3 min. Finalmente las células fueron centrifugadas a 290 g durante 4 min y el sedimento celular se resuspendió en medio de cultivo. Por otro lado, las hCASMCs se cultivaron en medio SmBulletKit a 37 °C y atmósfera con 5 % de CO₂. Para su subcultivo, las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS; del inglés *phosphate buffered saline*) e incubaron con tripsina-EDTA a 37 °C durante 30 s. Las células se sembraron tras ser centrifugadas a 200 g durante 4 min.

1.2. Proliferación celular

Las células NCM460, NCM356, HT29, SW480-ADH y SW480-R fueron sembradas por triplicado en placas de 6 pocillos en medio DMEM completo a una densidad aproximada de 10⁵ células/pocillo, siendo el volumen final del pocillo 3 ml. Al comienzo del ensayo se tomó una muestra de las células sembradas en cada pocillo para su conteo. Las células se mantuvieron en cultivo durante 72 h. Transcurrido ese tiempo, fueron levantadas de las placas mediante su incubación con tripsina-EDTA a 37 °C y contadas. El conteo de las células al inicio y final del experimento de proliferación fue llevado a cabo en una cámara de Neubauer con un microscopio invertido Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Tokio, Japón). Se utilizó azul de tripano al 0,4 % en NaCl a una dilución 1:2 para diferenciar las células viables de las muertas, ya que estas últimas toman una coloración azul característica a consecuencia de la entrada del reactivo a través de la membrana plasmática. Para estimar la proliferación celular solo tuvimos en cuenta las células viables. La proliferación fue determinada como el número de divisiones en 72 h aplicando el siguiente algoritmo:

$$n^{\circ} \text{ divisiones (72h)} = \frac{\log(n^{\circ} \text{ células finales} / n^{\circ} \text{ células iniciales})}{\log 2}$$

1.3. Registro de Ca^{2+} citosólico mediante imagen de fluorescencia

La monitorización de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en tiempo real se llevó a cabo mediante imagen de fluorescencia utilizando la sonda fluorescente fura-2/AM. Esta molécula es un derivado acetoximetil éster del fura-2 que consiste en un quelante de Ca^{2+} unido a un resto fluorescente (Grynkiewicz *et al.*, 1985). El fura-2 al ser una molécula polar y altamente cargada no puede atravesar la membrana plasmática, por lo que no es posible su penetración en el interior celular. Sin embargo, el fura-2/AM gracias a la presencia del grupo éster es hidrófobo lo que le permite atravesar las membranas celulares. Una vez en el citosol es de-esterificado por esterasas intracelulares liberando la molécula de fura-2 ácido, impermeable a la membrana celular por presentar carga neta negativa (Fig. 21).

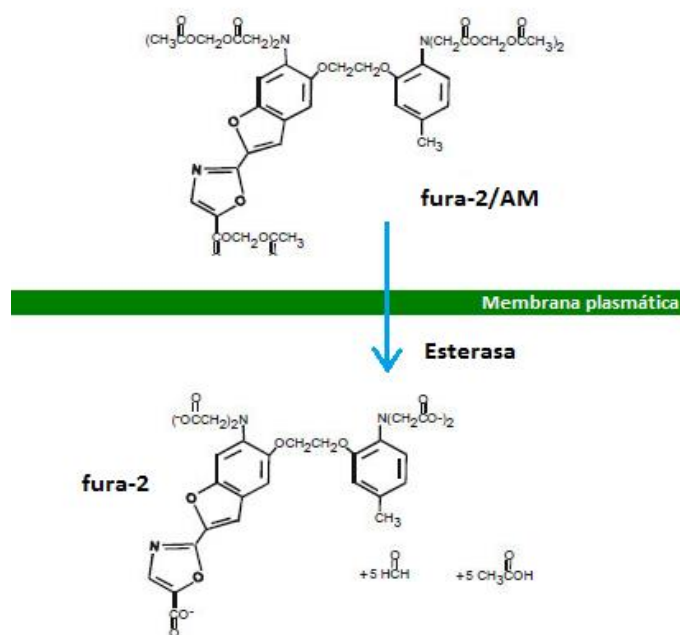


Figura 21. De-esterificación del fura-2/AM dando lugar al fura-2 en el citoplasma. Se aprecian las cargas negativas de la molécula de fura-2 las cuales impiden su salida de la célula.

La unión de Ca^{2+} al fura-2 aumenta la emisión de fluorescencia al excitar a longitudes de onda de 340 nm, pero dicha emisión disminuye al excitar a 380 nm (Fig. 22). Este hecho permite obtener una medida de fluorescencia ratiométrica 340/380 nm, la cual le confiere al fura-2 una serie de ventajas respecto a otros colorantes que, también, permiten monitorizar la

III. MATERIAL Y MÉTODOS

$[Ca^{2+}]_c$. Así, este método fluorimétrico presenta una gran sensibilidad, elimina artefactos y permite medidas independientes de la carga de colorante de la célula.

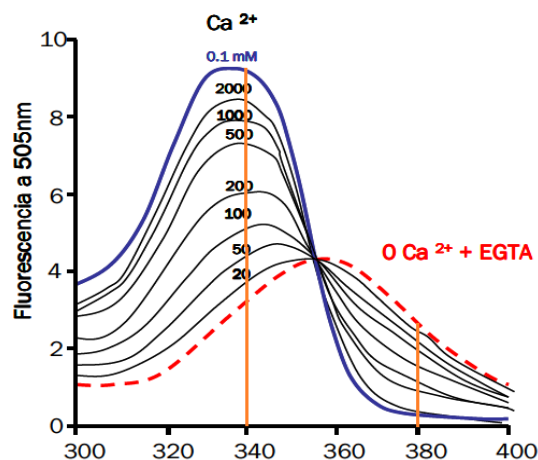


Figura 22. Espectro de excitación del fura-2 a diferentes concentraciones de Ca^{2+} (20nM-0,1 mM). Se observa que la variación de la $[Ca^{2+}]$ provoca un cambio en el espectro de excitación del fura-2, éste se desplaza hacia la izquierda a medida que la concentración del ión disminuye. Así, un aumento en la $[Ca^{2+}]$ citosólica se ve traducido en un incremento de la fluorescencia cuando excitamos la molécula de fura-2 a 340 nm y una disminución al excitar a 380 nm, lo que provoca un aumento más acusado del ratio 340/380. Modificado de Grynkiewicz *et al.*, 1985.

Para las medidas de calcio citosólico, también, fue utilizado fura-4F/AM, una sonda de Ca^{2+} similar al fura-2/AM, pero que permite monitorizar concentraciones mayores de este ión sin saturarse, ya que presenta menor afinidad por el catión. Así, la K_D del fura-2 es 140 nM, mientras que la del fura-4F es de 770 nM. Por tanto, el fura4F/AM fue usado en los experimentos en los que el fura-2/AM se saturaba debido a la elevada $[Ca^{2+}]_c$. Los espectros de emisión y excitación son muy similares a los del fura-2/AM por lo que el protocolo de medida de Ca^{2+} es el mismo.

Las células fueron sembradas en forma de gota en cubreobjetos de cristal de 12 mm de diámetro previamente tratados con poli-L-lisina (0,01 mg/ml) a una densidad de 15.000 células/ml y depositadas en placas de 4 pocillos. Al día siguiente, las células se incubaron con fura-2/AM o fura-4F/AM 4 μ M preparado en medio externo completo (MEC) durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad para evitar que se produzca el foto-apagamiento o *photobleaching* de la sonda.

A continuación, los cubreobjetos con las células sembradas fueron montados en una cámara de perfusión con MEC conteniendo $CaCl_2$ 1 mM o libre de Ca^{2+} según correspondiera en cada caso. La cámara fue fijada en la platina de un microscopio de fluorescencia invertido Zeiss Axiovert S100TV. El microscopio se encuentra equipado con un sistema de perfusión

(Warner Instruments, Hamden, CT) por el que se hace pasar a las células el medio deseado a una velocidad constante y a una temperatura de 37 °C. Una lámpara halógena Zeiss X-Cite Series 120 ilumina con luz monocromática alternativamente a 340 y 380 nm gracias a una rueda de filtros de excitación sincronizada (Sutter Instruments, Novato, CA), mientras que un espejo dicroico desvía la luz hacia la cámara que contiene las células. La fluorescencia emitida es recogida a través de un objetivo 40x (1.3 de apertura numérica e inmersión en aceite), atraviesa el espejo dicroico que refleja luz de longitudes de onda superiores a 520 nm y es filtrada por un filtro de emisión a 520 nm. Por último, las imágenes fueron capturadas con una cámara Orca-ER de Hamamatsu Photonics (Hamamatsu, Japón) (Fig. 23).

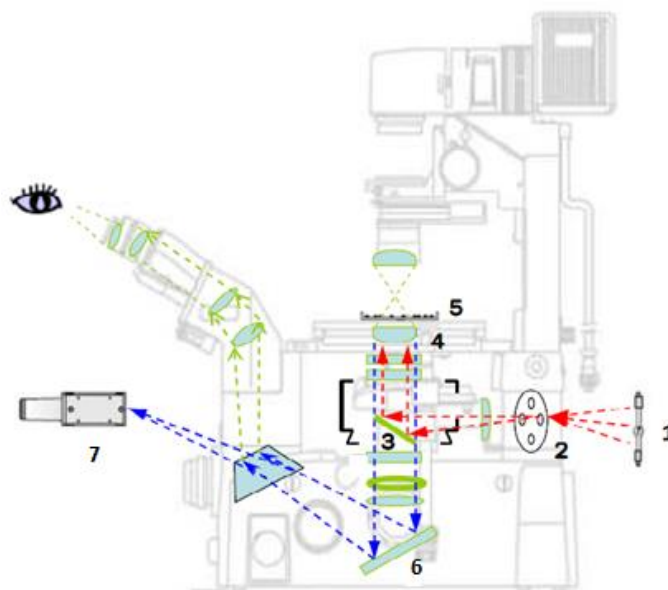


Figura 23. Esquema del equipo de imagen de fluorescencia para monitorizar la $[Ca^{2+}]_c$ y sus partes más relevantes. (1) Lámpara de fluorescencia, (2) rueda de filtros monocromados de excitación, (3) espejo dicroico, (4) Objetivo 40x de aceite de inmersión, (5) cámara portadora de células, (6) filtro de emisión, (7) cámara Orca-ER.

En los experimentos en los que se registró la ECC inducida por tapsigargina, las células fueron incubadas en MEC libre de Ca^{2+} conteniendo tapsigargina 1 μM durante 10 min antes de llevar a cabo las medidas de calcio citosólico. Posteriormente, los experimentos se iniciaron en MEC libre de Ca^{2+} y el registro de la ECC se llevó a cabo tras la incubación de las células en MEC con Ca^{2+} 1 mM. Por otro lado, la liberación de Ca^{2+} y la ECC inducida por agonistas fisiológicos fue determinada utilizando ATP 200 μM o carbacol 100 μM . Además, el contenido de Ca^{2+} de los depósitos fue estudiado usando ionomicina a baja concentración (400 nM) o ácido ciclopiazónico 30 μM en MEC libre de Ca^{2+} .

Los resultados fueron analizados utilizando el software Aquacosmos 2.6 (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japón). En cada experimento realizamos el registro individual de Ca^{2+}

citoplasmático de 10-40 células. La mayoría de los resultados procedentes del análisis de los registros se presentan como la media de mínimo 3 experimentos independientes.

1.4. Medida de la liberación de Ca^{2+} con IP_3 enjaulado

El IP_3 enjaulado o *caged-IP₃* es una molécula compleja que contiene IP_3 en su interior, el cual es liberado mediante una reacción de fotólisis. La producción de IP_3 en la célula en condiciones fisiológicas se trata de un proceso rápido. De esta forma, la gran ventaja de este compuesto precisamente es la posibilidad de obtener una gran cantidad de IP_3 en el interior de la célula de manera prácticamente inmediata mediante su iluminación e independientemente de la activación de un receptor o la fosfolipasa C correspondiente, lo que permite liberar el Ca^{2+} de los depósitos simulando una estimulación fisiológica de los IP_3R .

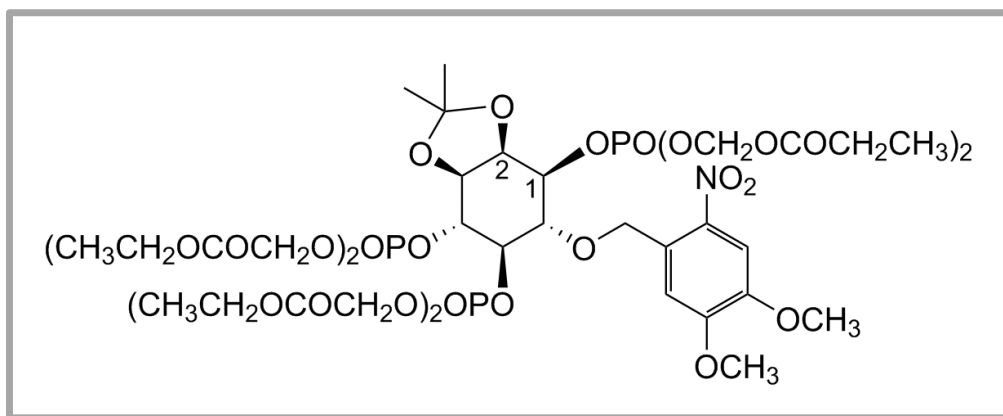


Figura 24. Estructura molecular del IP_3 enjaulado utilizado en el ensayo (D-2,3-O-Isopropilideno-6-O-(2-nitro 4,5-dimetoxi)bencil-*mio*-Inositol 1,4,5-trifosfato-Hexakis(propionoximetil)Ester).

La molécula de IP_3 enjaulado utilizada en este caso fue denominada por el fabricante como *caged-Ins(1,4,5) P_3 /PM*. Se trata de una molécula de IP_3 unida por su grupo 6-hidroxilo a un grupo nitrodimetoxibencilo el cual previene su actividad biológica. Además, sus grupos fosfatos se encuentran protegidos por un grupo propionoximetilo (PM) unido por un enlace éster lo que permite a la molécula enjaulada atravesar la membrana plasmática en modo inactivo (Fig. 24). Así, el IP_3 enjaulado atraviesa la membrana plasmática y es atacado por esterasas, las cuales rompen el enlace éster que une la molécula a los grupos PM en un período de 30-180 min. A continuación, el *caged-Ins(1,4,5) P_3* es iluminado con un láser aproximadamente a 400 nm lo que provoca la fotólisis de la molécula y la libera del grupo nitrodimetoxibencilo transformándola en una molécula biológicamente activa con capacidad para unirse al receptor/canal de IP_3 y liberar el Ca^{2+} almacenado en los depósitos intracelulares de Ca^{2+} (Fig. 25).

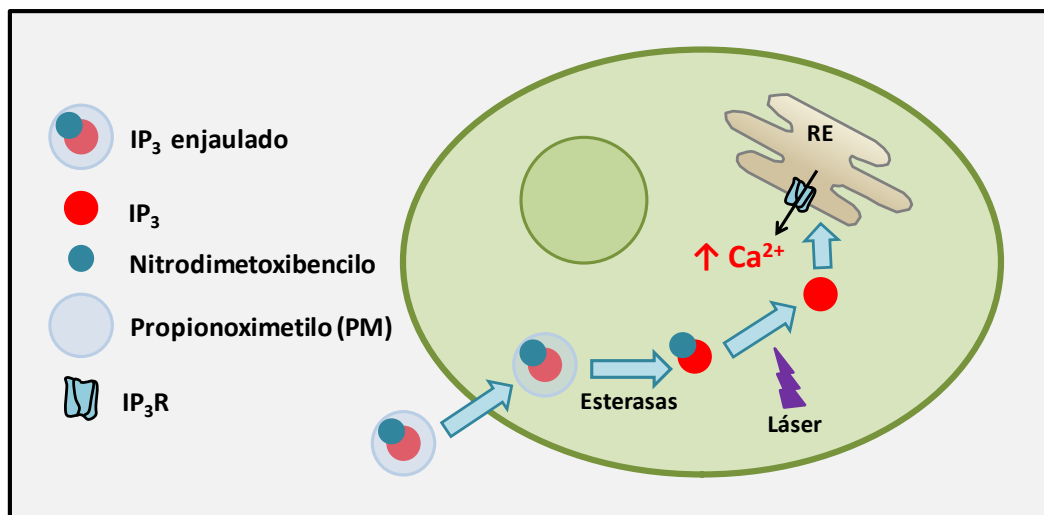


Figura 25. Proceso de liberación de Ca^{2+} utilizando IP_3 enjaulado (*caged-Ins(1,4,5)P₃/PM*).

La medida de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ para estudiar la liberación de Ca^{2+} se llevó a cabo con la sonda fluo-4/AM que presenta un máximo de excitación a 494 nm y un máximo de emisión a 506 nm cuando una Ca^{2+} . Además, el registro del Ca^{2+} se realizó en un equipo de microscopía confocal Leica TCS SP5X que permite tener un control adecuado de la iluminación láser y, por tanto, de la fotoliberación de IP_3 .

Para las medidas, las células NCM460 y HT29 fueron sembradas en placas de Petri con fondo de cristal. A las 24 h de la siembra, las células se cargaron con fluo-4/AM 2 μM y *caged-Ins(1,4,5)P₃/PM* 0,5 μM durante 1 h en MEC. Una vez cargadas las células se llevaron a cabo 3 lavados con MEC. El registro de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ fue realizado en un microscopio confocal Leica TCS SP5X (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania) usando un objetivo 40x. El fluo-4 fue excitado con un láser a 488 nm y la luz emitida entre 503 y 571 nm fue recogida cada 3 s. La fotólisis del *caged-Ins(1,4,5)P₃/PM* fue llevada a cabo con un láser a 405 nm. Las imágenes tomadas fueron analizadas con el *software* LAS AF Lite (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania). El fondo fue sustraído de todas las imágenes y la intensidad de fluorescencia (F) fue normalizada con respecto a la intensidad de fluorescencia basal F_0 . Los cambios en F/F_0 fueron interpretados como medida de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$.

1.5. Ensayo de muerte celular con anexina V-FITC y yoduro de propidio

La anexina V es una proteína de 35-36 kDa con capacidad para unirse a los residuos de fosfatidilserina (PS) de una manera dependiente de Ca^{2+} . Uno de los procesos iniciales que tienen lugar durante la apoptosis es la pérdida de asimetría de la membrana plasmática. De esta forma, los residuos de PS que en condiciones normales se encuentran en la cara interna de la membrana plasmática se exponen en su cara externa (Martin *et al.*, 1995). Este hecho es

III. MATERIAL Y MÉTODOS

aprovechado para la detección de células en las primeras fases de la apoptosis utilizando para ello anexina V. La anexina V se encuentra marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC; del inglés, *fluorecein isothiocyanate*). Además, la anexina V-FITC es acompañada de yoduro de propidio (PI; del inglés, *propidium iodide*) para la detección de células en apoptosis o necrosis. El yoduro de propidio no es capaz de introducirse en las células intactas. Sin embargo, éste permea a través de las membranas de las células que han sufrido procesos de muerte, ya que esas células pierden la integridad de su membrana (Vermes *et al.*, 1995; van Engeland *et al.*, 1996). Así, las células viables no unen anexina V-FITC ni dejan penetrar el PI. Las células que se encuentran en la fase de apoptosis temprana exponen PS en el lado externo de su membrana, lo que provoca la unión de la anexina V-FITC, en cambio no permean el PI. Asimismo, las células en apoptosis tardía o necrosis pierden por completo la integridad de su membrana por lo que unen anexina V-FITC y permean PI (Fig. 26).

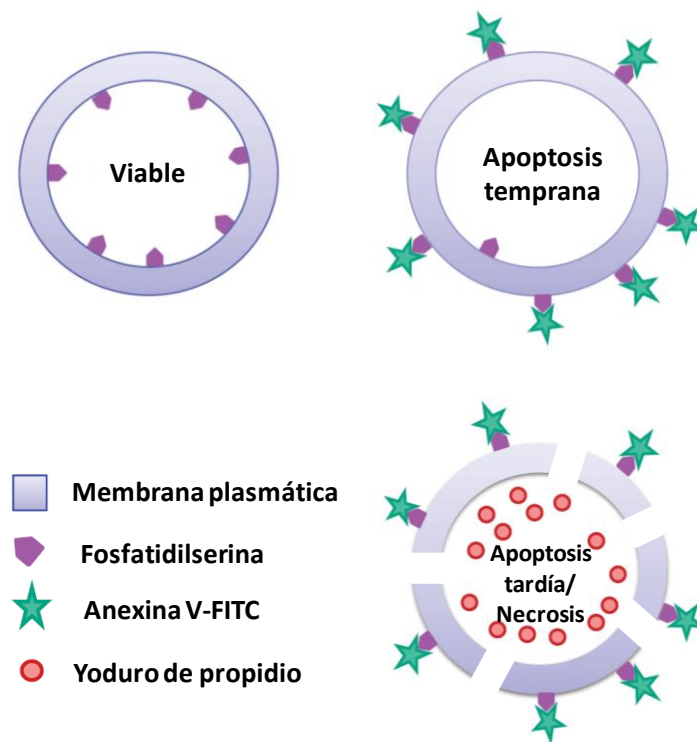


Figura 26. Marcateo con anexina V-FITC y yoduro de propidio para el análisis de la muerte celular. Figura modificada de BD Biosciences.

El análisis de la muerte celular utilizando anexina V y PI fue llevado a cabo mediante citometría de flujo. La citometría de flujo permite analizar el marcateo de cada célula de forma individual con una gran especificidad y una alta fiabilidad. El citómetro consta de distintos láseres que excitan los fluoróforos utilizados célula a célula, así como, de detectores que recogen la luz emitida por los fluoróforos. Como consecuencia, cada detector emite un pulso de voltaje que depende de la señal óptica recibida, el cual es amplificado y digitalizado por un ordenador. El análisis de las células mediante citometría de flujo permite clasificar de forma

sencilla a las células en tres grupos en función de su marcaje con anexina V y PI como se describe anteriormente. Las células anexina V negativas y PI negativas pertenecen al grupo de las células viables, las células anexina V positivas y PI negativas se encuentran en apoptosis temprana y las células anexina V positivas y PI positivas, en apoptosis tardía o necrosis (Fig. 27).

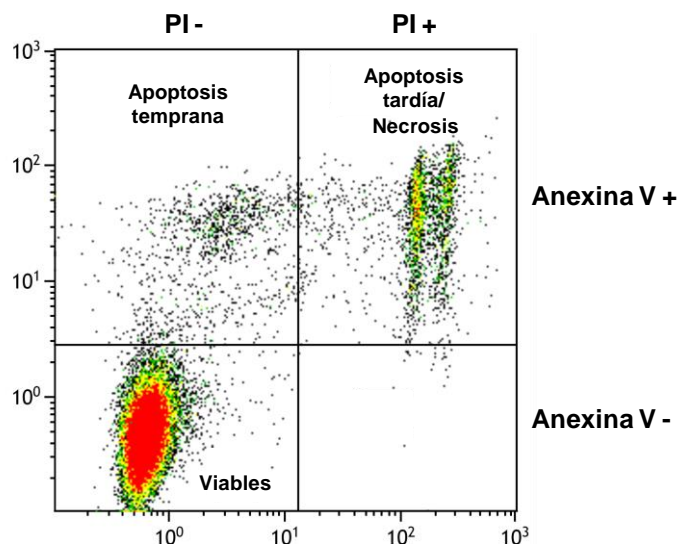


Figura 27. Representación Dot-Plot del ensayo de muerte celular con anexina V-FITC y PI (yoduro de propidio) de células HT29. Cada punto del gráfico se corresponde con un evento (célula) analizado mediante citometría de flujo. Las células son clasificadas según el marcaje fluorescente que presenten. Las células viables son anexina V-/PI-, las células en apoptosis temprana son anexina V+/PI- y las células en apoptosis tardía o necrosis son anexina V+/PI+.

En los ensayos realizados la muerte celular fue inducida con H_2O_2 y comparada con la que se produce en condiciones basales (control). El tratamiento consistió en la incubación de las células con H_2O_2 1 mM durante 30 min en los experimentos en los que se estudió el efecto del silenciamiento de STIM2 sobre la muerte celular en células NCM460 y con H_2O_2 2 mM durante 150 min, en los que se comparó la resistencia a la muerte celular entre células NCM460 y HT29. Tanto las células NCM460 como las HT29 se levantaron del frasco de cultivo con tripsina-EDTA y fueron centrifugadas a 290 g. A continuación, se lavaron con PBS y se centrifugaron, de nuevo, a 290 g. Seguidamente, el sedimento fue resuspendido en tampón de unión obteniendo una densidad celular de 1×10^6 células/ml. Se tomaron 1×10^5 células a las que se añadieron 5 μ l de anexina V-FITC y 10 μ l de PI (50 μ g/ml) y se incubaron durante 15 min en oscuridad. Por último, se añadieron otros 400 μ l de tampón de unión. Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter, Brea, CA). En nuestro caso, tanto la anexina V-FITC como el PI se excitaron con un láser de argón de 488 nm (azul). Además, para la anexina V-FITC se utilizó un detector que capta luz a 525 nm (FL1) y para el PI, un detector que capta a 620 nm (FL3). Los resultados fueron procesados y representados con el software de análisis Kaluza (Beckman Coulter, Brea, CA).

1.6. Nucleofección

La transfección es una técnica que permite introducir ácidos nucleicos como ADN y ARN en el interior celular. Hay diferentes métodos de transfección, pero en este trabajo se ha elegido el método de la nucleofección, ya que es el más eficiente para las líneas celulares estudiadas, NCM460 y HT29. La nucleofección es un método físico de transfección que utiliza células en suspensión. Consiste en someter a las células conjuntamente con el ácido nucleico que se quiere introducir a un pulso eléctrico lo que da lugar a la formación de poros temporales en la bicapa de fosfolípidos de la membrana. Así, el potencial eléctrico generado permite a los ácidos nucleicos entrar en el interior de la célula. La nucleofección no solo permite la entrada del ácido nucleico en el citoplasma, sino también en el núcleo de la célula (Lenz *et al.*, 2003; Maahaso *et al.*, 2004).

Las células NCM460 o HT29 fueron levantadas del frasco de cultivo con tripsina-EDTA. 1×10^6 células y centrifugadas a 290 g. El sedimento celular fue resuspendido en 100 μ l de mezcla de nucleofección (solución A y solución B). La cantidad adecuada de ácido nucleico que se deseaba introducir en las células (plásmido GFP-AEQmit o siRNA) fue añadida a la mezcla. La suspensión celular conteniendo el ácido nucleico fue trasladada a una cubeta de nucleofección. La nucleofección fue llevada a cabo con un Nucleofector II de Amax Biosystems (Colonia, Alemania) seleccionando el programa W-017 diseñado para transfectar células HT29 con alta eficiencia. A continuación, se añadieron 900 μ l de medio completo DMEM a la cubeta y las células fueron sembradas a la densidad deseada dependiendo del experimento a desarrollar.

1.7. Monitorización del Ca^{2+} mitocondrial mediante imagen de bioluminiscencia

El registro de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ se lleva a cabo con una fotoproteína denominada aequorina (AEQ) dirigida en este caso a la mitocondria. La AEQ se trata de una proteína bioluminiscente presente en la medusa *Aequorea victoria* que tiene la peculiaridad de emitir luz azul en presencia de Ca^{2+} (Fig. 28). Contiene tres sitios de unión a Ca^{2+} de tipo mano EF con aminoácidos ácidos (glu y asp) (Shimomura *et al.*, 1965; Shimomura 1995). En un principio la AEQ se aislaba de la medusa, se purificaba y se microinyectaba en las células para medir las señales de Ca^{2+} intracelulares. Más tarde, con el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética el DNA complementario de la AEQ fue clonado y se añadieron secuencias de direccionalidad lo que permitió dirigir la AEQ hacia distintos compartimentos subcelulares. Así, se han obtenido AEQs dirigidas al interior de las mitocondrias (Rizzuto *et al.*, 1992), al retículo endoplásmico (Montero *et al.*, 1995), al aparato de Golgi (Pinton *et al.*, 1998), al núcleo (Brini *et al.*, 1993) y a vesículas de secreción (Pouli *et al.*, 1998).

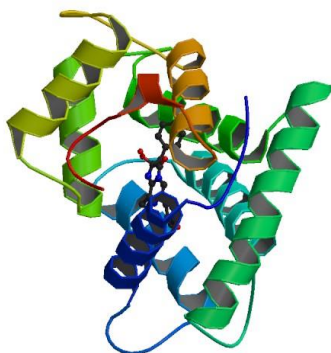


Figura 28. Estructura tridimensional de la aequorina. Imagen tomada de RCSB PDB (www.rcsb.org) de PDB ID 1EJ3 (Head *et al.*, 2000).

La reacción de la AEQ por la que emite luz tras la unión a Ca^{2+} requiere previamente la reconstitución a su forma activa. Para ello, en presencia de O_2 , la apoaequorina se une mediante ataque peroxidativo a su cofactor celenterazina. Esta molécula que actúa como un cofactor atraviesa las membranas celulares con facilidad debido a su gran lipofilidad (Blinks *et al.*, 1976). Cuando se une a Ca^{2+} , la AEQ reconstituida emite luz azul con una $\lambda_{\text{máx}}$ de 465 nm y se obtienen como productos de la reacción apoaequorina, celenteramida y CO_2 (Fig. 29). De esta forma, la cantidad de luz emitida es función de la $[\text{Ca}^{2+}]$ del medio. Esta reacción puede considerarse prácticamente irreversible, puesto que una vez que la celenterazina se oxida dando lugar a la celenteramida, la unión de la AEQ a una nueva molécula de celenterazina es un proceso demasiado lento. Así, la $[\text{Ca}^{2+}]$ es proporcional a la velocidad relativa del consumo de la AEQ, ya que la cantidad de proteína disponible para la medida de Ca^{2+} va disminuyendo progresivamente.

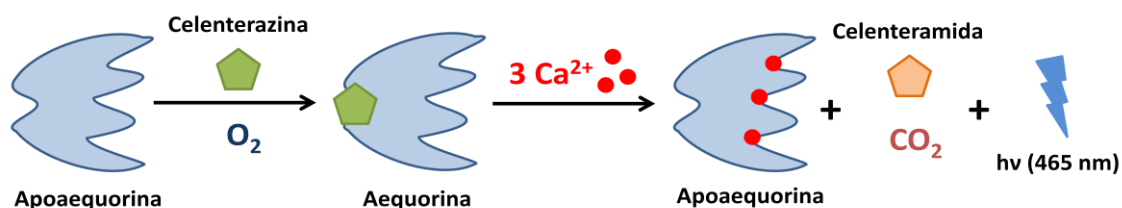


Figura 29. Reacción de bioluminiscencia de la aequorina. La celenterazina se une a la apoaequorina en presencia de O_2 para dar lugar a la aequorina. Cuando la aequorina se une a Ca^{2+} la celenterazina se oxida a celenteramida y emite luz a 465 nm.

La AEQ utilizada para monitorizar el Ca^{2+} mitocondrial se trata de la nativa (wt) y se encuentra clonada en un plásmido que presenta una secuencia de direccionamiento a la mitocondria, así como, otra secuencia para GFP (GFP-AEQmit). Las células NCM460 y HT29

III. MATERIAL Y MÉTODOS

fueron transfectadas con este plásmido mediante nucleofección. Por cada nucleofección se usaron aproximadamente 5 µg de DNA. Una vez transfectadas las células fueron sembradas en forma de gota sobre cubreobjetos de cristal de 12 mm de diámetro tratados con poli-L-lisina (0,01 mg/ml) depositados en placas de cuatro pocillos a una densidad de 15000 células/cristal. A las 24 h de la transfección con el plásmido GFP-AEQmit las células fueron incubadas en oscuridad y a temperatura ambiente durante 2 h en MEC conteniendo celenterazina para la reconstitución de la AEQ. En el caso de los experimentos con células intactas en los que estudiamos la captación mitocondrial de Ca^{2+} proveniente de la ECC se usó celenterazina nativa (wt) y en los que estudiamos la entrada mitocondrial de Ca^{2+} proveniente de la liberación con ATP, celenterazina h. La celenterazina h permite aumentar la intensidad de luminiscencia 16 veces con respecto a la celenterazina wt, lo que permite aumentar la sensibilidad del registro de Ca^{2+} . Sin embargo, para los experimentos en células permeabilizadas se utilizó celenterazina n que reduce la intensidad lumínica de la reacción por lo que disminuye la sensibilidad de la medida de Ca^{2+} (Shimomura *et al.*, 1993; Teranishi y Shimomura, 1997). Las células fueron tratadas con tapsigargina 1 µM en medio libre de Ca^{2+} en los experimentos en los que se registro el Ca^{2+} mitocondrial proveniente de la ECC.

Tras la reconstitución de la enzima, los cubreobjetos fueron montados en una cámara que se acopló a un microscopio invertido Zeiss Axiovert S100TV (Zeiss, Jena, Alemania) equipado por un sistema de perfusión (Warner Instruments). En los experimentos con células intactas se perfundió en primer lugar MEC libre de Ca^{2+} y en los experimentos con células permeabilizadas, MEC conteniendo 1 mM de CaCl_2 y seguidamente medio interno con baja concentración de Ca^{2+} (200 nM), antes de permeabilizar las células con digitonina 10 µM.

Las células transfectadas fueron seleccionadas en el campo en base a la expresión de GFP que ponemos de manifiesto mediante imagen de fluorescencia con un filtro FITC y una cámara Hamamatsu C2400-35 ICCD (Hamamatsu photonics, Hamamatsu, Japón). Las imágenes de bioluminiscencia fueron tomadas con una cámara Hamamatsu VIM (Hamamatsu photonics, Hamamatsu, Japón) capaz de captar los fotones emitidos por la AEQ acoplada a un procesador Argus-20. Este sistema de imagen nos permitió monitorizar la bioluminiscencia en célula única. La emisión de fotones se integra en periodos de 10 s. Al final de cada experimento se perfundió MEC conteniendo digitonina 100 µM y CaCl_2 10 mM con el objetivo de medir toda la luminiscencia residual de la AEQ utilizada para la cuantificación de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$.

La emisión de fotones de la AEQ fue analizada con el software Aquacosmos 2.6 de Hamamatsu. La transformación de los valores de luminiscencia en $[\text{Ca}^{2+}]_m$ se llevó a cabo mediante el método descrito por Brini y colaboradores (Brini *et al.*, 1995). Este método se basa en la relación existente entre la $[\text{Ca}^{2+}]$ y la luminiscencia emitida por la AEQ medida en cuentas por segundo registradas en un momento dado en el experimento menos el fondo (L) con respecto a las que se registrarían si toda la AEQ de la célula se expone de repente a una $[\text{Ca}^{2+}]$ saturante ($L_{\text{máx}}$). Así, la $[\text{Ca}^{2+}]$ (M) se obtiene a través del siguiente algoritmo matemático:

$$[\text{Ca}^{2+}] \text{ (M)} = \frac{\left(\frac{L}{L_{\text{máx}}\lambda}\right)^{\frac{1}{n}} + \left(\frac{L}{L_{\text{máx}}\lambda}\right)^{\frac{1}{n}} K_{\text{TR}} - 1}{K_{\text{R}} - \left(\frac{L}{L_{\text{máx}}\lambda}\right)^{\frac{1}{n}} K_{\text{R}}}$$

En esta ecuación:

- K_{TR} es la proporción de sitios de unión a Ca^{2+} en estado T frente al estado R de la AEQ. La emisión de bioluminiscencia tiene lugar cuando todos los sitios de unión a Ca^{2+} se encuentran en estado R que es al que se une el Ca^{2+} .
- K_{R} es la constante de asociación a Ca^{2+} .
- n es el número de sitios de unión a Ca^{2+} .
- λ es la constante de velocidad de consumo de AEQ a una $[\text{Ca}^{2+}]$ saturante

Este algoritmo matemático deriva de un modelo propuesto para explicar la dependencia de la emisión de luz de la AEQ con la $[\text{Ca}^{2+}]$, sin embargo, puede utilizarse como una simple transformación matemática que ajusta valores de luminiscencia a cada $[\text{Ca}^{2+}]$ (Allen *et al.*, 1977).

1.8. Estudio del potencial mitocondrial con TMRM

TMRM o tetrametilrodamina metil éster es un fluoróforo lipofílico capaz de permear a través de las membranas y de acumularse en la mitocondria debido a su carga neta positiva en función del potencial mitocondrial (Fig. 30). Por tanto, permite estimar diferencias o cambios en el potencial mitocondrial de una célula, ya que cuanto mayor es su acumulación en la mitocondria más negativo es el potencial mitocondrial (Scaduto *et al.*, 1999). La determinación de su acumulación en este orgánulo subcelular es llevado a cabo mediante microscopía de fluorescencia.

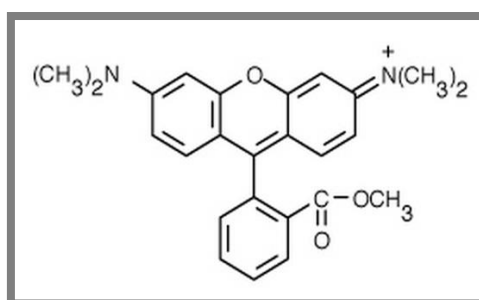


Figura 30. Estructura química del TMRM.

Las células NCM460 y HT29 fueron sembradas en cristales de poli-L-lisina (0,01 mg/ml) a una densidad de 15000 células/cristal. A las 24 h de la siembra, fueron incubadas en MEC

conteniendo TMRM 50 nM durante 15 min a temperatura ambiente para llevar a cabo la estimación del potencial mitocondrial. El cristal se trasladó a una cámara de microscopio con medio MEC. Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas en un microscopio invertido Zeiss Axiovert S100TV (Zeiss, Jena, Alemania) equipado con una cámara digital Hamamatsu OrcaER (Hamamatsu photonics, Hamamatsu, Japón) con el objetivo 40 x y utilizando un filtro de rodamina. Se tomaron tres imágenes por campo al azar. A continuación, fueron analizadas con el software Aquacosmos 2.6 (Hamamatsu photonics, Hamamatsu, Japón). El fondo fue abstraído de todas las imágenes.

1.9. Ensayo de invasión *in vitro*

Los ensayos de invasión *in vitro* permiten evaluar la invasión de las células tumorales en función de su capacidad para desplazarse a través de una matriz proteica. El ensayo de invasión elegido consiste en una cámara provista de una membrana PET que contiene poros de 8 μm con una fina capa de Matrigel depositada de manera uniforme. El Matrigel simula la matriz extracelular y se trata de una mezcla proteica extraída del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) compuesta principalmente por laminina, colágeno IV, proteoglicanos heparán sulfato y entactina (Kleinman *et al.*, 1982). Esta matriz constituye una barrera para las células no invasivas, sin embargo, las células con cierta capacidad de invasión pueden atravesar los poros de la membrana, penetrar y hacerse paso por el Matrigel (Fig. 31). Las cámaras de invasión se depositan en placas de 6 pocillos para llevar a cabo el ensayo.

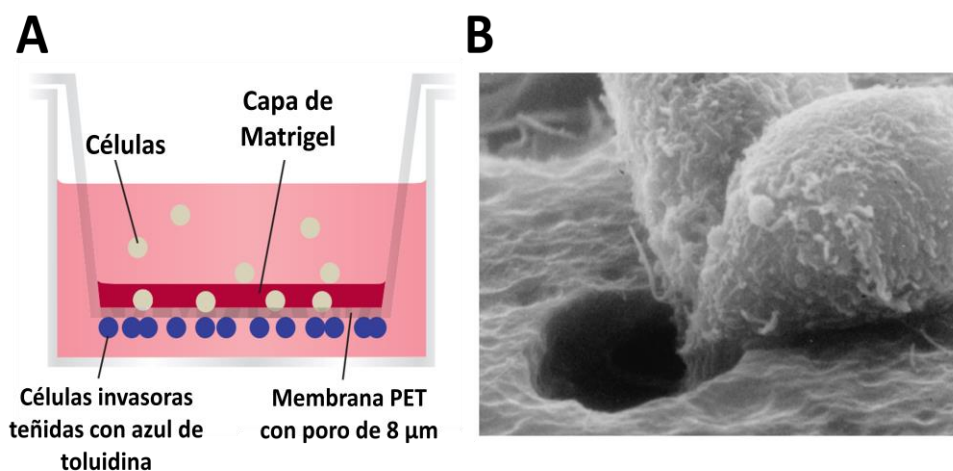


Figura 31. Invasión celular en cámaras de invasión con Matrigel. A. Esquema de una cámara de invasión en el que se destaca la membrana PET porosa y la capa de Matrigel (Figura modificada de Corning). B. Imagen de microscopía electrónica en la que se muestran células de fibrosarcoma humano (HT-1080) migrando a través de un poro de la membrana PET de la cámara de invasión (Imagen tomada de Corning).

En el ensayo se utilizaron cámaras de invasión BD BioCoat™ Matrigel™ (BD Biosciences, Bedford, UK). Las células HT29 fueron sembradas en la parte superior de la cámara de invasión. Se sembraron 1×10^6 células en medio DMEM sin FBS en cada cámara. En el pocillo se añadió medio DMEM completo conteniendo un 20 % de FBS. De esta forma, se establece un gradiente de FBS que funciona como un quimioatrayente para las células. Es decir, las células invaden desde la zona donde la concentración de FBS es menor hacia donde es mayor. La duración del ensayo fue de 48 h. Una vez transcurrido ese tiempo, las células fueron fijadas en metanol y teñidas con una solución de azul de toluidina 1 % DC. Las células son contadas por campo en un microscopio invertido Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Tokio, Japón) de un total de 5 campos por cámara de invasión.

1.10. Registros electrofisiológicos mediante la técnica de *patch-clamp* planar

La técnica de *patch-clamp* se utiliza para registrar las corrientes iónicas de una célula lo que permite estudiar los canales presentes en la misma. Tiene su origen en la técnica de fijación de voltaje (en inglés, *voltage-clamp*) que permitió estudiar los potenciales de acción de las células excitables. Se denominó fijación de voltaje debido a que permite fijar el potencial de membrana de una célula a un voltaje determinado (Hodgkin *et al.*, 1952). Inicialmente la fijación de voltaje se basaba en el uso de dos electrodos intracelulares, uno de ellos medía el potencial de membrana y el otro inyectaba corriente en la célula. Además, requería del uso de un amplificador que comparaba el potencial de membrana medido con el voltaje al cuál se desea mantener la célula. El circuito inyectaba en la célula una corriente igual, pero de sentido contrario a la corriente que circulaba a través de la membrana con el objetivo de llevar el potencial al valor deseado. Así, la técnica de fijación de voltaje nos permite entender cómo las corrientes iónicas que fluyen a través de la membrana determinan el potencial de membrana de la célula.

En la década de los 70, Neher y Sakmann desarrollaron la técnica de *patch-clamp* (Neher y Sakmann, 1976). Esta técnica utiliza tan solo un electrodo que se encuentra en el interior de una pipeta de vidrio con un diámetro de punta muy reducido. En este caso la punta de la pipeta se dirige hacia la célula que se desea registrar hasta que se pone en contacto con la misma y se aplica una pequeña succión para formar un sello de alta resistencia. A través del electrodo de la pipeta se inyecta la corriente necesaria para alcanzar el potencial deseado y se registran las corrientes que resultan del protocolo de estimulación aplicado mediante un amplificador electrónico conectado a la pipeta.

Más recientemente, ha surgido una variante de la técnica de *patch-clamp* denominada *patch-clamp* planar. Ésta se caracteriza porque en lugar de utilizar una pipeta como en la técnica convencional se usa un chip de borosilicato que presenta en su parte central un orificio de aproximadamente 1 μm de diámetro. Las células que se van a registrar se encuentran en

III. MATERIAL Y MÉTODOS

suspensión en lugar de encontrarse adheridas a la superficie (Fig. 32). El equipamiento tan solo consta de una pequeña unidad de registro que funciona como una caja de Faraday y sistema antivibratorio integrado en la que se inserta el chip, una unidad de succión, un amplificador y un software de registro. En este caso, los registros se llevaron a cabo con el sistema Port-a-pach (Nanion technologies, Munich, Alemania) (Fig. 33).

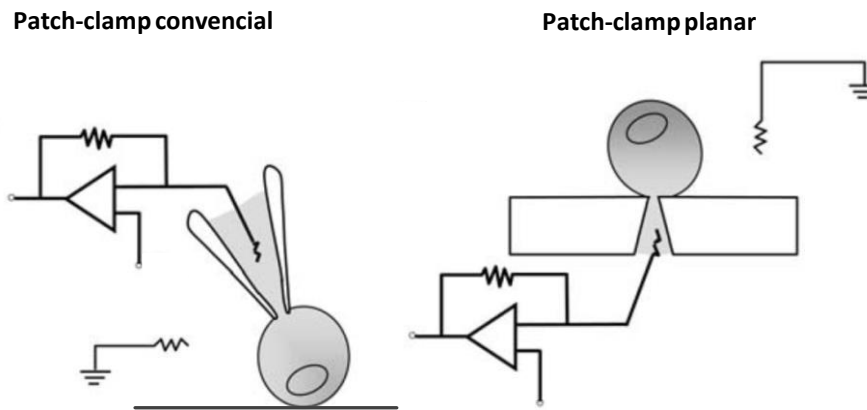


Figura 32. Diferencias entre el registro mediante *patch-clamp* convencional y planar. En el *patch-clamp* convencional se utiliza una pipeta que es dirigida hacia la célula que se desea registrar, la cual se encuentra adherida a una superficie. Sin embargo, en el *patch-clamp* planar, la célula en suspensión es atraída hacia un chip utilizando presión negativa. La figura fue modificada de Klemic *et al.*, 2005.



Figura 33. Equipamiento utilizado para registro electrofisiológico mediante la técnica de patch-clamp planar.

En la técnica de *patch-clamp* planar la solución interna de registro se deposita en la parte inferior del chip. Éste se inserta en la unidad de registro y se añaden las células contenidas en la solución externa en su parte superior. La unidad de succión aplica una presión

negativa hasta atrapar una célula en el orificio del chip. A continuación, el software permite regular la presión para conseguir un sello de alta resistencia dando lugar a la configuración *cell-attached*. Los registros realizados en este trabajo fueron llevados a cabo en la configuración *whole-cell*, la cual se alcanza aplicando una ligera succión una vez adquirida la configuración *cell-attached*. De esa forma, se rompe el parche de membrana comprendido en el orificio del chip permitiendo la entrada de la solución interna de registro en el interior de la célula (Fig. 34). Así, registramos la corriente que circula a través de la totalidad de la membrana celular. Además, los registros se realizaron en configuración *voltage-clamp*, es decir fijando el voltaje.

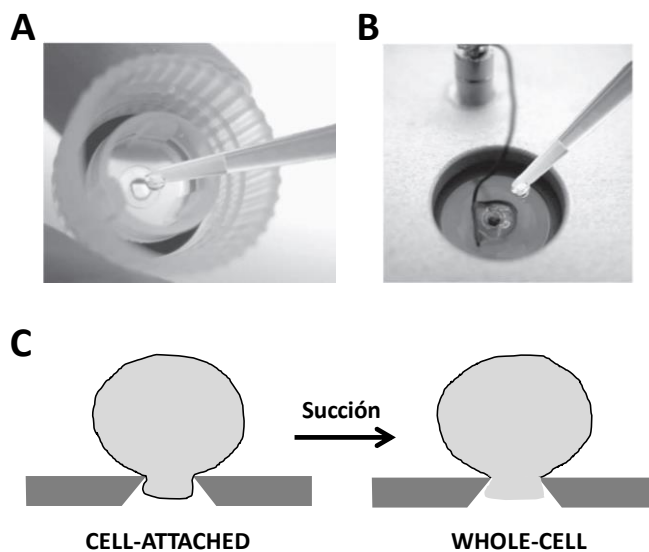


Figura 34. Pasos previos para el registro de *patch-clamp* planar en configuración *whole-cell*. A. Depósito de la solución interna en la parte inferior del chip. B. Adición de la suspensión celular en la parte superior del chip insertado en la unidad de registro. C. Una vez alcanzada la configuración de *cell-attached* se aplica una pequeña succión para obtener la configuración *whole-cell*. Las imágenes A y B fueron tomadas de Brüggemann *et al.*, 2008.

Para su registro las células NCM460 o HT29 fueron levantadas del frasco de cultivo mediante su incubación con Detachin a 37 °C y resuspendidas en la solución externa de registro alcanzando una densidad de $1 - 5 \times 10^6$ células/ml. La solución interna fue depositada en el interior de un chip NPC©1 de Nanion (Nanion technologies, Munich, Alemania) que presenta una resistencia de 2-3 M Ω . Una vez alcanzada la configuración *whole-cell* se midieron en cada registro la capacitancia de la célula y la resistencia en serie (<10 Ω). Estos parámetros fueron revisados continuamente para asegurarse de que no variaban considerablemente desde el inicio del registro. Si su variación era $\geq 10\%$ respecto de su valor inicial el experimento era descartado.

La I_{SOc} fue registrada utilizando una solución interna con 20 mM de EGTA para vaciar los depósitos. En otros experimentos, la I_{SOc} fue activada usando taspigargina 1 μ M o ATP 200

III. MATERIAL Y MÉTODOS

μM en la solución externa y una solución interna conteniendo EGTA 0,2 mM suplementada con un cóctel mitocondrial. El cóctel mitocondrial favorece la respiración de la mitocondria lo que produce una potenciación de la corriente obtenida con una concentración de EGTA baja (Gilbert y Parekh, 2000). Asimismo, se llevaron a cabo rampas de voltaje de -100 mV a +100 mV en 200 ms aplicadas cada 5 s desde un voltaje de mantenimiento de 0 mV. Las corrientes fueron adquiridas con un amplificador EPC-10 (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Alemania). El potencial de membrana en reposo fue estimado registrando el potencial de la célula inmediatamente después de la ruptura de la membrana en la configuración *current-clamp*. Las corrientes de fuga fueron eliminadas sustrayendo la media de las primeras 5 rampas de corriente obtenidas después de adquirir la configuración *whole-cell* a todas las corrientes siguientes. La corriente entrante fue medida a -80 mV y la corriente saliente, a +80 mV. Los resultados fueron normalizados respecto a la capacitancia de la célula. La diferencia de potencial de las soluciones externa e interna, así como las corrientes capacitativas fueron canceladas por el sistema de compensación automático del amplificador EPC-10. Además, los registros fueron filtrados a una frecuencia de 10 kHz y muestreados a 5 kHz.

Los resultados fueron analizados con el *software* Patchmaster (Nanion technologies, Munich, Alemania) y con el Origin7 (OriginLab, Northampton, MA).

1.11. Extracción de RNA, RT-PCR y qRT-PCR

La extracción de RNA se realizó mediante el método del fenol-cloroformo a partir de células sembradas en placas de cultivo de 10 cm de diámetro y cultivadas hasta alcanzar una densidad cercana a la confluencia. En el caso de las células NCM460, HT29 y A549 se sembraron aproximadamente 10^6 células/placa. Sin embargo, en el caso de las células hCASCs, 3×10^5 células/placa. La extracción fue llevada a cabo utilizando TRIzol y las células fueron levantadas de la placa con un *scraper*. El ARN fue separado con cloroformo, precipitado con isopropanol, lavado con etanol al 75% y disuelto en H_2O DEPC (dietilpirocarbonato) a 55-60 °C.

La calidad del ARN fue determinada en el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, MA) a través de la medida de densidad óptica (DO) a 260 y 280 nm y electroforesis en geles de agarosa. La cuantificación del RNA fue llevada a cabo, también, en el NanoDrop mediante la medida de la DO a 260 nm. La contaminación del ARN por DNA genómico fue descartada mediante electroforesis.

La transcripción reversa (RT; del inglés reverse transcription) consiste en transformar el RNA extraído en cDNA. Se realizó en un termociclador Tgradient (Biometra) utilizando el siguiente programa: 25 °C (600 s), 37 °C (7200 s) 85 °C (5s) y 4 °C (fin de la síntesis). La reacción tuvo lugar en presencia de transcriptasa reversa, tampón 10x, mezcla de dNTPs, cebadores al

azar 10x e inhibidor de RNAasa (incluidos en High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems) y H₂O grado PCR. Por cada reacción, se añadieron 10 µl de la mezcla anterior a 10 µl de muestra RNA (0,2 ó 0,8 µg/µl).

Para evidenciar la expresión de un determinado gen realizamos una PCR convencional. Esta PCR fue llevada a cabo preparando una solución *master mix* conteniendo una *Taq* DNA polimerasa (recombinante), tampón de reacción, CaCl₂, dNTPs y los cebadores específicos para el gen estudiado y H₂O con grado PCR. Se añadieron 23 µl de *master mix* a 2 µl de cDNA (0,2 ó 0,8 µg/µl) por reacción. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

	temperatura (°C)	tiempo (s)	nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94	180	1
Amplificación	94	60	35
	57	60	
	72	30	
Extensión final	72	600	1

El producto de la PCR fue identificado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % utilizando Redsafe o bromuro de etidio. El cDNA fue cargado en el gel con tampón de carga 6x. El gel fue sometido a 100 mV durante aproximadamente 1 h. Las imágenes de las correspondientes bandas en el gel fueron tomadas en un equipo GelDoc XR system (Bio-Rad, Hercules, CA) con luz UV.

Para determinar los niveles de expresión de un determinado gen llevamos a cabo una PCR cuantitativa (qPCR). La qPCR fue llevada a cabo en un equipo LightCycler 480 (Roche, Mannheim, Alemania) que requiere placas de 96 pocillos. Las amplificaciones fueron realizadas en un volumen final de 20 µl, 1µl de muestra y 19 µl de solución *master mix*. La *master mix* contenía KAPA SYBR FAST qPCR Kit, los cebadores directo y reverso y H₂O grado PCR. Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes:

	temperatura (°C)	tiempo (s)	nº de ciclos
Pre-incubación	95	300	1
Amplificación	95	15	45
	60 ó 57 (*)	20	
	72	5	
Curva de Melting	95	5	1
	55	60	
	95	---	
Cooling	40	10	1

(*) 60 °C para la β-actina y *TRPC1* y 57 °C para el resto de genes.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

La cuantificación de la expresión del gen deseado es posible gracias al SYBR Green I contenido en el kit de qPCR KAPA SYBR FAST, un fluoróforo que al unirse al DNA de doble cadena aumenta considerablemente la emisión de fluorescencia comprendida entre 465 y 510 nm que es detectada, posteriormente, por el equipo. Así, a medida que avanza el proceso de amplificación durante la qPCR aumenta la emisión de fluorescencia. El número de copias sintetizadas durante la reacción, y por tanto la fluorescencia, es directamente proporcional al mRNA de partida del gen diana y al cDNA obtenido a partir de éste. También, es indirectamente proporcional al valor Ct, que se define como el número de ciclos de reacción necesarios para producir un aumento significativo de la fluorescencia respecto a la señal basal. Para determinar que este aumento es significativo, el equipo establece un umbral de fluorescencia. Por tanto, cuanto mayor sea la expresión del gen diana, mayor será el número de copias amplificadas durante la qPCR, así como la cantidad de fluorescencia emitida por el SYBR Green I, y menor, el valor Ct (Fig. 35).

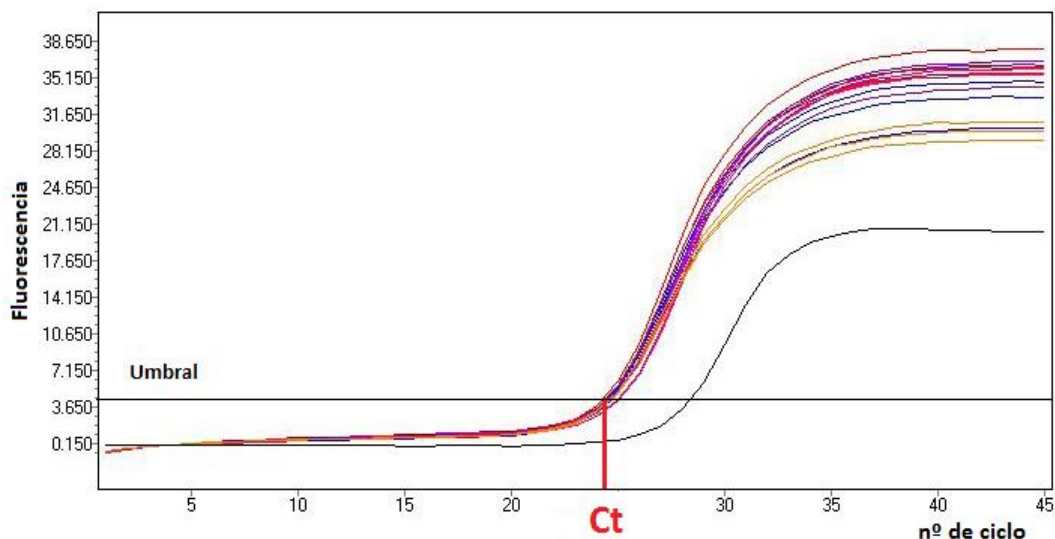


Figura 35. Variación de la fluorescencia respecto al ciclo de reacción. A medida que aumenta el número de ciclos se incrementa el número de copias del cDNA sintetizadas y con él la fluorescencia. En la figura aparece el umbral a partir del cual el cambio en la fluorescencia es significativo respecto a la línea base y, también, aparece señalado el valor Ct.

En este estudio realizamos una cuantificación relativa utilizando como control endógeno la β -actina, ya que su expresión en las células NCM460 y HT29 no varía. El control endógeno permite cuantificar la expresión del gen diana en el caso de que las concentraciones de cDNA de las muestras a comparar no sean exactamente las mismas. Para normalizar los valores de expresión de cada gen diana frente al control endógeno calculamos $2^{-\Delta Ct}$ para cada muestra donde $\Delta Ct = Ct_{\text{diana}} - Ct_{\beta\text{-actina}}$. De este modo, llevamos a cabo una cuantificación relativa frente al control endógeno. Si lo que queremos es llevar a cabo la cuantificación relativa de cada gen objeto de estudio en las células HT29 respecto a las células NCM460 hallamos $2^{-\Delta\Delta Ct}$ donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{HT29}} - \Delta Ct_{\text{NCM460}}$.

Cuando se realiza una qPCR utilizando SYBR Green I es necesario comprobar si los cebadores se unen específicamente a las regiones deseadas de cDNA, dado que éste se une sin más al DNA de doble cadena. Para ello, el equipo LightCycler 480 nos permite llevar a cabo una curva de *melting* para cada una de las muestras. Así, se representa la derivada de la fluorescencia respecto al tiempo con signo negativo a distintas temperaturas. Lo ideal es la obtención de un único pico de *melting*, que indica la presencia de un solo amplicón. Por el contrario, si apareciera más de un pico en esta representación indicaría que los cebadores se unen a regiones del cDNA de forma no específica. Este hecho podría ser debido, también, a la formación de dímeros o estructuras secundarias por parte de los cebadores. En estos casos, deberíamos ajustar la temperatura de anillamiento de los cebadores o, si fuera necesario, incluso, diseñarlos de nuevo. Así, todas las qPCRs presentadas en el estudio mostraron un único pico de *melting*.

1.12. Extracción de proteínas y *Western-blotting*

El estudio de la expresión de proteínas se llevó a cabo mediante la técnica *western-blotting* por la que las proteínas son separadas realizando una electroforesis SDS-PAGE y puestas de manifiesto con anticuerpos específicos.

Las proteínas fueron extraídas a partir de placas de cultivo de 10 cm de diámetro en las que se sembraron aproximadamente 10^6 células NCM460 o HT29 y fueron cultivadas hasta acercarse a la confluencia. Para ello, se añadieron a cada placa 3 ml de una solución que contiene RIPA, pepstatina, PMSF y un cóctel de inhibidores de proteasas y las células fueron levantadas con un *scraper*. Las proteínas fueron cuantificadas mediante el método de Bradford.

Para realizar el *western-blotting* las muestras de proteínas fueron mezcladas con tampón de carga 2x a partes iguales y se incubaron a 100 °C para romper los puentes disulfuro y desnaturalizar las proteínas. La separación de las proteínas fue llevada a cabo mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) al 8 ó 10 % dependiendo del peso molecular de la proteína objeto de estudio. A continuación, las proteínas fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Tanto la electroforesis como la transferencia fueron realizadas utilizando el sistema Bio-Rad (Hercules, CA). Una vez finalizada la transferencia, la membrana fue incubada durante 1 h con una solución de bloqueo conteniendo 5% leche en polvo desnatada diluida en solución de lavado TTBS (Tween20-TBS). Seguidamente, se realizaron tres lavados de 10 min con TTBS a temperatura ambiente y, posteriormente, la membrana fue incubada durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario obtenido en ratón o en conejo, el cual se une específicamente a la proteína diana. Al día siguiente, la membrana fue lavada, de nuevo, con TTBS e incubada durante 1 h con un anticuerpo secundario conjugado con la

peroxidasa de rábano. En el caso de las membranas incubadas con el anticuerpo primario obtenido en ratón se utilizó un anticuerpo secundario conejo anti-ratón y para las incubadas con el anticuerpo primario de conejo se usó un anticuerpo secundario cabra-anti-conejo.

Las bandas de proteína de interés se pusieron de manifiesto con la mezcla de dos sustratos ECL mediante quimioluminiscencia y la detección de éstas fue llevada a cabo en un equipo VersaDoc 4000 (Bio-Rad, Hercules, CA). La cantidad de proteína fue determinada mediante el análisis de densitometría de las bandas utilizando el software Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA). La proteína β -actina fue utilizada como control de carga. Los resultados de expresión de las proteínas estudiadas fueron normalizados respecto a ésta.

En alguna ocasión, las membranas se incubaron más de una vez con distintos anticuerpos primarios por lo que fue necesario realizar *stripping*. Esta técnica consistió en incubar las membranas durante 40 min con la solución de *stripping*. A continuación, se llevaron a cabo tres lavados de 5 min. Tras los cuales, tuvo lugar el bloqueo y los pasos siguientes fueron los mismos descritos anteriormente.

1.13. Silenciamiento génico con siRNA

La técnica de silenciamiento génico consiste en la reducción de la expresión de un determinado gen a nivel transcripcional o traduccional. Una de las formas de silenciamiento génico más utilizadas es la del uso del RNA pequeño de interferencia (siRNA; del inglés *small interfering RNA*). El siRNA consiste en una molécula de RNA de doble cadena con una longitud aproximada de 21-25 pares de bases. Este tipo de RNA actúa a nivel postranscripcional mediante la degradación del mRNA lo que impide su traducción a proteína. En particular, el siRNA se une al complejo RISC (RNA-induced silencing complex), el cual selecciona la cadena antisentido para que hibride de manera específica con el mRNA diana. A continuación, el mRNA diana hibridado es degradado por acción de la actividad endonucleasa del complejo RISC (Agrawal *et al.*, 2003; Filipowicz *et al.*, 2005).

La introducción del siRNA en células NCM460 y HT29 fue llevada a cabo mediante nucleofección. Por cada nucleofección se transfectaron 1×10^6 células y se añadieron 5 μ l de siRNA 10 μ M (50 pmol de siRNA). Los experimentos de imagen o electrofisiológicos se realizaron 48 h después de la nucleofección con el siRNA. Como control del silenciamiento específico de un gen se utilizó siRNA control, el cual no se une a ningún gen conocido. La efectividad de cada silenciamiento fue comprobada mediante qRT-PCR.

1.14. Análisis estadístico

La comparación de 2 medias fue llevada a cabo utilizando el test *t* de *Student* y las diferencias fueron consideradas significativas cuando resultó un valor $p < 0,05$. Por otro lado, la significación estadística de la correlación entre dos variables fue comprobada mediante el análisis de varianza ANOVA de la regresión lineal. La correlación fue considerada estadísticamente significativa cuando $p < 0,05$.

2. Materiales

2.1. Líneas celulares

Las células NCM460 y NCM356 fueron obtenidas a partir de un acuerdo de transferencia con INCELL Corporation (San Antonio, TX). Las células HT29 fueron amablemente cedidas por el Dr. J.C. Fernández Checa (CSIC, Barcelona, España). Las células SW480-ADH y SW480-R fueron donadas por el Dr. A. Muñoz (CSIC, Madrid, España). Las células A549 fueron cedidas por el Dr. C.M. Galmarini (PharmaMar S.A., Colmenar Viejo, Madrid, Spain). Las células de arteria coronaria de músculo liso humanas (hCASMCs) fueron suministradas por LONZA (Basilea, Suiza).

2.2. Medios, reactivos y materiales de cultivo celular

Los medios de cultivo DMEM con glucosa 1 g/l y RPMI1640 y SMCultureKit, el FBS, los antibióticos (Penicilina/Estreptomina), L-glutamina, el PBS y la tripsina-EDTA fueron suministrados por LONZA (Verbiers, Bélgica). El Detachin procede de Gelantis (San Diego, CA). La poli-L-lisina y los cubreobjetos de 12 mm de diámetro son de Marlenfeld GmbH (Lauda-Königshofen, Alemania). Los frascos de cultivo de 25 cm² y las placas de cultivo de 4 y 6 pocillos proceden de NUNC (Thermo Scientific, Waltham, MA). Los frascos de cultivo de 75 cm², las placas cultivo de 10 cm de diámetro, así como los *scrapers* son de Corning (Corning, NY). Las placas de cultivo con fondo de cristal utilizadas para microscopía confocal son de MaTtek Corporation (Ashland, MA).

2.3. Sondas y colorantes

Las sondas de Ca²⁺ fura-2/AM, fura-4F/AM y fluo-4/AM, y el TMRM utilizado para la estimación del potencial mitocondrial, así como las celenterazinas fueron obtenidos de Invitrogen (Eugene, OR). El plásmido GFP-AEQmit para monitorización de la [Ca²⁺]_{mit} fue donado por el Dr. P. Brulet (Instituto Pasteur, Gif-sur-Yvette, París). El azul de tripano

III. MATERIAL Y MÉTODOS

utilizado para determinar la viabilidad celular procede de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El azul de toluidina 1% DC es de (Panreac, Barcelona, España).

2.4. Agonistas, antagonistas, inhibidores y otros compuestos

El ATP, el carbacol, el ácido ciclopiazónico, la ionomicina y la digitonina son de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). La tapsigargina fue obtenida de Alomone Labs (Jerusalén, Israel). El IP₃ enjaulado fue suministrado por Sichem GmbH (Bremen, Germany). El 2-APB es de Calbiochem (San Diego, CA).

2.5. siRNAs

Los siRNAs Control, ORAI1, ORAI2, ORAI3, TRPC1, STIM1 y STIM2 proceden de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg, Alemania).

2.6. Soluciones y materiales de nucleofección

Solución A: KH₂PO₄ 88 mM, NaHCO₃ 14 mM, D-glucosa 2 mM.

Solución B: ATP 0,36 M, MgCl 0,6 M.

Las cubetas de nucleofección fueron suministradas por Scarab Genomics (Madison, WI).

2.7. Medios de imagen

Medio externo completo (MEC): NaCl 145 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, D-glucosa 10 mM, HEPES 10 mM, pH 7,42.

MEC libre de Ca²⁺: NaCl 145 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 0,5 mM, D-glucosa 10 mM, HEPES 10 mM, pH 7,42.

Medio interno: KCl 130 mM, MgCl₂ 2 mM, succinato sódico 5 mM, HEPES 20 Mm, NaCl 5 mM, KH₂PO₄ 2 mM, EGTA-Tris 0,45 M, H-EDTA-Na 0,1 M en Tris 1 M, ATP 1 mM, pH 6,8.

2.8. Soluciones de electrofisiología

Solución externa: NaCl 145 mM, KCl 2,8 mM, MgCl₂ 2mM, CaCl₂ 10mM, HEPES 10 mM, D-glucosa 10 mM, pH 7,4.

Solución interna: CsCl 50 mM, CsF 60 mM, NaCl 10 mM, EGTA 20 mM, HEPES 10 mM, Na⁺-ATP 2 mM, pH 7,72 (ajustado con CsOH).

Cóctel mitocondrial: Ácido pirúvico 2 mM, ácido málico 2 mM, NaH₂PO₄ 1 mM.

2.9. Soluciones y reactivos para ensayo de muerte

Tampón de unión 10x: HEPES 0,1 M pH 7,4, NaCl 1,4 M, CaCl₂ 25 mM.

El marcador anexina V-FITC es de BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ) y el yoduro de propidio, de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

2.10. Reactivos y materiales de PCR

El TRIzol y el H₂O DEPC son de Invitrogen (Carlsbad, CA), el cloroformo, de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) y el isopropanol, de Merck (Darmstadt, Alemania). El kit de transcripción reversa High Capacity cDNA Reverse Transcription fue obtenido de Applied Biosystems (Foster city, CA). La *Taq* DNA polimerasa recombinante, el tampón de reacción, el CaCl₂, los dNTPs, el tampón de carga 6x y la DNA *ladder* usados en la PCR convencional son de Fermentas (Thermo Scientific, Waltham, MA). El Redsafe es de iNtRON Biotechnology, (Kyungki-Do, Korea) y el bromuro de etidio, de Fluka (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). El kit utilizado en la qPCR KAPA SYBR FAST qPCR Kit es de Kapa Biosystems (Boston, MA). El H₂O grado PCR es de Ambion (Austin, TX).

Los cebadores utilizados se detallan en la siguiente tabla:

Gen	Cebadores (5'→3')	Tamaño de amplicón (pb)
<i>TRPC1</i>	F: TACTTGCACAAGCCCGGAAT R: ACCCGACATCTGTCCAAACC	209
<i>TRPC3</i>	F: TGTTC AATGCCTCAGACAGG R: AGTGTC ACTTCACTGAGGTC	343
<i>TRPC4</i>	F: GCTGCTGGCATCTCGCTGGT R: TGAAGCCCAGGACCCACGGT	317
<i>TRPC5</i>	F: AACTCCCTCTACCTGGCAACTA R: GGATATGAGACGCAACGAACTT	159
<i>TRPC6</i>	F: CAAGTCCGGCTTACCTGTCA R: TCACCACTCTGGAGCGTTTC	229

La tabla continúa en la siguiente página.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Gen	Cebadores (5'→3')	Tamaño de amplicón (pb)
<i>TRPC7</i>	F: GTCCGAATGCAAGGAAATCT R: TGGGTTGTATTTGGCACCTC	478
<i>TRPV4</i>	F: GGGTGGATGAGGTGAACTGG R: GTCCGGGTTGAGTTCTTGT3	182
<i>TRPV6</i>	F: CTGGCTCTGCCAAGTGTAAC R: GAGGAGACTCCCAGATCCTCTT	364
<i>TRPM8</i>	F: GATTCCAAGGCCACGGAGAA R: GGAAGTGCAGATGTAGATGA	345
<i>ORAI1</i>	F: AGCAACGTGCACAAATCTCAA R: GTCTTATGGCTAACCAGTGA	344
<i>ORAI2</i>	F: CGGCCATAAGGGCATGGATT R: TTGTGGATGTTGCTCACGGC	333
<i>ORAI3</i>	F: CTCTCCTTGCTGAAGTTGT R: CGATTCAGTTCCTCTAGTTC	380
<i>STIM1</i>	F: AGGGTACTGAGAATGAGCGGA R: CACAGAGGATCTCGATCTGT	399
<i>STIM2</i>	F: TGCTACTGAGTCCACCATGC R: GGGCGTGTAGAGGTCCAAA	469
<i>MCU</i>	F: TCCTGGCAGAATTTGGGAGC R: GGTGGTCGTACGTGGTATGT	320
<i>MICU1</i>	F: CTCGCAGCCTCCCTAAGATG R: GGAGACAGGGAACTTTGGGG	215
β -actin	F: TACGCCAACACAGTGCTGTCTGG R: TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT	206

F: Cebador directo. R: Cebador reverso.

Los cebadores de Orai1, Orai2 y Orai3 fueron tomados de Takahashi *et al.*, 2007a, de STIM1, de Takahashi *et al.*, 2007b y de TRPC7, de Beck *et al.*, 2006. Los cebadores de la β -actina fueron modificados de Wang *et al.*, 2000. El resto fueron diseñados utilizando el *software* Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012). La mayoría de los cebadores están diseñados en distintos exones dentro del gen diana como control de contaminación por DNA genómico.

2.11. Soluciones, reactivos y anticuerpos para western blotting

Tampón de muestra 2x: Tris-HCl pH6,8 62,5 mM, SDS 2%, glicerol 10%, 2-Mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0,05%.

Tampón de electroforesis 10x: Trizma base 0,25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,3.

Tampón de transferencia (tris-glicina-metanol): Trizma base 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%, pH 8,3.

TBS 10x: Tris-HCl 25 mM y NaCl 0,9%, pH 7,5.

TTBS: Tris-HCl 2,5 mM y NaCl 0,09%, Tween20 0,1 %.

SDS-PAGE: Bis/Acrilamida 8 ó 10%, Tris HCl 375 mM pH 8,9, SDS 0,1%, APS 0,05% y TEMED.

Solución de *stripping*: Tris-HCl 62,5 mM, SDS 2 %, 2-mercaptoetanol 100 mM.

La Bis/Acrilamida 30% es de (Bio-Rad Hercules, CA). La membrana de PVDF es de Millipore (Bedford, MA). El RIPA y los sustratos ECL son de Thermo Scientific (Waltham, MA). La pepstatina, el PMSF, el cóctel inhibidor de proteasas y el Tween20 son de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El APS y el TEMED son de Fluka (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes:

Anticuerpos primarios	Tipo	Dilución	Casa comercial
Conejo anti-ORAI1	Policlonal	1:200	Alomone-Labs
Conejo anti-ORAI2	Policlonal	1:200	Alomone-Labs
Conejo anti-ORAI3	Policlonal	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Conejo anti-TRPC1	Policlonal	1:200	Alomone-Labs
Ratón anti-TRPC4	Policlonal	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Conejo anti-STIM1	Policlonal	1:200	Alomone-Labs
Conejo anti-STIM2	Monoclonal	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Ratón anti- β -actina	Monoclonal	1:5000	ABcam

El anticuerpo secundario conejo anti-ratón IgG (ABcam, Cambridge, UK) fue utilizado a una dilución 1:1000 en el caso de STIM2 y a 1:10000 para la β -actina. Por otra parte, el anticuerpo secundario cabra anti-conejo IgG (Alomone labs, Jerusalén, Israel) fue usado a una dilución 1:1000 para poner de manifiesto el resto de proteínas estudiadas.

Tanto los anticuerpos primarios como los secundarios fueron diluidos en una solución TTBS con BSA 0,5 %.

2.12. Reactivos de las soluciones

NaCl, NaOH, CaCl₂, KCl, MgCl₂ 6 H₂O, CaCl₂, NaH₂PO₄, NaHCO₃, D-glucosa son de Merck (Darmstadt, Alemania). HEPES, HCl, metanol, 2-mercaptoetanol, glicina, SDS, succinato sódico, ácido pirúvico, ácido málico, LaCl₃, BaCl₂ 2H₂O, EGTA, EDTA, azul de bromofenol, glicerol y N-metil D-glucamina fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). CsCl y CsF son de Fisher Scientific (Loughborough, UK).

IV. RESULTADOS

1. Remodelado del Ca^{2+} intracelular en células de carcinoma de colon y sus posibles consecuencias funcionales

1.1. Las células tumorales de colon humano presentan mayor proliferación y entrada capacitativa de Ca^{2+} que las células normales

En primer lugar para comenzar con el estudio del remodelado del transporte de Ca^{2+} en el cáncer de colon nos propusimos comparar la ECC en una serie de líneas celulares de colon humano. Como modelo de colonocitos normales utilizamos células NCM460 y NCM356, mientras que como modelo de adenocarcinoma de colon usamos células SW480-ADH, SW480-R y HT29. Para el estudio de la ECC llevamos a cabo experimentos de imagen de fluorescencia en célula única con la sonda fura-2/AM que nos permite registrar la $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Previamente, tratamos las células con tapsigargina 1 μM en medio libre de Ca^{2+} durante 10 minutos para vaciar los depósitos de Ca^{2+} . Comenzamos cada experimento en medio libre de Ca^{2+} y, a continuación, perfundimos medio con Ca^{2+} 1 mM lo que va a inducir una entrada de Ca^{2+} en el interior de la célula. Este procedimiento nos permite monitorizar la ECC máxima, ya que los depósitos de Ca^{2+} son vaciados por completo (Fig. 36A y 36B). Así, observamos que la ECC es mayor en las líneas celulares tumorales de colon que en las normales. La ECC de cada una de las líneas celulares tumorales está aumentada de modo significativo al compararla con la de cualquiera de las líneas de colonocitos normales.

Puesto que se ha descrito que la ECC participa en la proliferación celular, el siguiente paso fue comparar la proliferación de las líneas celulares estudiadas. Para ello, llevamos a cabo un estudio para determinar el número de divisiones celulares que se producen en 72 horas de cultivo. Este experimento, además, permite validar nuestro modelo, ya que comprobamos que las células tumorales de colon se dividen más que las células normales. La proliferación de cada una de las líneas celulares de adenocarcinoma de colon es superior de forma estadísticamente significativa a las células normales NCM460, pero no a las células NCM356 (Fig. 37). Esta última línea celular presenta una proliferación intermedia entre las células NCM460 y las células tumorales pudiendo no ser un buen modelo de células normales como, de hecho, ha sido descrito.

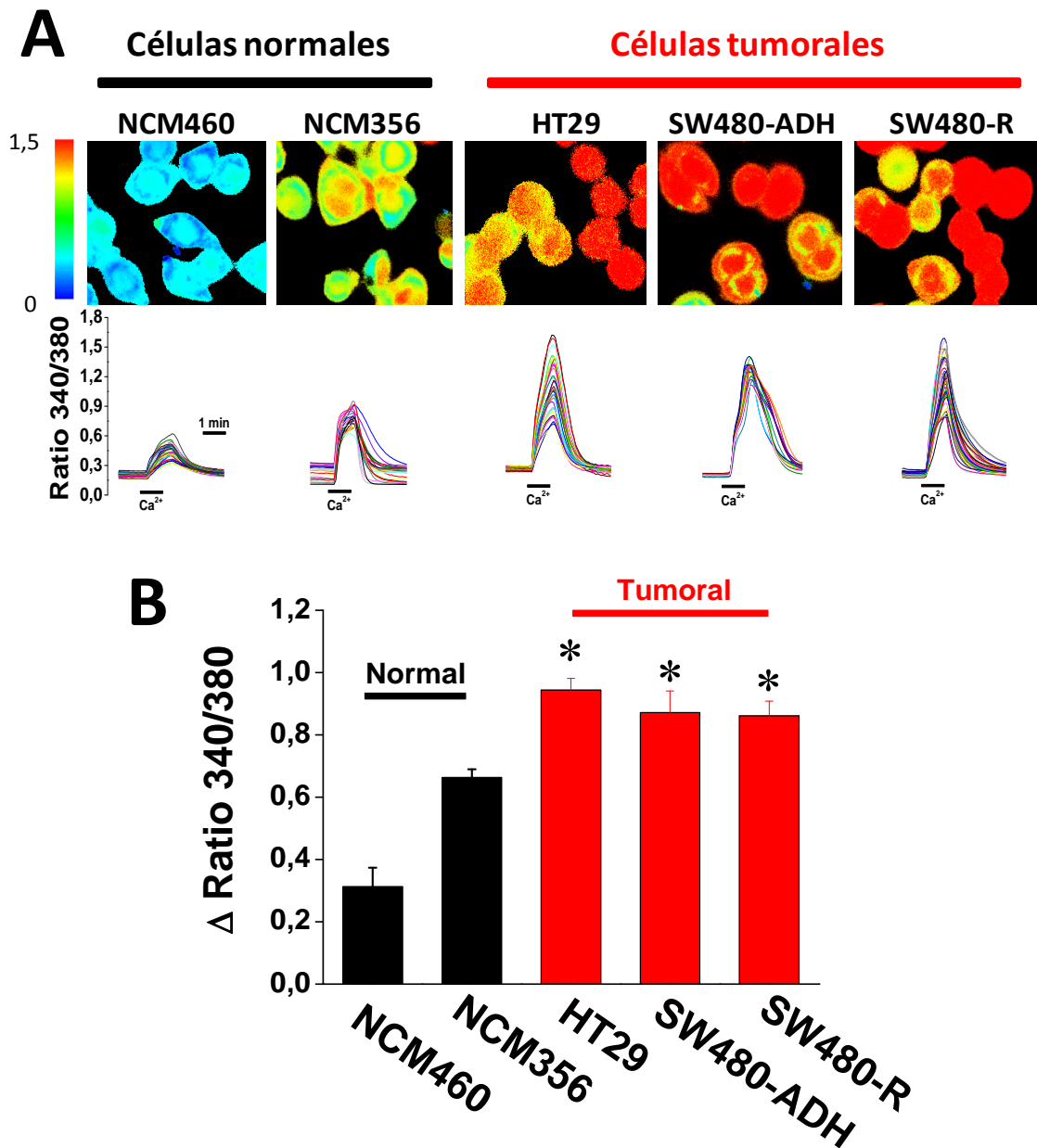


Figura 36. Comparación de la ECC entre células normales y tumorales de colon humano. La ECC fue registrada mediante imagen de fluorescencia en células cargadas con fura-2/AM y tratadas con tapsigargina $1\mu\text{M}$ durante 10 min en medio libre de Ca^{2+} . A. En la parte superior, se muestran imágenes de Ca^{2+} codificadas en pseudocolor. Los trazados incluidos en la parte inferior son registros del ratio de fluorescencia excitando a 340 y 380 nm, indicativo de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ correspondientes a células individuales. B. Valores medios del incremento de ECC de cada una de las líneas celulares estudiadas. Las barras muestran la media \pm EEM de los incrementos del ratio de fluorescencia 340/380 de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$).

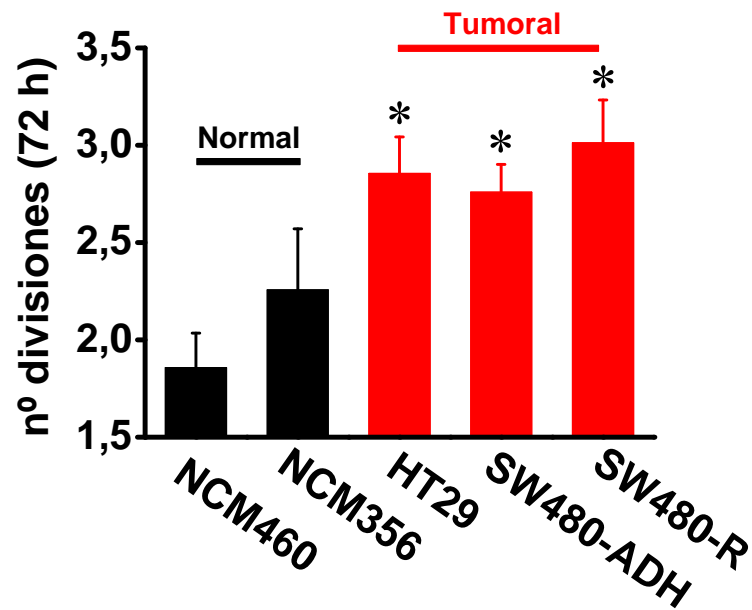


Figura 37. Proliferación de células normales y tumorales de colon humano. La proliferación fue cuantificada como el número de divisiones que tienen lugar en 72 horas de cultivo. Las barras muestran la media \pm EEM del número de divisiones de tres experimentos independientes. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al comparar las células NCM460 con cada una de las líneas de adenocarcinoma de colon (* $p < 0,05$).

Una vez que hemos cuantificado la ECC y la proliferación de cada una de las líneas celulares utilizadas en nuestro modelo, nos preguntamos si existe una correlación entre ambas variables. Para ello, realizamos una regresión lineal mostrando que existe una fuerte correlación entre la ECC y la proliferación de todas las líneas celulares estudiadas ($R = 0,948$) (Fig. 38). Además, comprobamos que la relación positiva entre ambas variables es estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Por tanto, la proliferación celular aumenta de manera directamente proporcional con la ECC. Este resultado sugiere que el incremento de la ECC en las células tumorales con respecto a las normales podría contribuir al aumento de la tasa de proliferación.

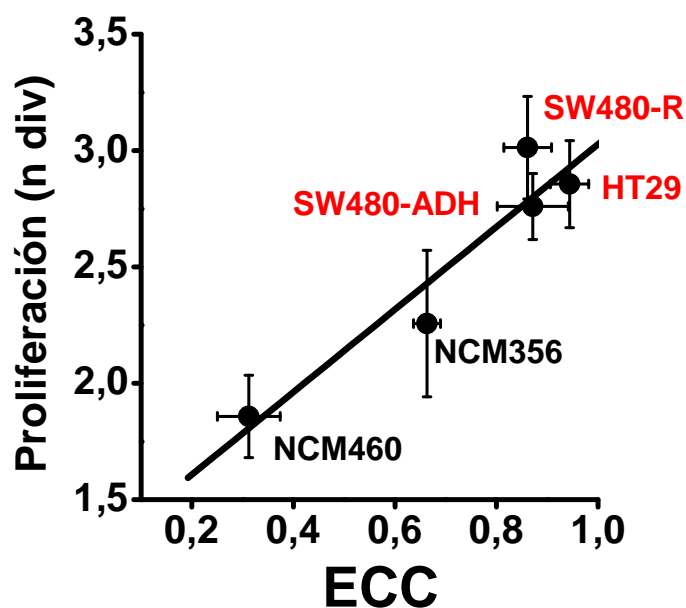


Figura 38. Correlación lineal entre la proliferación y la ECC de las distintas líneas celulares utilizadas. Representación de la media \pm EEM del número de divisiones celulares en 72 horas de cultivo frente a la media \pm EEM del incremento del ratio 340/380.

1.2. La invasión de las células de adenocarcinoma de colon está regulada por la entrada capacitativa de Ca^{2+}

Se ha descrito que la ECC puede estar implicada en la migración e invasión de distintas células tumorales. Por tanto, nos propusimos estudiar si la ECC regula la invasión de las células tumorales de colon utilizadas en nuestro modelo. Con este propósito estudiamos el efecto del antagonista de la ECC 2APB sobre la capacidad de invasión de las células tumorales mediante un ensayo utilizando cámaras de invasión formadas por pocillos perforados con una capa de Matrigel situada en el fondo. Las células con capacidad de invasión deben desplazarse desde la parte superior a la parte inferior de la cámara atravesando, para ello, la capa de Matrigel que consiste en una matriz proteica (Fig. 39A). El 2APB reduce el porcentaje de invasión de las células tumorales lo que indica que la ECC participa en la invasión de las células HT29 (Fig. 39B).

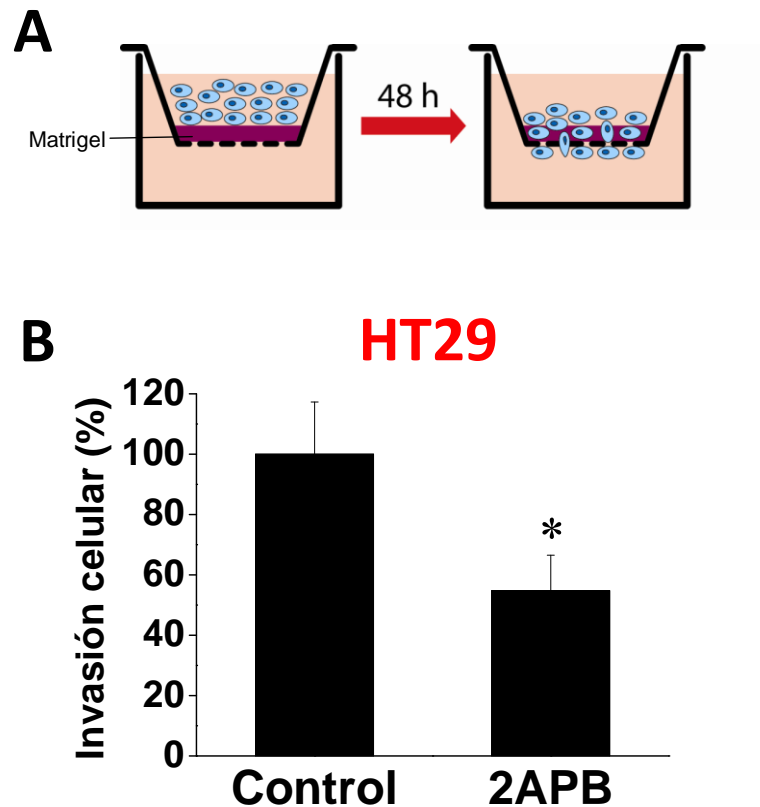


Figura 39. El 2APB inhibe la invasión de células de adenocarcinoma de colon (HT29). El ensayo se lleva cabo en una cámara de invasión con células HT29 en presencia o ausencia de 2APB 100 μ M. Las células se fijan y se tiñen con azul de toluidina 1%. A. En la imagen se ilustra cómo las células invaden desde la parte superior a la inferior de un pocillo perforado con Matrigel. La duración del experimento es de 48 h. Las células siguen un gradiente de FBS. B. Las barras muestran la media \pm EEM de células que invaden en presencia o ausencia de 2APB normalizada frente al control y expresada en porcentaje (n=3, *p<0,05).

1.3. Liberación y entrada de Ca^{2+} inducida por agonistas fisiológicos en células normales y tumorales de colon

Una vez estudiada la ECC inducida por tapsigargina nos planteamos comparar esta vía de entrada de Ca^{2+} en células normales y tumorales de colon de una manera más fisiológica. Así, decidimos estudiar la entrada de Ca^{2+} inducida por agonistas fisiológicos que provocan la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares. Con este fin y para el resto de experimentos, utilizamos como modelo de colonocitos normales a las células NCM460, ya que es la línea celular que menor ECC y proliferación presenta y que mejor ha sido caracterizada como célula normal de epitelio de colon humano. Por otra parte, como modelo de adenocarcinoma de colon se utilizaron las células HT29, la cual es una línea ampliamente usada en diferentes estudios.

IV. RESULTADOS

La figura 40 muestra que el ATP en medio externo con Ca^{2+} 1 mM provoca un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ tanto en las células normales como en las tumorales. Sin embargo, el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ es bastante más elevado y mantenido en las células tumorales que en las normales. Este incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se debe, en una primera fase, a la liberación de este ión desde los depósitos a través de los receptores de IP_3 activados tras la unión del agonista a los receptores purinérgicos. En una segunda fase, el vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} conlleva la activación de la ECC, lo que va a provocar una entrada mantenida de Ca^{2+} . El decaimiento del incremento de Ca^{2+} que tiene lugar en la segunda fase del registro es mucho más rápido en las células normales que en las células tumorales. Este hecho podría ser debido a que la entrada de Ca^{2+} inducida tras la liberación con ATP en las células normales es notablemente menor que en las células tumorales.

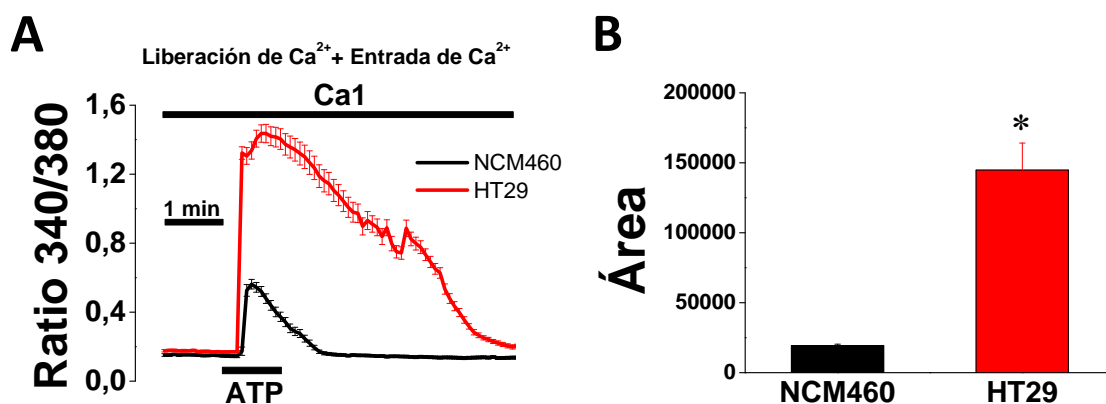


Figura 40. El ATP induce un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ mayor en las células tumorales (HT29) que en las células normales (NCM460) de colon. Los experimentos tienen lugar en medio con Ca^{2+} 1 mM (Ca^{2+}). El incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se induce utilizando ATP 200 μM . A. Registros representativos del ratio de fluorescencia 340/380 de células NCM460 y HT29. Cada trazo es la media \pm EEM de los registros de 19-23 células individuales. B. Área bajo la curva de registros de Ca^{2+} citosólico de células normales y tumorales. Las barras muestran la media \pm EEM del área de los registros de fluorescencia de 4 experimentos independientes (* $p < 0,05$).

Posteriormente, nos propusimos estudiar por separado la liberación de Ca^{2+} inducida por agonistas fisiológicos y la subsecuente entrada de Ca^{2+} (ECC) activada tras el vaciamiento de los depósitos en células normales y tumorales de colon. Para este cometido, utilizamos dos agonistas fisiológicos, ATP y carbacol. Ambos agonistas son perfundidos en medio libre de Ca^{2+} (Fig. 41). De esta forma, provocan un primer incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ debido a la liberación de Ca^{2+} del RE al unirse el agonista a receptores de la membrana plasmática acoplados a proteínas G. En el caso del ATP estos receptores son los purinérgicos P_2Y , mientras que para el carbacol son los receptores muscarínicos. Tras el estímulo con el agonista y la liberación de Ca^{2+} se perfunde medio libre de agonista para retirar el estímulo y, a continuación con medio Ca^{2+} 1 mM lo que permite evidenciar la ECC. De esta forma, observamos que la liberación de Ca^{2+}

inducida por ATP es aparentemente mayor en las células tumorales que en las normales (Fig. 41A y C). El mismo resultado se obtiene, también, con carbacol (Fig. 41B y D). Además, sorprendentemente, se observa que los agonistas solo inducen ECC en el caso de las células tumorales, pero no en las células normales (Fig. 41A-D). Esto sugiere que en condiciones similares a las fisiológicas no se induce ECC en las células normales, al menos en el epitelio de colon. Por tanto, en la figura 40 el incremento de Ca^{2+} inducido por el ATP en medio con Ca^{2+} 1 mM en las células normales se debe, exclusivamente, a la liberación de Ca^{2+} , y en las células tumorales, tanto a la liberación de Ca^{2+} como a la ECC.

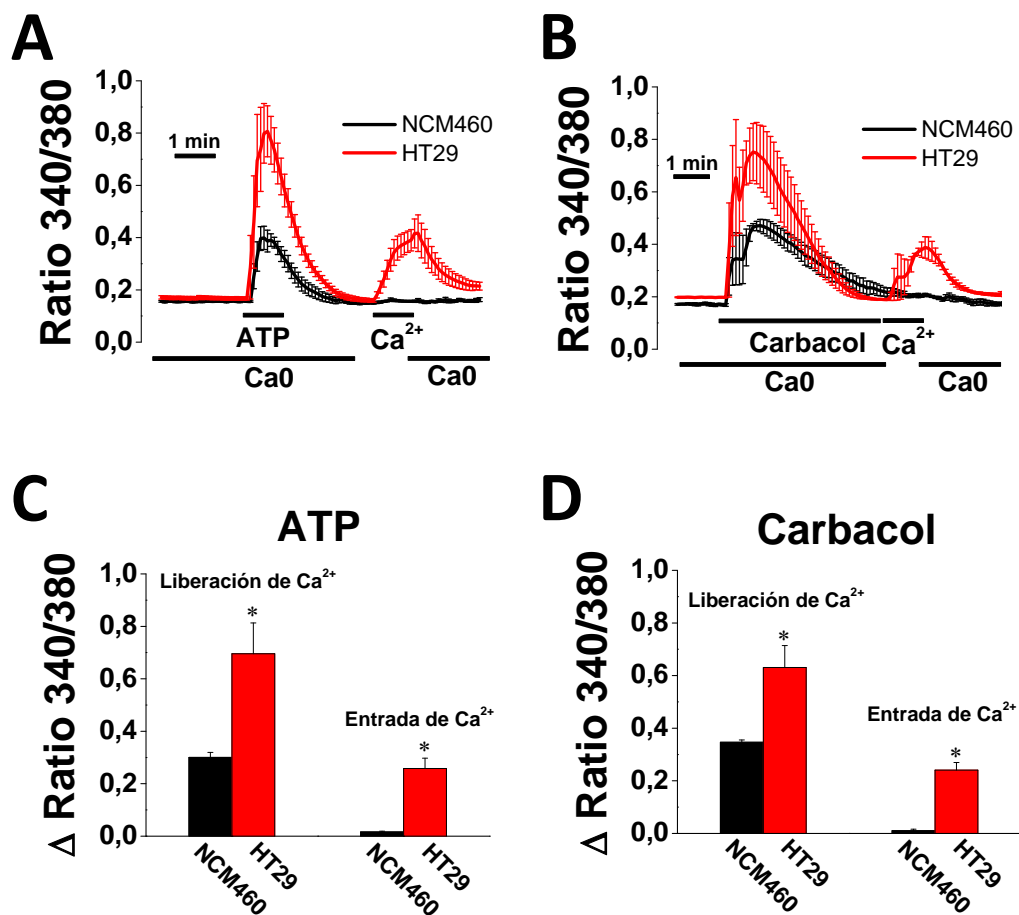


Figura 41. La liberación de Ca^{2+} inducida por agonistas fisiológicos es superior en las células de adenocarcinoma de colon y la posterior entrada de Ca^{2+} tiene lugar solo en las células tumorales y no en las normales. La $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se registra mediante imagen de fluorescencia con fura-2/AM. A y B. Registros de la liberación de Ca^{2+} inducida por ATP 200 μM (A) y carbacol 100 μM (B) en medio libre de Ca^{2+} ($\text{Ca}0$) y posterior entrada de Ca^{2+} obtenida tras la perfusión de medio con Ca^{2+} 1 mM. Los trazos corresponden a la media \pm EEM de 3-7 experimentos. C y D. Media \pm EEM de los incrementos de Ca^{2+} debidos a la liberación y a la entrada de Ca^{2+} inducida por ATP (C) y carbacol (D) en células NCM460 y HT29 (n=3-7 experimentos, * $p < 0,05$).

IV. RESULTADOS

El incremento de la liberación de Ca^{2+} inducida por agonistas fisiológicos en las células de adenocarcinoma de colon con respecto a las normales podría ser debido, al menos en parte, a diferencias en la expresión y/o actividad de los receptores de IP_3 de ambos tipos celulares. Para averiguarlo, diseñamos un experimento para comparar la liberación de Ca^{2+} inducida directamente por IP_3 . Así, recurrimos al uso de una molécula de IP_3 enjaulado o *caged-IP₃* que se libera mediante fotólisis al incidir sobre la misma luz láser de alta energía. Las células NCM460 y HT29 se cargan con fluo-4/AM y se registra el Ca^{2+} mediante un equipo de microscopía confocal en el que disponemos de control de la intensidad y duración de la excitación para promover una liberación controlada de IP_3 (Fig. 42A-C). La figura 42C muestra que el área bajo la curva de los registros de Ca^{2+} obtenidos es significativamente superior en las células tumorales que en las normales, lo que sugiere que la liberación inducida por IP_3 está aumentada en las células tumorales. Este resultado podría ser debido a que los receptores de IP_3 de las células tumorales presentan una mayor expresión o muestran una mayor actividad que los de las células normales.

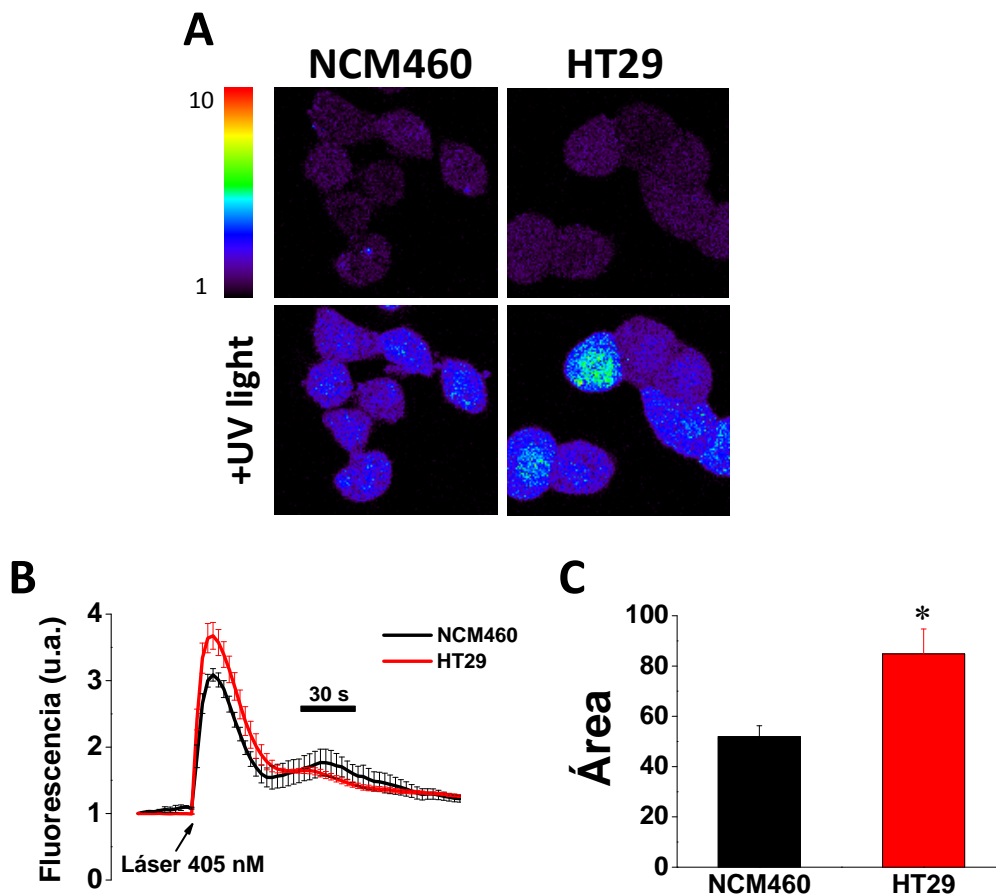


Figura 42. La liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 es mayor en las células tumorales de colon que en las normales. Las células se cargan con fluo-4/AM e IP_3 enjaulado 0,5 μM . La liberación del IP_3 enjaulado se produce al incidir sobre el mismo luz láser de 405 nm en el microscopio confocal con control de intensidad y duración de la iluminación. A. Imágenes de fluorescencia codificadas en pseudocolor antes y después de la fotólisis del IP_3 enjaulado. B. Media \pm EEM de los registros de fluorescencia de células NCM460 y HT29 de 4 experimentos independientes. C. Las barras muestran la media \pm EEM de las áreas bajo la curva de los registros de fluorescencia (n=4, *p<0,05).

1.4. El contenido de Ca^{2+} en los depósitos es menor en las células tumorales que en las células normales de colon

La diferencia en la liberación de Ca^{2+} en las células tumorales podría estar relacionada con un aumento del contenido de Ca^{2+} de los depósitos en las mismas respecto a las células normales. Con el objetivo de contrastar esta hipótesis estudiamos el nivel de llenado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} en células normales y tumorales. Para ello, tratamos las células NCM460 y HT29 con ácido ciclopiazónico en medio libre de Ca^{2+} . La $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se registra mediante imagen de fluorescencia, de nuevo, con fura-2/AM. El ácido ciclopiazónico es un inhibidor reversible de la SERCA que permite registrar la salida pasiva del Ca^{2+} contenido en los depósitos a través de los canales tipo fuga o *leak*. Seguidamente, se perfunde ATP en medio libre de Ca^{2+} para comprobar cuánto Ca^{2+} resta en los depósitos. Sorprendentemente, los apartados A y B de la figura 43 muestran que la salida pasiva de Ca^{2+} inducida por el ácido ciclopiazónico es menor en las células tumorales que en las normales lo que sugiere que el contenido de Ca^{2+} en las células tumorales es inferior que en las células normales. Al contrario de las células tumorales, las células normales todavía presentan algo de Ca^{2+} en sus depósitos tras el tratamiento con el ácido ciclopiazónico como podemos ver tras añadir ATP (Fig. 43).

Otra forma de estimar el Ca^{2+} contenido en los depósitos es mediante el uso de la ionomicina a baja concentración (Bird *et al.*, 2008) en medio libre de Ca^{2+} (Fig. 43C y D). La ionomicina es un ionóforo de Ca^{2+} que, a bajas concentraciones, se inserta en la membrana de los depósitos permitiendo la salida de este ión al citosol. El tratamiento en medio libre de Ca^{2+} evita que éste entre desde el exterior celular debido a la posible presencia del ionóforo en la membrana plasmática. El experimento nos permite observar, de la misma forma que con el ácido ciclopiazónico, que las células tumorales presentan un menor contenido de Ca^{2+} en sus depósitos que las células normales. La posterior perfusión con el ATP en medio libre de Ca^{2+} no muestra liberación lo que indica que la ionomicina nos permite estimar todo el Ca^{2+} contenido en los depósitos. El registro del Ca^{2+} citosólico con ionomicina lo llevamos a cabo con fura-4F/AM, ya que el fura-2/AM se satura y no permite ver las diferencias entre los registros de ambos tipos celulares (resultados no mostrados).

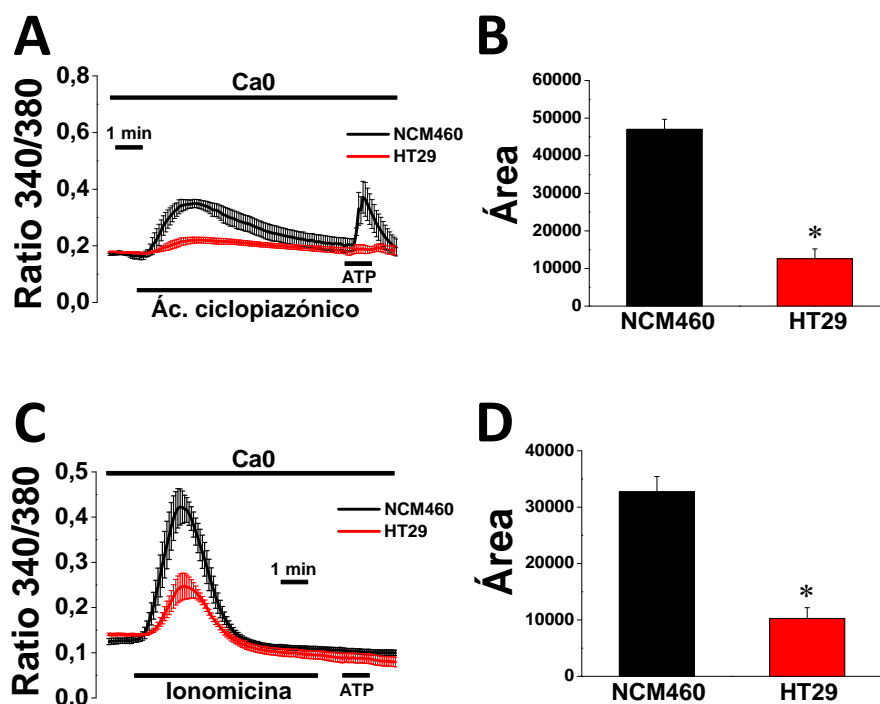


Figura 43. El contenido de Ca^{2+} de los depósitos es menor en las células tumorales que en las normales. El contenido de Ca^{2+} de los depósitos fue registrado en células NCM460 y HT29 con ácido ciclopiazónico 30 μM (A y B) y con ionomicina 400 nM (C y D) en medio libre de Ca^{2+} (CaO). Se utiliza fura-2/AM en los experimentos con ácido ciclopiazónico y fura-4F/AM en los experimentos con ionomicina para registrar el Ca^{2+} citosólico como ratio de fluorescencia 340/380. Los registros de Ca^{2+} son la media \pm EEM de 4 experimentos independientes con ácido ciclopiazónico (A) y de 7 experimentos con ionomicina (C). Las barras muestran la media \pm EEM del área bajo la curva de los registros con ácido ciclopiazónico (B) y con ionomicina (D) (n=4 experimentos, *p<0,05).

1.5. El vaciamiento de los depósitos inducido por ATP es superior en las células tumorales que en las normales

El resultado anterior sería contrario al esperado, ya que no es consistente con la mayor liberación de Ca^{2+} en las células tumorales. Sin embargo, podría explicar perfectamente por qué solo se induce la ECC con agonistas fisiológicos en estas células y no en las normales. Este hecho podría deberse a que los depósitos de Ca^{2+} están parcialmente vacíos en las células tumorales, y que además, la liberación de Ca^{2+} es más alta en estas células. Por consiguiente, el vaciamiento inducido por agonistas en las células de adenocarcinoma de colon sería más efectivo que en las células normales. Para comprobarlo nos propusimos estudiar el porcentaje de vaciamiento de los depósitos tanto de las células normales NCM460 como de las tumorales HT29. Así, inducimos la liberación de Ca^{2+} con un agonista fisiológico, ATP, y posteriormente, en tratamos las células con ionomicina en medio libre de Ca^{2+} para determinar cuál es el contenido restante de Ca^{2+} de los depósitos tras esa liberación (Fig. 44A y B). En las células tumorales el incremento de Ca^{2+} generado por la liberación parece superior al provocado por

la ionomicina lo que sugiere que en las células tumorales parece liberarse más de la mitad del contenido total de los depósitos de Ca^{2+} (Fig. 44A). Esto no ocurre en el caso de las células normales donde la liberación de Ca^{2+} inducida por ATP parece bastante menor que el contenido restante de Ca^{2+} de los depósitos (Fig. 44A). Este experimento nos va a permitir calcular el porcentaje de liberación de Ca^{2+} respecto al contenido total, o lo que es lo mismo, el porcentaje de vaciamiento inducido por el ATP. Para ello, determinamos los áreas bajo la curva de los incrementos generados por el ATP y por la ionomicina, y consideramos la suma de ambos como el total de Ca^{2+} contenido en los depósitos. Encontramos que el ATP vacía los depósitos de las células tumorales entorno a un 60%, mientras que los de las células normales tan solo se reducen en un 20% (Fig. 44B).

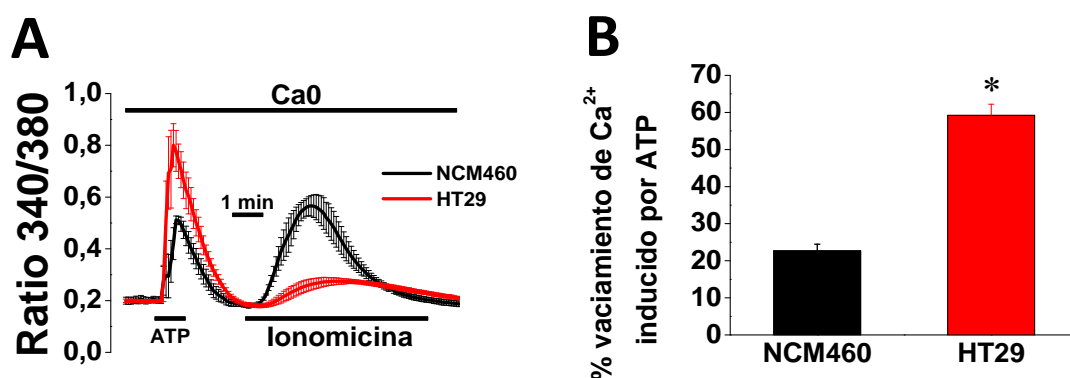


Figura 44. El vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} inducido por ATP es mayor en las células tumorales de colon que en las normales. La cantidad de Ca^{2+} restante de los depósitos tras la liberación inducida por ATP 200 μM es determinada con ionomicina 400 nM en las mismas células. El registro de Ca^{2+} citosólico tiene lugar con fura-2/AM en medio libre de Ca^{2+} . A. Media \pm EEM de los registros del ratio 340/380 de menos 4-5 experimentos independientes. B. Porcentaje de vaciamiento de Ca^{2+} inducido por ATP calculado como porcentaje del área bajo la curva de la liberación de Ca^{2+} respecto a la suma de los áreas bajo ambas curvas del registro. Las barras muestran la media \pm EEM de los porcentajes de vaciamiento de células NCM460 y HT29 (n=4-5 experimentos, *p<0,05).

Por último, utilizando los resultados obtenidos realizamos una estimación del contenido de Ca^{2+} de los depósitos tras la liberación inducida por el ATP en células normales y tumorales. Para ello, tomamos como referencia del contenido total de Ca^{2+} el área bajo la curva del registro con ionomicina en medio libre de Ca^{2+} de la figura 43D y le aplicamos el porcentaje de vaciamiento reflejado en la figura 44B. Así, en la figura 45 se representa el contenido de Ca^{2+} de los depósitos antes y después de la liberación con el agonista fisiológico en células normales y tumorales. En la misma se aprecia que las células normales presentan un contenido de Ca^{2+} en los depósitos muy superior al que aparece en las células de adenocarcinoma y que la liberación, en las células normales, apenas provoca una pequeña disminución en su contenido. Por el contrario, los depósitos de Ca^{2+} de las células tumorales están parcialmente vacíos y la liberación con el agonista reduce su contenido de manera

sustancial. Si consideramos que ambos tipos celulares presentan el mismo umbral de activación de la ECC, éste se alcanzaría tras la liberación de Ca^{2+} con ATP solo en el caso de las células tumorales lo que explicaría de un modo sencillo la ausencia de activación de ECC en células normales mediante estímulos fisiológicos.

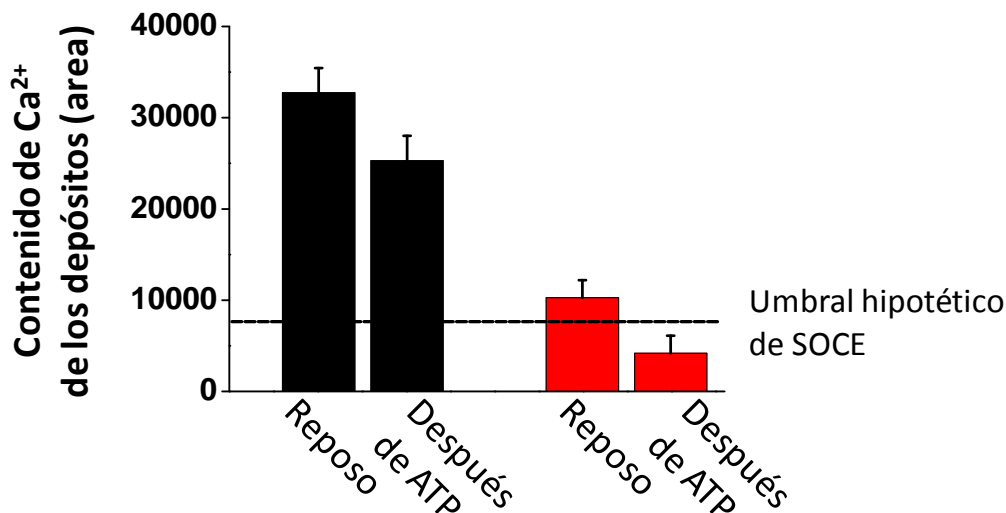


Figura 45. Contenido de Ca^{2+} de los depósitos antes y después de la liberación inducida por ATP en células normales y tumorales de colon. Los valores del contenido de Ca^{2+} antes del ATP son tomados de la figura 42D a los que se le aplican los porcentajes de vaciamiento de la figura 43D para obtener los valores del contenido después del ATP. El umbral hipotético de activación de la ECC se estima teniendo en cuenta que solo en el caso de las células tumorales se activa la ECC tras la liberación de Ca^{2+} con ATP.

1.6. Las células tumorales de colon son más resistentes a la muerte que las células normales

El contenido de Ca^{2+} de los depósitos tiene un papel relevante en la regulación de la resistencia a la muerte celular y la supervivencia (Prevarskaya *et al*, 2014). Como consecuencia, dado que las células normales y tumorales de colon presentan diferencias en el contenido de Ca^{2+} de los depósitos nos propusimos comparar la resistencia a la muerte celular inducida por estrés oxidativo con H_2O_2 en ambos tipos celulares (Fig. 46A y B). Para llevar a cabo este cometido realizamos un ensayo de muerte celular con anexina V y yoduro de propidio mediante citometría de flujo. La anexina V se va a unir a las células que sufren apoptosis, tanto temprana como tardía, así como a las células necróticas. En cambio, el yoduro de propidio se une a células en apoptosis tardía y necrosis. Por tanto, este ensayo nos permite identificar el total de células que han sufrido muerte, tanto por apoptosis como por necrosis. El resultado del experimento muestra que la muerte celular es menor en las células tumorales que en las células normales, tanto en situación de reposo como tras el estímulo apoptótico. Es decir, que las células tumorales presentan mayor resistencia a la muerte inducida por estrés oxidativo

que las células normales. Este dato sugiere que la disminución del contenido de Ca^{2+} de los depósitos podría contribuir al aumento de la resistencia a la muerte de las células de adenocarcinoma de colon.

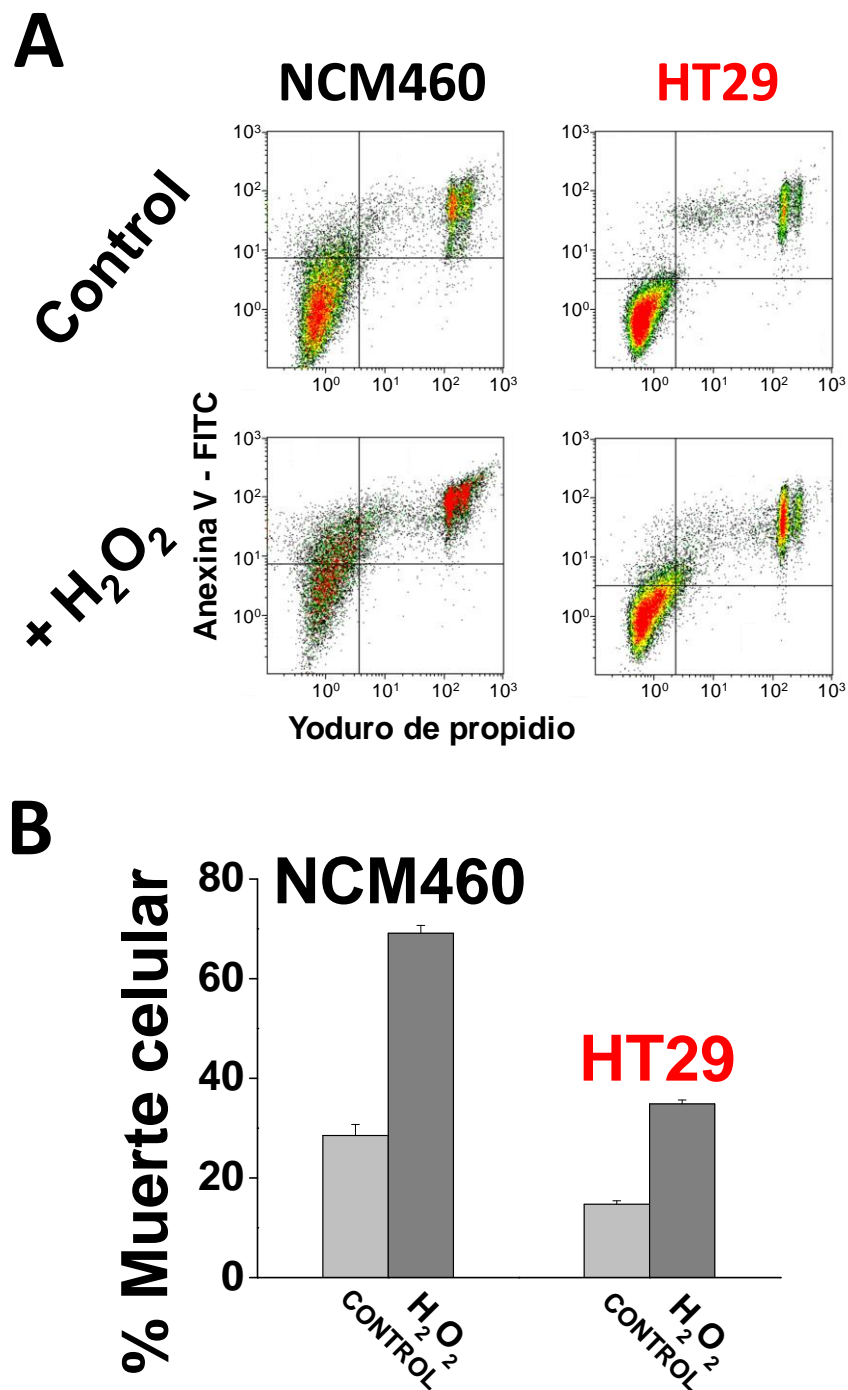


Figura 46. Las células de adenocarcinoma de colon son más resistentes a la muerte que las células normales. A. Resistencia a la muerte celular inducida mediante estrés oxidativo en células NCM460 y HT29. A. Ensayo representativo de muerte celular de doble marcaje con anexina V-FITC y yoduro de propidio analizado mediante citometría de flujo. Las células se tratan con H_2O_2 2 mM durante 150 min. B. Porcentaje total de muerte de células tratadas y no tratadas con H_2O_2 (apoptosis temprana, tardía y necrosis). Las barras muestran la media \pm EEM de un ensayo de tres replicas representativo de 5 experimentos.

1.7. El potencial de membrana y la $[Ca^{2+}]$ basal en el citosol son mayores en las células de adenocarcinoma de colon que en las células normales

La entrada capacitativa de Ca^{2+} inducida por taspigargina o por agonistas fisiológicos es superior en las células de adenocarcinoma de colon que en las normales. Esta característica de las células tumorales podría ser debida a un cambio en el potencial de membrana de las mismas, ya que éste contribuye a la fuerza electromotriz con la que se transporta el Ca^{2+} desde el exterior hacia el citosol. Por tanto, nos propusimos determinar el potencial de membrana de las células normales y tumorales. Para ello, llevamos a cabo registros electrofisiológicos de ambos tipos celulares en un equipo de *patch-clamp* planar en la configuración *whole-cell* fijando la corriente. El potencial de membrana de las células NCM460 resultó ser de -45 mV, mientras que el de las células HT29, de -64 mV (Fig. 47). Por tanto, las células tumorales están hiperpolarizadas si las comparamos con las células normales. Por consiguiente, el potencial de membrana más negativo de las células tumorales podría contribuir a que la entrada de Ca^{2+} sea superior en esas células.

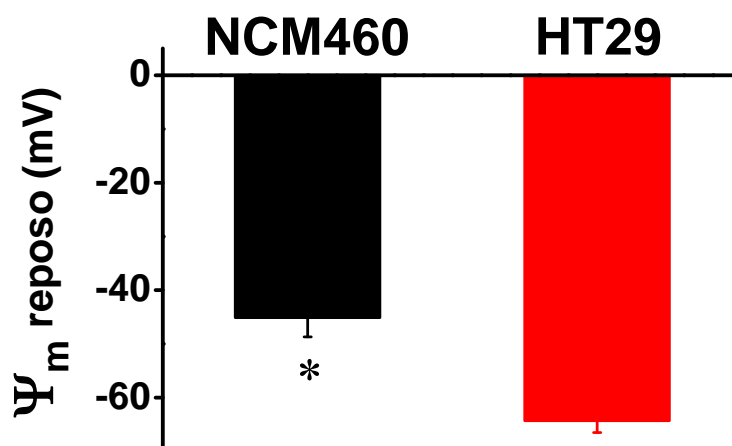


Figura 47. El potencial de membrana en reposo es más negativo en las células de adenocarcinoma de colon que en las normales. La determinación de los potenciales se lleva a cabo utilizando técnicas de *patch-clamp* planar en la configuración *whole cell* fijando la corriente. Las barras muestran la media \pm EEM del potencial de membrana en reposo de 22 células NCM460 y 33 células HT29.

Las células tumorales, como hemos observado, presentan mayor potencial de membrana, mayor liberación de Ca^{2+} y mayor ECC. Todo ello pudiera contribuir al mantenimiento de la concentración basal de Ca^{2+} . Por ello, nos propusimos comparar la $[Ca^{2+}]_c$ en estado de reposo en ambos tipos celulares. Por consiguiente, registramos la $[Ca^{2+}]_c$ con fura-2/AM en medio con Ca^{2+} 1 mM mediante imagen de fluorescencia en células NCM460 y HT29 (Fig. 48A y B). Como consecuencia, los resultados muestran que la $[Ca^{2+}]_c$ en las células tumorales de adenocarcinoma de colon esta aumentada con respecto a las normales.

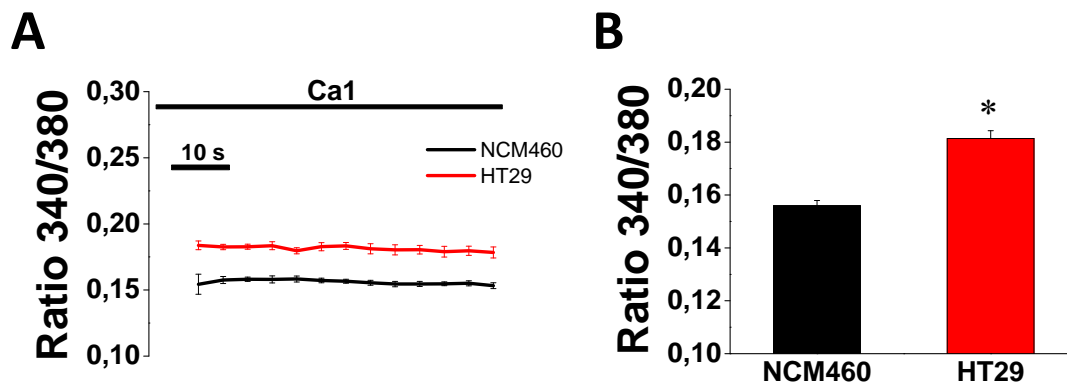


Figura 48. Los niveles basales de la $[Ca^{2+}]_c$ son mayores en las células tumorales que en las células normales de colon. El registro de Ca^{2+} citosólico tiene lugar con fura-2/AM como ratio de fluorescencia 340/380 en medio con Ca^{2+} 1 mM (Ca1). A. Media \pm EEM de registros del ratio 340/380 de 4 experimentos independientes en células NCM460 y HT29 con 19-33 células cada uno. B. Las barras representan la media \pm EEM de los promedios de los datos del ratio 340/380 en cada captura de los registros (n=4 experimentos, *p<0,05).

1.8. La captación mitocondrial de Ca^{2+} en las células tumorales de colon es superior a la de las células normales

La mitocondria se considera un orgánulo importante en la regulación de la ECC dentro de la célula puesto que actúa como un tampón de Ca^{2+} favoreciendo su activación y limitando su inactivación (Watson y Parekh, 2012). Dado que la ECC es superior en las células tumorales que en las normales, este hecho podría estar relacionado con la existencia de diferencias en la captación de Ca^{2+} mitocondrial de ambos tipos celulares. Por tanto, nos propusimos comparar la captación de Ca^{2+} a través de las mitocondrias de células normales y de adenocarcinoma de colon. Para ello, llevamos a cabo experimentos de imagen de bioluminiscencia utilizando aequorina mitocondrial. La aequorina se expresa en las células con el vector GFP-AEQmit y, a continuación, ésta se dirige a la matriz mitocondrial. La proteína GFP nos permite seleccionar en el campo del microscopio las células transfectadas. Para la monitorización del Ca^{2+} con aequorina es necesario reconstituir con celenterazina antes de iniciar el experimento. La unión del Ca^{2+} en la aequorina emite fotones de luz que son captados por la cámara de bioluminiscencia (Fig. 49A).

En primer lugar, nos planteamos monitorizar la captación de Ca^{2+} mitocondrial inducida por la ECC en células normales y tumorales. Por consiguiente, tratamos las células NCM460 y HT29 previamente con tapsigargina en medio libre de Ca^{2+} . A continuación, iniciamos el registro y perfundimos medio con Ca^{2+} 1 mM para inducir la entrada de Ca^{2+} . La figuras 49B y 49C muestran que tanto en las células normales como en las tumorales las mitocondrias captan Ca^{2+} procedente de la ECC. Sin embargo, las mitocondrias de las células tumorales captan más Ca^{2+} que las de las células normales. Esta circunstancia es consistente

con el hecho de que la entrada de Ca^{2+} hacia el interior del citosol es mayor en las células tumorales.

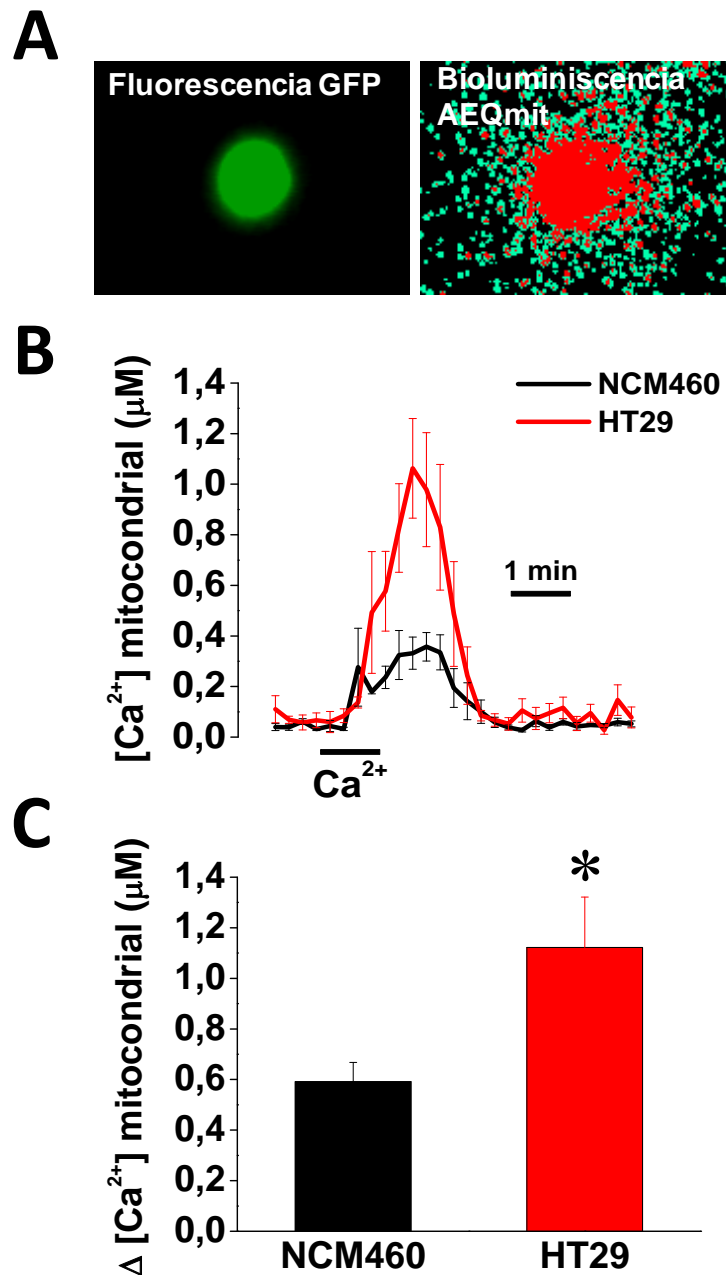


Figura 49. La captación de Ca^{2+} mitocondrial inducida por la ECC es mayor en las células tumorales de colon que en las normales. Las células se transfectan con aequorina mitocondrial (GFP-AEQmit) y a las 24 h se reconstituyen con celenterazina wt. La $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ es registrada mediante imagen de bioluminiscencia. La ECC se registra pretratando las células normales y tumorales con tapsigargina 1 μM durante 10 min en medio libre de Ca^{2+} y perfundiendo, posteriormente, medio con Ca^{2+} 1 mM. A. La imagen de la izquierda muestra una célula HT29 expresando la aequorina (unida a GFP) y la de la derecha, la misma célula emitiendo fotones tras la unión del Ca^{2+} a la aequorina en el interior de las mitocondrias. B. Media \pm EEM de registros de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ de 5 experimentos independientes en NCM460 y HT29. C. Las barras representan la media \pm EEM de los incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ de células normales y tumorales (n=5 experimentos, *p<0,05).

La mitocondria regula la activación de los canales operados por depósitos actuando como un tampón del Ca^{2+} liberado a través del receptor de IP_3 (Gilabert *et al.*, 2001). Además, anteriormente observamos que la liberación de Ca^{2+} es superior en las células tumorales que en las normales por lo que nos propusimos comparar la captación mitocondrial de Ca^{2+} promovida por la liberación de Ca^{2+} inducida por ATP en ambos tipos celulares. El registro de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ se lleva a cabo en medio libre de Ca^{2+} para evitar la entrada de Ca^{2+} desde el exterior tras la liberación (Fig. 50A y B). De esta forma, la captación de Ca^{2+} mitocondrial procedente de la liberación se produce tanto en las células NCM460 como en las HT29, siendo de nuevo significativamente mayor en las células tumorales de colon que en las normales.

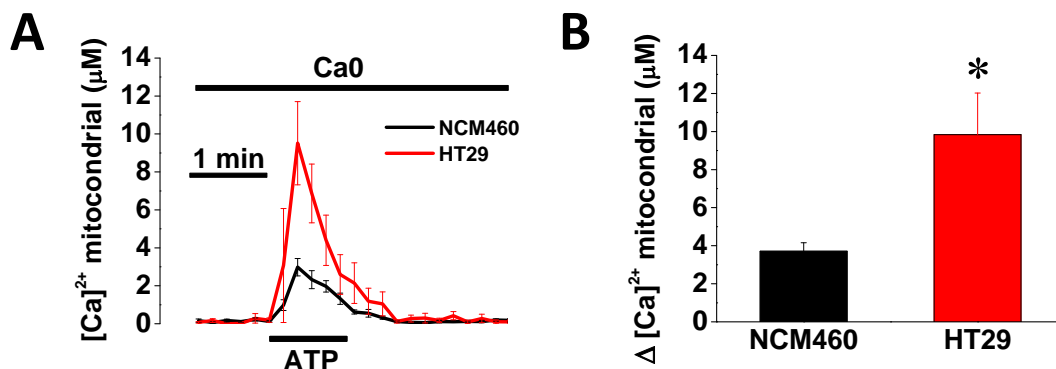


Figura 50. La captación mitocondrial del Ca^{2+} liberado con ATP es superior en las células tumorales que en las células normales de colon. El registro de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ tiene lugar con GFP-AEQmit mediante imagen de bioluminiscencia. Las células se reconstituyen con celenterazina h. Se perfunde ATP 200 μM en medio libre de Ca^{2+} . A. Media \pm EEM de registros de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ de al menos 6 experimentos independientes en células NCM460 y HT29 con 5-18 células por experimento. B. Las barras muestran la media \pm EEM de los incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ de las mismas células ($n \geq 6$, $*p < 0,05$).

La captación de Ca^{2+} mitocondrial estudiada en las figuras 49 y 50 depende del aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ consecuencia de la ECC o de la liberación de Ca^{2+} inducida por agonistas, respectivamente. Es decir, el aumento de la entrada de Ca^{2+} en las mitocondrias de las células tumorales con respecto a las normales podría deberse simplemente a la presencia de una mayor ECC o liberación de Ca^{2+} , según corresponda. Para registrar la captación de Ca^{2+} mitocondrial de manera independiente de la magnitud del incremento de Ca^{2+} en el citosol realizamos un ensayo de captación de Ca^{2+} mitocondrial en células permeabilizadas. De esta forma, monitorizamos la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria inducida por el mismo incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en ambos tipos celulares. Para ello, permeabilizamos las células con digitonina 10 μM , y perfundimos medio con Ca^{2+} 200 nM, ya que ésta es una $[\text{Ca}^{2+}]$ similar a la del citosol en reposo. Seguidamente, aplicamos medio con Ca^{2+} 5,7 μM simulando un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que va a provocar un aumento en la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria (Fig. 51A y B). Así, observamos que el mismo incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ induce, también, una captación de Ca^{2+} mitocondrial más alta en las células tumorales que en las células normales permeabilizadas

IV. RESULTADOS

con digitonina 10 μM . Esto indica que las mitocondrias de las células tumorales presentan mayor capacidad intrínseca para captar Ca^{2+} que las de las células normales.

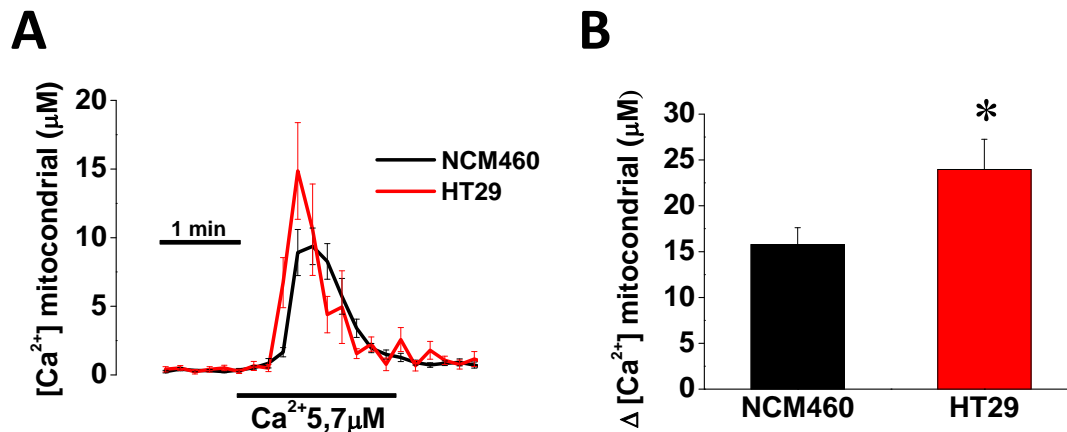


Figura 51. La entrada de Ca^{2+} en la mitocondria es mayor en las células permeabilizadas tumorales que en las normales. Las células fueron transfectadas con GFP-AEQmit y la reconstitución tuvo lugar con celenterazina n. La permeabilización de las células fue llevada a cabo con digitonina 10 μM en medio con Ca^{2+} 200 nM y la entrada de Ca^{2+} en las mitocondrias fue inducida con medio intracelular con $\text{Ca}^{2+} 5,7 \mu\text{M}$. A. Media \pm EEM de los registros de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ de 49 células NCM460 y de 15 células HT29. B. Las barras muestran la media \pm EEM de los incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ de las de células normales y tumorales permeabilizadas (* $p < 0,05$).

1.9. Los niveles de expresión de *MCU* y *MICU1* no varía entre células normales y tumorales de colon

La mayor captación intrínseca de Ca^{2+} por parte de las mitocondrias de las células tumorales al compararla con la de las células normales podría explicarse por cambios en la expresión del canal de Ca^{2+} que permite la entrada del mismo en la matriz mitocondrial y de algunos de sus reguladores. Por tanto, decidimos estudiar la expresión de *MCU*, el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial, y de *MICU1*, uno de sus principales reguladores, en las células NCM460 y HT29. Para ello, realizamos una RT-PCR con la que comprobamos que ambos se expresan a nivel de mRNA tanto en las células normales como en las tumorales de colon humano (Fig. 52A y B).

A continuación, determinamos los niveles de expresión de su mRNA mediante qRT-PCR utilizando a la β -actina como gen de referencia. Así, observamos que no hay diferencias significativas en la expresión de mRNA de *MCU* ni de *MICU1* entre células normales y tumorales (Fig. 52C). El resultado sugiere que las diferencias en la captación de Ca^{2+} mitocondrial entre células normales y tumorales no se deben a cambios en la expresión de dos de sus participantes moleculares, *MCU* y *MICU1*.

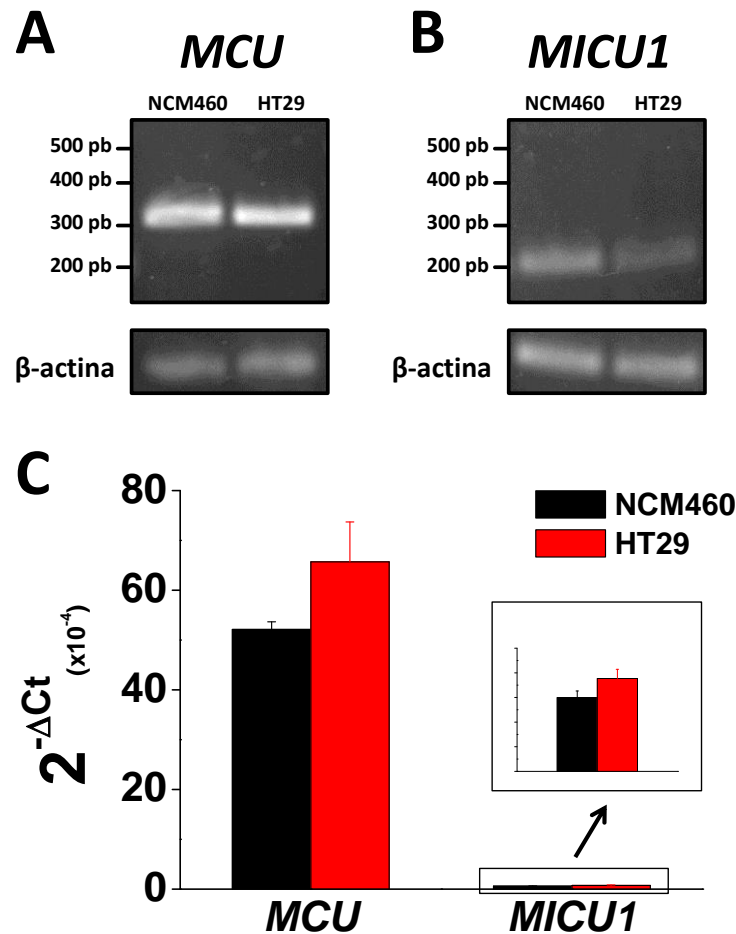


Figura 52. Expresión de *MCU* y *MICU1* a nivel de mRNA en células normales y tumorales de colon. A y B. RT-PCR de *MCU* y *MICU1* en células NCM460 Y HT29. Las imágenes muestran las bandas correspondientes a la expresión de *MCU* (A) y *MICU1* (B). Cada imagen se corresponde con una RT-PCR representativa de tres experimentos independientes. La β-actina es utilizada como un control endógeno. C. qRT-PCR que muestra los niveles de expresión de *MCU* y *MICU1* normalizados respecto a la β-actina en células normales y tumorales de colon. Las barras se corresponden con la abundancia relativa del mRNA expresada como $2^{-\Delta Ct}$ de al menos tres experimentos independientes (*p<0,05).

1.10. Las mitocondrias de las células tumorales están hiperpolarizadas

El potencial mitocondrial determina la fuerza electromotriz que impulsa la entrada de Ca^{2+} en el interior de la mitocondria. Por consiguiente, un cambio en el potencial mitocondrial de las células tumorales podría ser la causa de las diferencias en la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria entre células normales y tumorales. Para contrastar dicha hipótesis, cargamos las células NCM460 y HT29 con TMRM, una sonda fluorescente que se acumula en la matriz mitocondrial de acuerdo a su potencial. Cuanto mayor es la acumulación de esta sonda en la mitocondria más negativo será su potencial y, como consecuencia, mayor será la fuerza electromotriz para el Ca^{2+} . En la figura 53 podemos observar que la fluorescencia fruto de la

IV. RESULTADOS

acumulación del TMRM es superior en las células tumorales lo que indica que las mitocondrias en estas células están hiperpolarizadas con respecto a las de las células normales. El resultado es consistente con el aumento de la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria de las células tumorales frente a las normales.

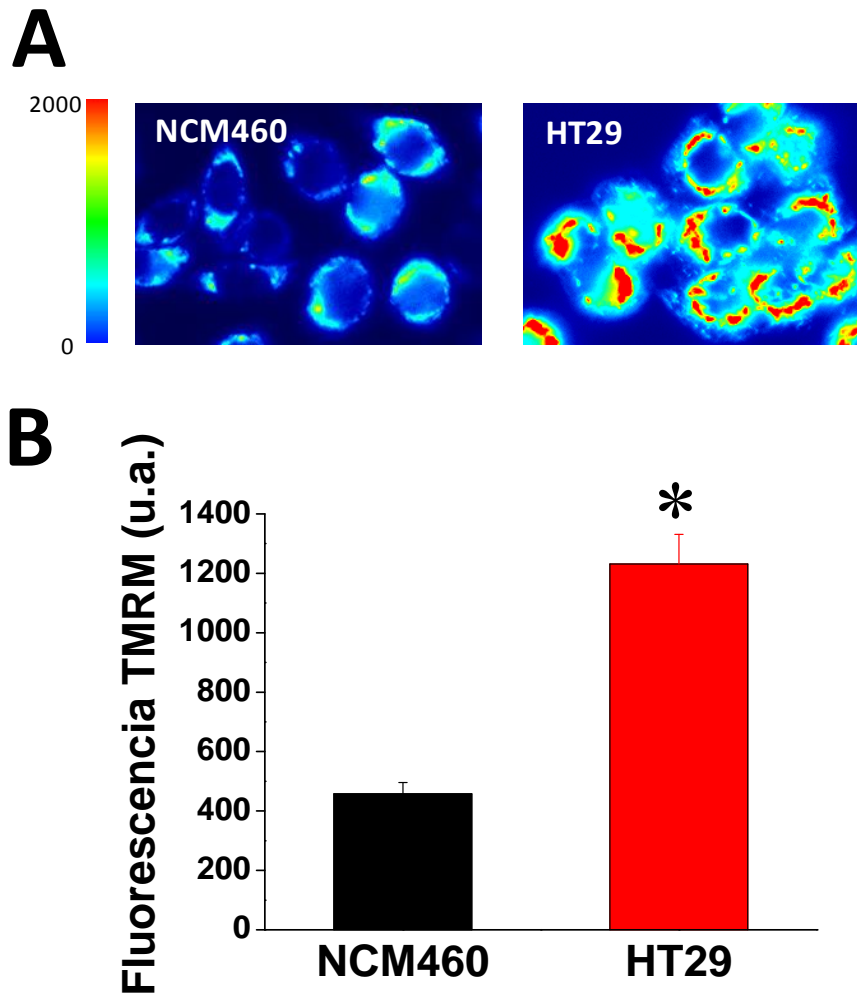


Figura 53. Comparación del potencial mitocondria determinado con TMRM en células normales y de adenocarcinoma de colon. Las células se cargan con TMRM 50 nM durante 15 min y se capturan imágenes mediante microscopía de fluorescencia. A. Imágenes de fluorescencia representativas codificadas en pseudocolor de células NCM460 y HT29 cargadas con TMRM. B. Las barras muestran la media \pm EEM de la fluorescencia de 6 experimentos independientes con 13-49 células por cada uno de ellos (* $p < 0,05$).

2. Estudio de las corrientes iónicas operadas por depósitos de células normales y tumorales de colon

Para caracterizar en más detalle el remodelado de la entrada de Ca^{2+} en las células tumorales se estudiaron las corrientes iónicas mediadas por los SOC_s en ambos tipos celulares. Para el registro de la I_{SOC} utilizamos técnicas electrofisiológicas de *patch-clamp* planar en configuración *whole-cell* fijando el voltaje. La activación de esta corriente se lleva a cabo con una solución interna que contiene EGTA 20 mM. El alto contenido en EGTA de la solución permite tamponar el Ca^{2+} intracelular provocando el vaciamiento pasivo de los depósitos e impidiendo la inactivación de las corrientes.

Las células normales NCM460 presentan una I_{SOC} con un componente entrante que muestra una baja amplitud de corriente a -80 mV y que carece de un componente saliente. La relación corriente-voltaje de la misma contiene una fuerte rectificación entrante y un potencial de reversión a valores muy positivos (Fig. 54A). Todas estas características de la I_{SOC} parecen indicar que se trate de una corriente similar a la I_{CRAC} (Hoth y Penner, 1992). En la figura 53B aparece representado el curso temporal de la corriente a -80 mV en el que se aprecia la activación con EGTA 20 mM. Sin embargo, no se observa inactivación, como consecuencia de la alta concentración del tampón. En cuanto a la corriente I_{SOC} de las células tumorales HT29, observamos que ésta difiere bastante de la de las células normales. Los registros muestran dos perfiles distintos de corriente I_{SOC} . El primero, presente en el 36% de las células examinadas se trata de una corriente parecida a I_{CRAC} , ya que en la relación corriente-voltaje obtenemos solo un componente entrante con una fuerte rectificación (Fig. 54C, D). El segundo, observado en el 64 % restante, podría ser una mezcla de corrientes I_{CRAC} e I_{SOC} no selectiva. Presenta una relación corriente-voltaje con un componente entrante de amplitud de corriente similar al primero y un componente saliente con rectificación (Fig. 54E).

Si comparamos la magnitud de la I_{SOC} obtenemos que la amplitud máxima del componente entrante de la corriente de las células tumorales medida a -80 mV es superior al de las células normales y que solo las células tumorales presentan un componente saliente a +80 mV (Fig. 54F). Por tanto, el aumento de la ECC de las células tumorales con respecto a las células normales podría ser explicado por una mayor amplitud de la I_{SOC} en las células de adenocarcinoma de colon.

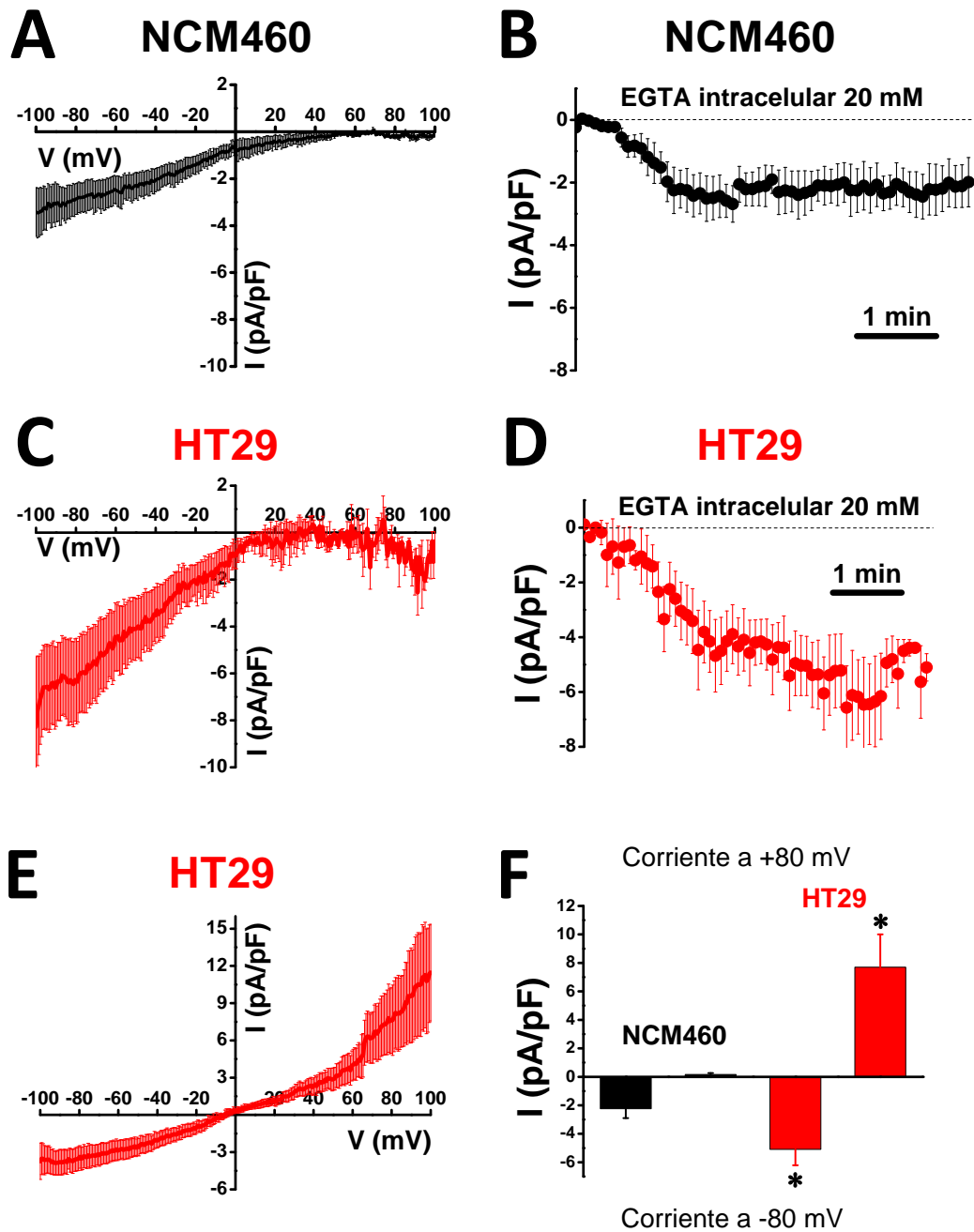


Figura 54. Corrientes I_{SOC} en células normales y tumorales de colon. Las corrientes se registran mediante técnicas electrofisiológicas de *patch-clamp* planar en configuración *whole-cell* fijando el voltaje y son normalizadas respecto a la capacitancia de la célula. La activación de la I_{SOC} se lleva a cabo con una solución interna de EGTA 20 mM. A. Media \pm EEM de los registros I-V de I_{SOC} de 18 células NCM460. B. Registro curso temporal de la I_{SOC} a -80 mV en células NCM460 (media \pm EEM, n=18 células). C. Media \pm EEM de los registros I-V de I_{SOC} del 36% de las células HT29 estudiadas (n=11 células). D. Registro curso temporal de la I_{SOC} a -80 mV en células HT29 (media \pm EEM, n=31 células). E. Media \pm EEM de los registros I-V de I_{SOC} del 64% de las células HT29 estudiadas (n=20 células). F. Media \pm EEM de la amplitud máxima de la I_{SOC} a -80 mV (componente entrante) y a +80 mV (componente saliente) de 18 células normales y 31 células tumorales (*p<0,05).

Además de registrar la I_{SOC} inducida por EGTA 20 mM, llevamos a cabo experimentos con tapsigargina y con ATP como agonista fisiológico en células normales y tumorales. Los resultados obtenidos de esta forma fueron similares a los descritos anteriormente en cuanto a la presencia de distintos perfiles de I_{SOC} y de la diferencia en la magnitud de corriente entre ambos tipos celulares (resultados no mostrados).

A continuación, decidimos estudiar la selectividad a Ca^{2+} de las corrientes obtenidas en las células tumorales. La corriente de las células normales solo tiene un componente que parece I_{CRAC} , por tanto, selectivo a Ca^{2+} . Sin embargo, la corriente de las células tumorales presenta al menos dos componentes que debemos caracterizar. El objetivo del siguiente experimento es comprobar si la I_{SOC} de las células tumorales se corresponde con una corriente de Ca^{2+} . Para ello, sustituimos el Na^+ por N-metil-D-glutamina ($NMDG^+$) en la solución externa. La $NMDG^+$ no es transportada a través de la membrana por lo que reduce la amplitud de la corriente que estaría mediada por Na^+ en condiciones fisiológicas. En este caso, la I_{SOC} es activada con tapsigargina que induce el vaciamiento pasivo de los depósitos de Ca^{2+} . Al representar la relación corriente-voltaje observamos que el componente entrante de la corriente no varía al sustituir el Na^+ por la $NMDG^+$ lo que indica que no está mediada por Na^+ (Fig. 55A). El mismo resultado aparece en las figuras 55B y 55C donde se muestran la secuencia temporal y la amplitud máxima de la corriente a -80 mV, respectivamente. Al descartar que el componente entrante de la corriente fuera selectivo a Na^+ implicaría que pudiera ser selectiva a Ca^{2+} . La selectividad a Ca^{2+} del componente entrante es confirmado sustituyendo el Ca^{2+} por Ba^{2+} , puesto que comprobamos que la amplitud del mismo se reduce al llevar a cabo esta operación (Fig. 55D). Por consiguiente, el componente entrante podría ser en su mayoría I_{CRAC} , en la que estaría participando ORAI1, ya que es el canal implicado en la misma más selectivo para este ión. En cambio, el componente saliente de la corriente desaparece prácticamente por completo con $NMDG^+$ lo que sugiere que el principal ión transportado es el Na^+ siendo, por tanto, esta corriente no selectiva a Ca^{2+} (Fig. 55A).

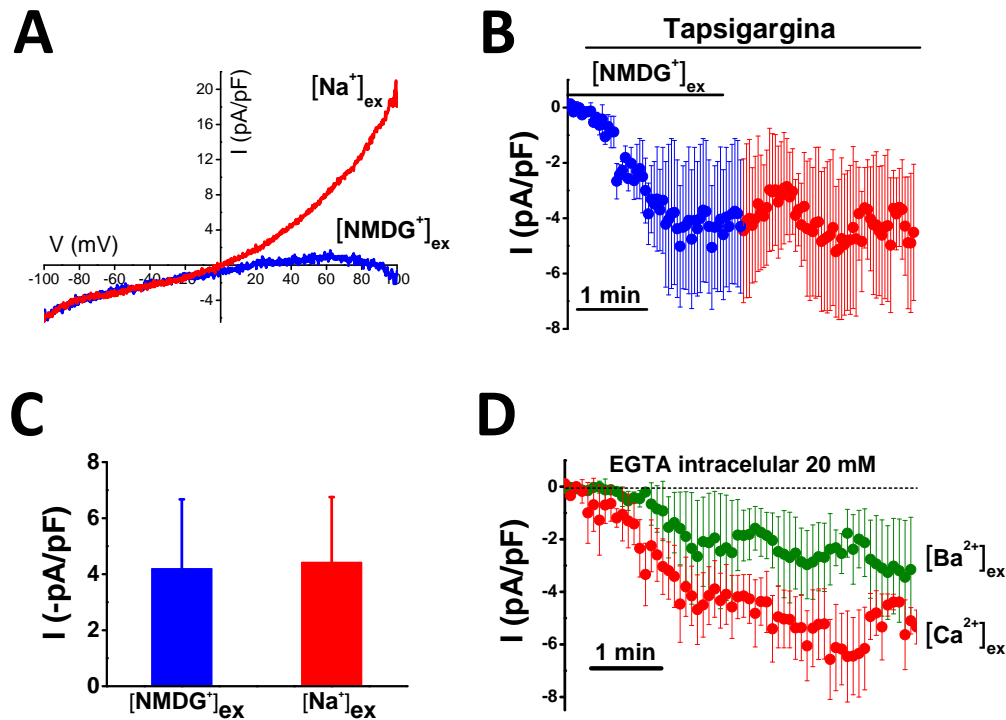


Figura 55. Selectividad iónica de la I_{SOC} en células tumorales HT29. Las corrientes son registradas mediante técnicas electrofisiológicas de *patch-clamp* planar en configuración *whole-cell* fijando el voltaje y son normalizadas respecto a la capacitancia de la célula. A. Registro I-V representativo de I_{SOC} en células tumorales conteniendo Na^+ o $NMDG^+$ en la solución externa. La activación de la I_{SOC} se lleva a cabo con tapsigargina $1 \mu M$ en la solución externa. B. Media \pm EEM de los registros curso temporales de la I_{SOC} a -80 mV de 9 células tumorales. El registro comienza con $NMDG^+$ y es sustituido por Na^+ . C. Media \pm EEM de la amplitud máxima de la I_{SOC} a -80 mV de 9 células tumorales en presencia de Na^+ o $NMDG^+$ externa (* $p < 0,05$). D. Media \pm EEM de los registros curso temporales de la I_{SOC} a -80 mV en células tumorales en presencia de Ca^{2+} o Ba^{2+} extracelular ($n \geq 6$ células). La I_{SOC} es activada con EGTA 20 mM en la solución externa.

El siguiente paso fue estudiar la sensibilidad a antagonistas de las corrientes encontradas en ambos tipos celulares. El ión La^{3+} , un antagonista clásico de los SOCs, inhibe casi por completo la corriente parecida a I_{CRAC} en las células normales, así como el componente entrante y saliente de la corriente de las células tumorales (datos no mostrados). El inhibidor de la ECC 2APB a una concentración de $30 \mu M$ reduce de manera sustancial la corriente parecida a I_{CRAC} de las células normales (Fig. 56A). El 2APB, utilizado a la misma concentración, inhibe, también, considerablemente el componente entrante de la corriente de las células tumorales. Sin embargo, no inhibe el componente saliente de la corriente en esas células (Fig. 56B y D). El aumento de la concentración de 2APB a $100 \mu M$ inhibe ahora tanto el componente entrante como el saliente de las células tumorales (Fig. 56C y D). Por tanto, el 2APB a baja concentración puede que nos permita separar las dos corrientes presentes en las células tumorales. Este resultado sugiere que la parte sensible a 2APB $30 \mu M$ del componente entrante de la corriente de las células tumorales se correspondería con una corriente parecida

a I_{CRAC} y que el componente saliente en su totalidad conjuntamente con la parte restante del componente entrante pertenecería a una corriente I_{SOC} no selectiva a Ca^{2+} .

Por otra lado, se ha descrito que el 2APB potencia la I_{SOC} mediada por ORAI3 (Lis *et al.*, 2007). Nuestros resultados sugieren, por tanto, que Orai3 no participa en las corrientes estudiadas ni en células normales ni en las tumorales.

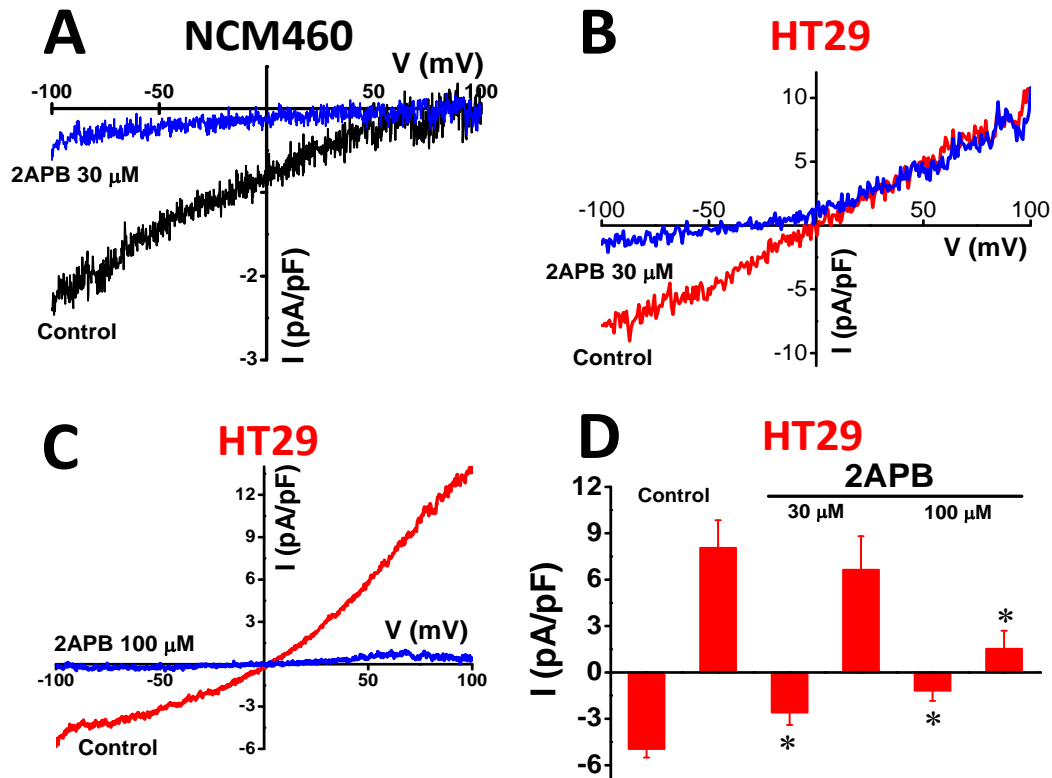


Figura 56. Sensibilidad de la I_{SOC} a 2APB en células normales y tumorales de colon. Las corrientes son registradas mediante técnicas electrofisiológicas de *patch-clamp* planar en configuración *whole-cell* fijando el voltaje y son normalizadas respecto a la capacitancia de la célula. La activación de la I_{SOC} se lleva a cabo con tapsigargina 1 μ M en la solución externa. A. Registro I-V representativo de I_{SOC} en presencia o ausencia de 2APB 30 μ M en células NCM460 (n=11 células). B. Registro I-V representativo de I_{SOC} en presencia o ausencia de 2APB 30 μ M en células HT29 (n=6 células). C. Registro I-V representativo de I_{SOC} en presencia o ausencia de 2APB 100 μ M en células HT29 (n=12 células). D. Media \pm EEM de la amplitud máxima de la I_{SOC} a -80 mV (componente entrante) y a +80 mV (componente saliente) en presencia o ausencia de 2APB 30 y 100 μ M en células tumorales (n=5-12 células, *p<0,05).

3. Bases moleculares del remodelado de la entrada capacitativa de Ca^{2+}

3.1. Expresión de los posibles componentes moleculares de la entrada capacitativa de Ca^{2+} en células normales y tumorales de colon a nivel de mRNA

Las diferencias en la ECC y la I_{SOC} de las células normales y tumorales observadas hasta el momento podrían ser debidas a una expresión diferencial de los componentes moleculares implicados en las mismas. Por tanto, nos propusimos estudiar la expresión de los posibles participantes de la ECC en ambos tipos celulares, NCM460 y HT29. Primero, decidimos identificar qué participantes se expresan a nivel de mRNA para lo cual llevamos a cabo un estudio basado en RT-PCR.

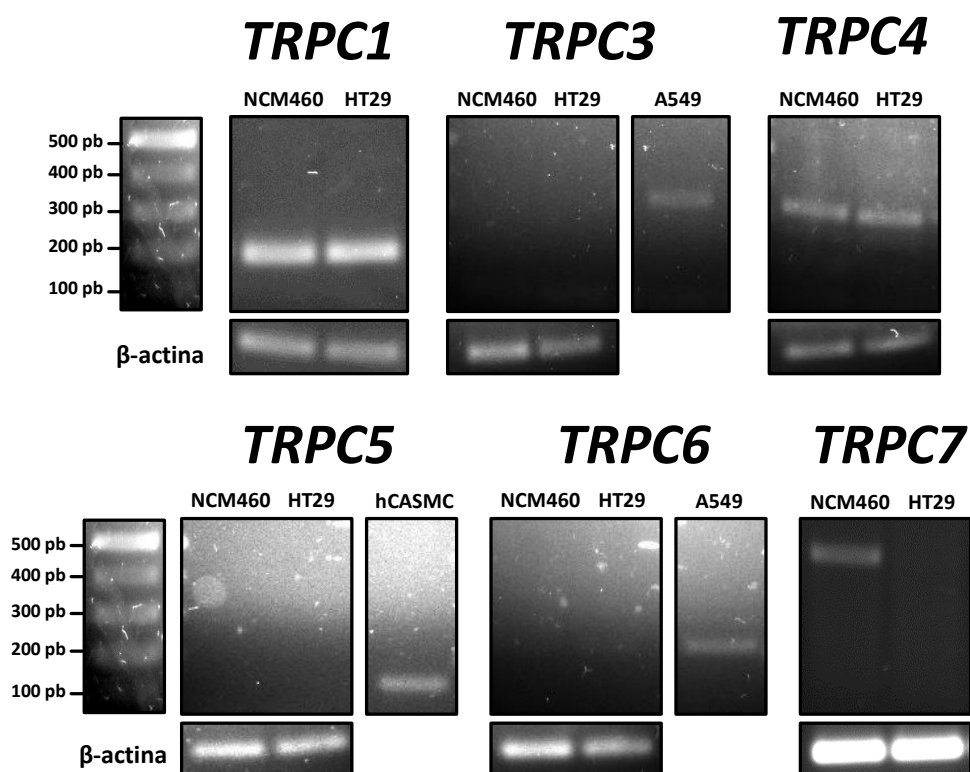


Figura 57. Expresión de canales de la familia de los *TRPCs* a nivel de mRNA en células normales y tumorales de colon. La expresión fue estudiada mediante RT-PCR en células NCM460 y HT29. Las imágenes muestran las bandas de expresión de los *TRPCs* y de la β -actina que fue utilizada como control endógeno. El RNA de las células A549 fue usado como control positivo de la expresión de *TRPC3* y *TRPC6* y el de las hCASCs, como control positivo de *TRPC5*. Las imágenes que se muestran son resultados representativos de al menos 3 experimentos independientes.

La mayoría de los canales integrantes de la familia de los TRPCs han sido relacionados con la ECC por lo que comenzamos realizando una RT-PCR de todos ellos, excepto de *TRPC2*, ya que en humanos se trata de un pseudogen (Fig. 57). Como consecuencia, observamos que solo los mRNA de *TRPC1* y *TRPC4* se expresan tanto en las células normales como en las tumorales de colon. En cambio, *TRPC7* solo está presente en los colonocitos normales, mientras que *TRPC3*, *TRPC5* y *TRPC6* no aparecen en ninguna de las dos líneas celulares. Además, nos planteamos estudiar la expresión a nivel de mRNA de otros tres canales que han sido relacionados con la ECC y que pertenecen a la superfamilia de los TRPs: *TRPV4*, *TRPV6* y *TRPM8* (Fig. 58). Encontramos que *TRPV4* no se expresa en ninguno de los dos tipos celulares. Sin embargo, *TRPV6* y *TRPM8* aparecen solo en las células normales. Por consiguiente, *TRPC7*, *TRPV6* y *TRPM8* podrían participar solo en la ECC de las células normales y *TRPC1* y *TRPC4*, en la de ambos tipos celulares.

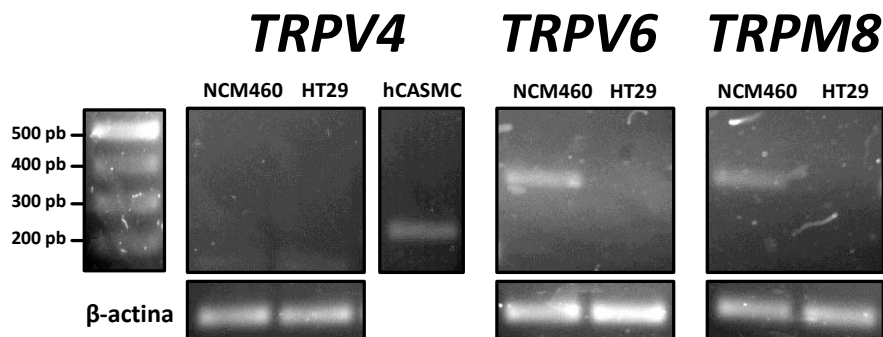


Figura 58. Expresión a nivel de mRNA de los canales *TRPV4*, *TRPV6* y *TRPM8* en células normales y tumorales de colon. Las imágenes muestran las bandas específicas de los productos de RT-PCR de *TRPV4*, *TRPV6* y *TRPM8* en células NCM460 y HT29. La expresión de la β -actina fue usada como control endógeno. El RNA de las hCASMcs fue utilizado como control positivo de la expresión de *TRPV4*. Las imágenes que se muestran son resultados representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Los componentes moleculares de la ECC más ampliamente reconocidos son los canales de la familia ORAI (1-3) y la de los sensores de Ca^{2+} , STIM (1 y 2). Algunos de ellos son responsables de la I_{CRAC} , corriente presente, como hemos visto, tanto en las células normales como en las tumorales. La RT-PCR de *ORAI1-3*, *STIM1* y *STIM2* pone de manifiesto su expresión a nivel de mRNA en ambas líneas celulares (Fig. 59). Este resultado implica que todos ellos podrían contribuir a la ECC tanto en colonocitos normales como en células de adenocarcinoma de colon.

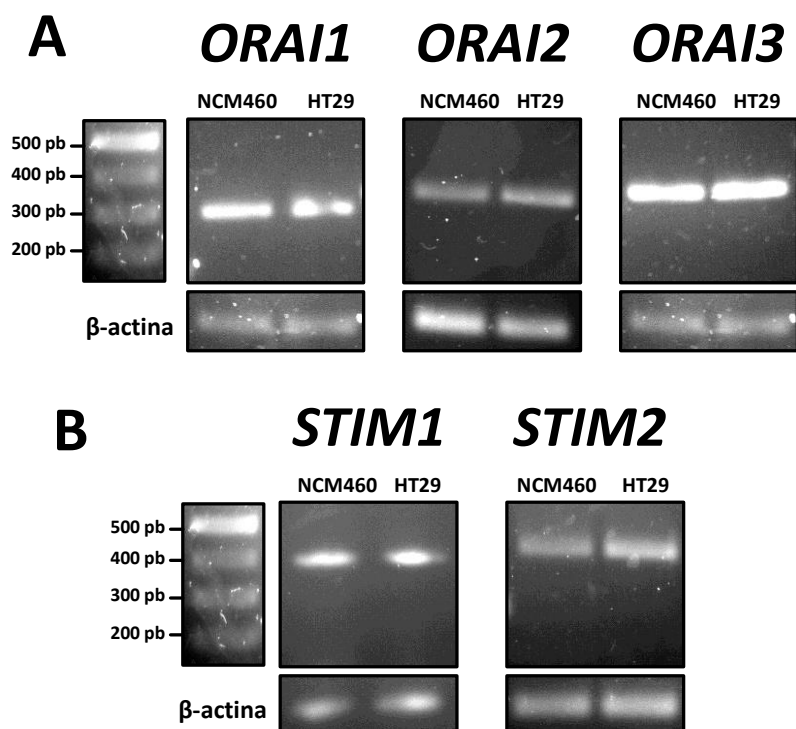


Figura 59. Expresión génica de las familias *ORAI* y *STIM* en células normales y tumorales de colon. Las imágenes muestran las bandas de expresión de mRNA de *ORAI1*, *ORAI2*, *ORAI3*, *STIM1* y *STIM2* en células NCM460 y HT29. La expresión de la β-actina fue utilizada como control endógeno. Las imágenes que se muestran son resultados representativos de al menos 3 experimentos independientes.

A continuación, determinamos cuáles son los niveles de expresión de mRNA de los participantes moleculares que pueden estar implicados en la ECC de las células normales y tumorales de colon. Para ello, llevamos a cabo una qRT-PCR de los posibles participantes de la ECC que se expresan en ambos tipos celulares: *TRPC1*, *TRPC4*, *ORAI*s y *STIM*s. En la figura 60 observamos la abundancia relativa del mRNA de estos candidatos normalizada frente a la β-actina. El perfil de expresión de los genes estudiados en las células normales resultó ser el siguiente: $STIM2 \approx ORAI2 > STIM1 \approx ORAI1 > ORAI3 \gg TRPC4 > TRPC1$. En las células tumorales el perfil relativo es muy similar. Sin embargo, los niveles de expresión de parte de los genes aparecieron incrementados significativamente en las células tumorales.

Si nos centramos en comparar la expresión de cada una de los genes estudiados, encontramos que *TRPC1*, *ORAI2*, *STIM1* y *STIM2* se sobreexpresan en las células tumorales de forma estadísticamente significativa. Sin embargo, no hay diferencias de expresión en el caso de *TRPC4*, *ORAI1* y *ORAI3* (Fig. 60A y B). Por tanto, las diferencias observadas en la ECC e I_{50C} entre células normales y tumorales podrían deberse a las variaciones en la expresión de los transcritos de *TRPC1*, *ORAI2*, *STIM1* y *STIM2*.

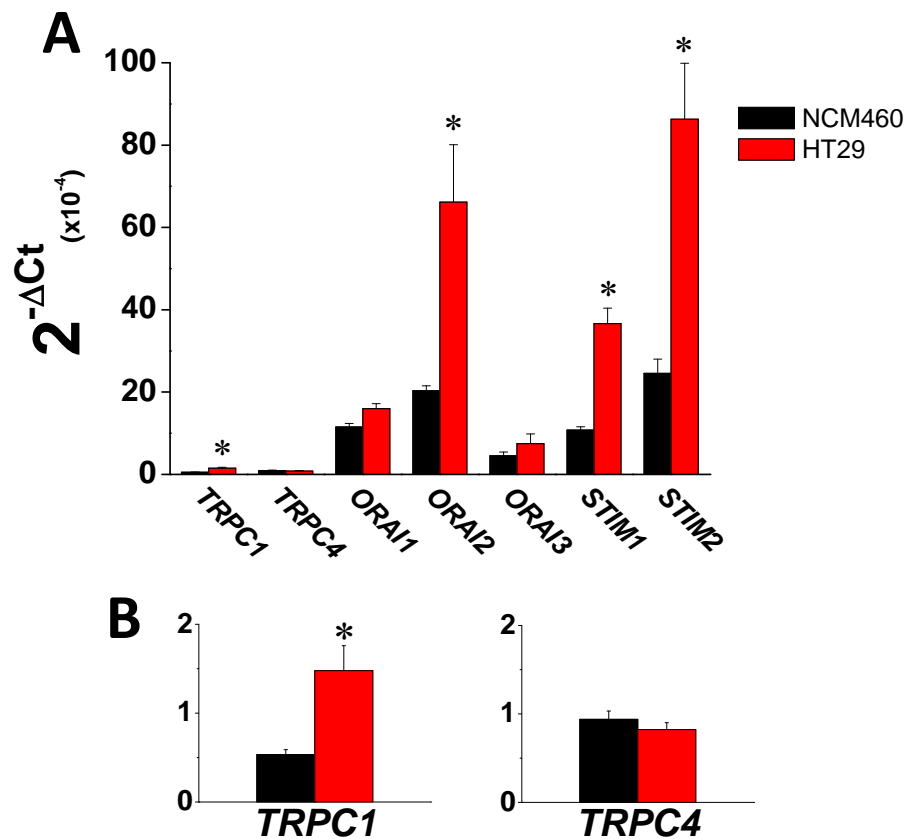


Figura 60. Abundancia relativa de mRNA de los posibles participantes de la ECC en células normales y tumorales de colon. La expresión del mRNA de *TRPC1*, *TRPC4*, *ORAI*s y *STIM*s en células NCM460 y HT29 fue determinada mediante qRT-PCR. A. Las barras muestran la media±EEM de la abundancia relativa de los transcritos normalizada frente a la β -actina y expresada como $2^{-\Delta Ct}$ (n=3-6 experimentos, *p<0,05). B. Barras de expresión de mRNA ampliadas correspondientes a *TRPC1* y *TRPC4* (n=3-6 experimentos, *p<0,05).

3.2. Expresión de los posibles componentes moleculares de la entrada capacitativa de Ca^{2+} en células normales y tumorales de colon a nivel de proteína

El patrón de expresión de los posibles componentes moleculares de la ECC a nivel de mRNA puede diferir del patrón a nivel proteico. Por tanto, realizamos un *western-blotting* para estudiar la expresión de las proteínas candidatas a participar en la ECC e I_{SOC} de las células normales y tumorales. La figura 61 muestra que todos los candidatos de la ECC que se expresaban a nivel de mRNA en ambos tipos celulares lo hacen, también, a nivel de proteína. Sin embargo, se producen bastantes diferencias teniendo en cuenta los niveles de expresión de la proteína. Así encontramos que ORAI2, TRPC1 y STIM1 se siguen sobreexpresando en las células tumorales a nivel de proteína (Fig. 61B, D y F). Además, la abundancia relativa de ORAI1, ORAI3 y TRPC4 era significativamente mayor en las células tumorales a pesar de que a nivel de mRNA el cambio no resultó significativo. (Fig. 61A, C y E). Por consiguiente, el aumento de la expresión de los ORAI, TRPC1, TRPC4 y STIM1 puede contribuir al incremento de la ECC e I_{SOC} de las células tumorales con respecto a las normales.

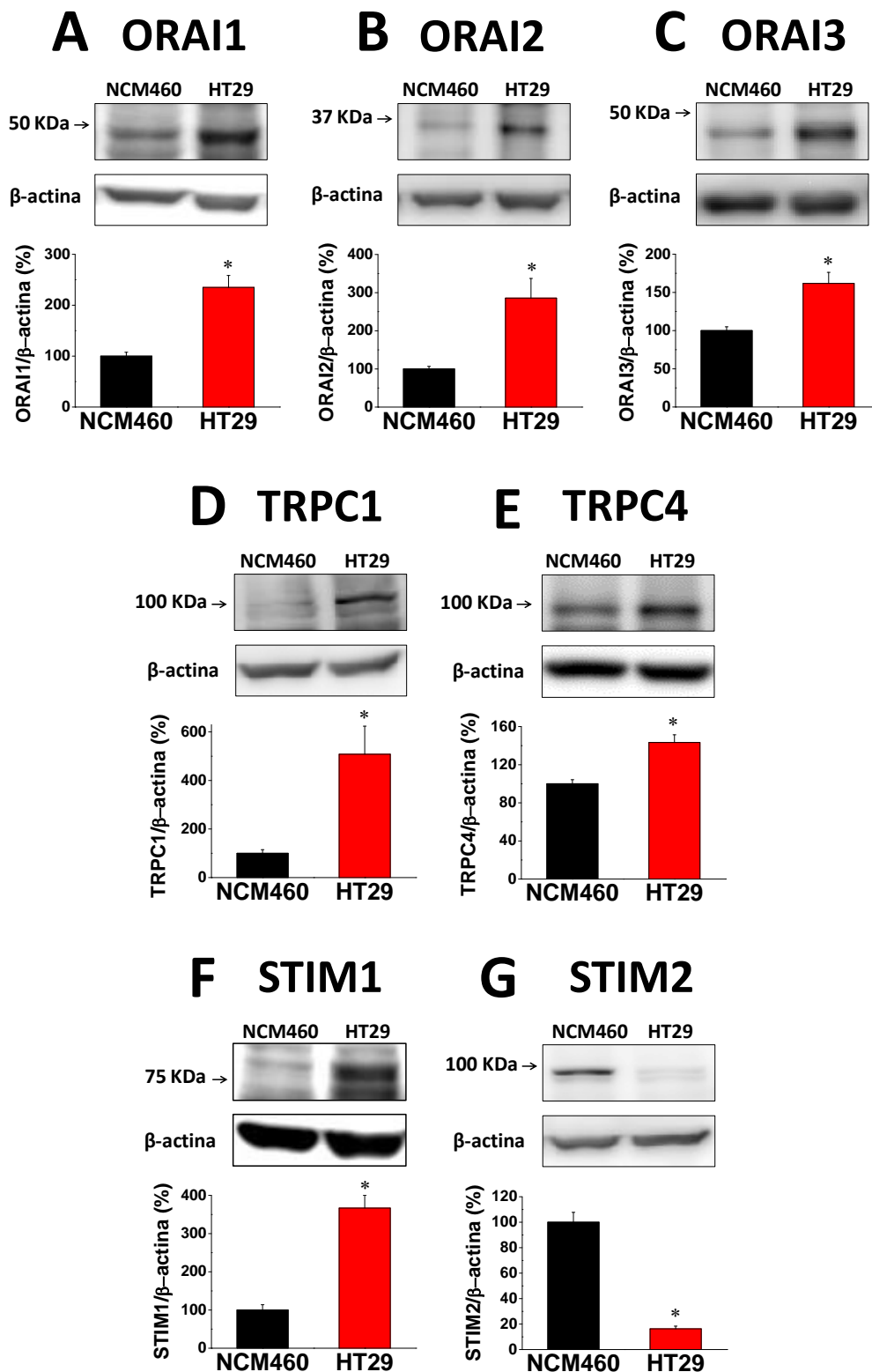


Figura 61. Niveles de expresión de posibles proteínas implicadas en la ECC en células normales y tumorales de colon. *Western blotting* de ORAI1 (A), ORAI2 (B), ORAI3 (C), TRPC1 (D), TRPC4 (E), STIM1 (F) y STIM2 (G) en células NCM460 y HT29. Las imágenes se corresponden con las bandas de expresión de cada proteína y de la β-actina que fue utilizada como control endógeno. Las barras representan la media ± EEM del porcentaje de expresión de cada proteína con respecto a la β-actina en las células tumorales normalizado frente a las normales (n=9-18 experimentos, *p<0,05).

En la tabla 9 aparece el incremento relativo de las proteínas estudiadas en las células tumorales con respecto a las normales. De esta forma, apreciamos que el incremento más alto de expresión de proteína es el de TRPC1 que aumenta 5,2 veces en las células tumorales con respecto a las normales seguido de STIM1, que aumenta 3,7 veces. Sorprendentemente, STIM2 cuya expresión a nivel de mRNA era la que más se incrementaba en las células tumorales, a nivel de proteína, no solo no aumenta, sino que disminuye de manera considerable (Fig. 61G). Se trata del mayor cambio de expresión de las proteínas relacionadas con la ECC puesto que el número de veces que se expresa en las células tumorales con respecto a las normales es 0,15 o lo que es lo mismo, su abundancia disminuye 6,7 veces.

	Incremento relativo (células tumorales vs normales)
TRPC1	5,2
TRPC4	1,4
ORAI1	2,3
ORAI2	2,9
ORAI3	1,5
STIM1	3,7
STIM2	0,15

Tabla 9. Número de veces que las proteínas posiblemente implicadas en la ECC se incrementan en las células tumorales de colon con respecto a las normales. Si el número es mayor que 1 indica que la proteína aumenta en las células tumorales con respecto a las normales, sin embargo si es menor que 1 indica que disminuye.

Por otra parte es interesante tener en cuenta la variación de unas proteínas con respecto a la variación de las otras cuando comparamos la expresión de cada una de ellas en las células normales y tumorales, ya que nos da una idea del posible cambio de la estequiometría de las mismas, la cual se ha descrito que es importante en la ECC (Saul *et al.*, 2013). Por consiguiente, calculamos el ratio del número de veces que cambia una proteína en las células tumorales con respecto al cambio de las otras (tabla 10). El valor de cada ratio es el número de veces que la proteína del numerador aumenta en la estequiometría de las células tumorales con respecto a la de las normales. Así, valores de ratio superiores a la unidad indican que la contribución de la proteína objeto de estudio aumenta con respecto a la proteína con la que se compara en las células tumorales. Por el contrario, valores inferiores a la unidad sugieren que la proteína de interés disminuiría. De manera llamativa, los ratios

IV. RESULTADOS

TRPC1/TRPC4, TRPC1/OAI1, TRPC1/OAI2, TRPC1/OAI3 son todos mayores que 1 lo que indica que en la estequiometría de las células tumorales se ha favorecido el incremento de TRPC1 frente al resto de canales relacionados con la ECC (tabla 10). En cambio, los ratios de STIM2 frente al resto de proteínas son los más bajos y en su totalidad menores de 1 lo que sugiere que STIM2 disminuye de manera considerable en la estequiometría de los posibles componentes moleculares de la ECC en las células tumorales con respecto al resto de las proteínas (tabla 10). La disminución de su contribución en la estequiometría de las células tumorales dificultaría una posible interacción de STIM2 con el resto de las proteínas debido a su menor disponibilidad en estas células comparada con la de las células normales.

		NUMERADOR						
		TRPC1	TRPC4	OAI1	OAI2	OAI3	STIM1	STIM2
DENOMINADOR	TRPC1		0,3	0,4	0,6	0,3	0,7	0,02
	TRPC4	3,7		1,6	2	1,1	2,6	0,1
	OAI1	2,2	0,6		1,2	0,7	1,6	0,06
	OAI2	1,8	0,5	0,8		0,5	1,3	0,05
	OAI3	3,5	0,9	1,5	1,9		2,5	0,1
	STIM1	1,4	0,4	0,6	0,8	0,4		0,04
	STIM2	35	9	13	19	10	25	

Tabla 10. Ratio de los incrementos de expresión de las proteínas posiblemente implicadas en la ECC en las células tumorales de colon con respecto a las normales. El ratio se calcula a partir de los valores del número de veces que se incrementa cada proteína en las células tumorales con respecto a las normales que se incluyen en la tabla 2. Consiste en el cociente del número de veces que se incrementa una proteína y el número de veces que se incrementa otra con la que se quiere comparar. Por ejemplo, el ratio TRPC1/STIM2 es $5,2/0,15=35$. Este valor nos indica que la abundancia de TRPC1 aumenta 35 veces en la estequiometría TRPC1:STIM2 de las células tumorales con respecto a la de las normales.

4. Efecto del silenciamiento de los canales y sensores de Ca^{2+} implicados en el remodelado sobre la entrada de Ca^{2+} , las corrientes operadas por depósitos y los depósitos de Ca^{2+}

4.1. ORAI1, y no TRPC1, participa en la entrada capacitativa de Ca^{2+} y la I_{SOC} de los colonocitos normales

Una vez identificados diferentes candidatos susceptibles de participar tanto en la ECC como en la I_{SOC} de las células normales y tumorales de colon nos propusimos determinar su implicación en las mismas. Para ello, llevamos a cabo el silenciamiento de los posibles componentes moleculares de la ECC y estudiamos las consecuencias funcionales del mismo.

Comenzamos por el estudio del silenciamiento de ORAI1 y TRPC1 en la ECC de las células normales. Con este propósito llevamos a cabo el silenciamiento de los mismos en las células NCM460 con RNA pequeño de interferencia (siRNA, del inglés, *small interfering RNA*). Para ello, transfectamos las células con el siRNA específico para un gen determinado y paralelamente utilizamos otro siRNA que funciona como control. Primero, comprobamos la efectividad del silenciamiento mediante qRT-PCR que muestra que la expresión tanto de *ORAI1* como de *TRPC1* se reduce con el siRNA específico para cada uno de ellos (Fig. 62A y B). Tras el silenciamiento, registramos la ECC inducida por tapsigargina mediante imagen de fluorescencia con fura-2/AM. El silenciamiento de ORAI1 en las células normales reduce la ECC de manera significativa (Fig. 62C y E) lo que indica que ORAI1 contribuye a dicha entrada de Ca^{2+} en las células normales. Sin embargo, el silenciamiento de TRPC1 no induce cambios en la ECC con respecto al control (Fig. 62D y F) sugiriendo que este canal no está implicado en la ECC de las células normales.

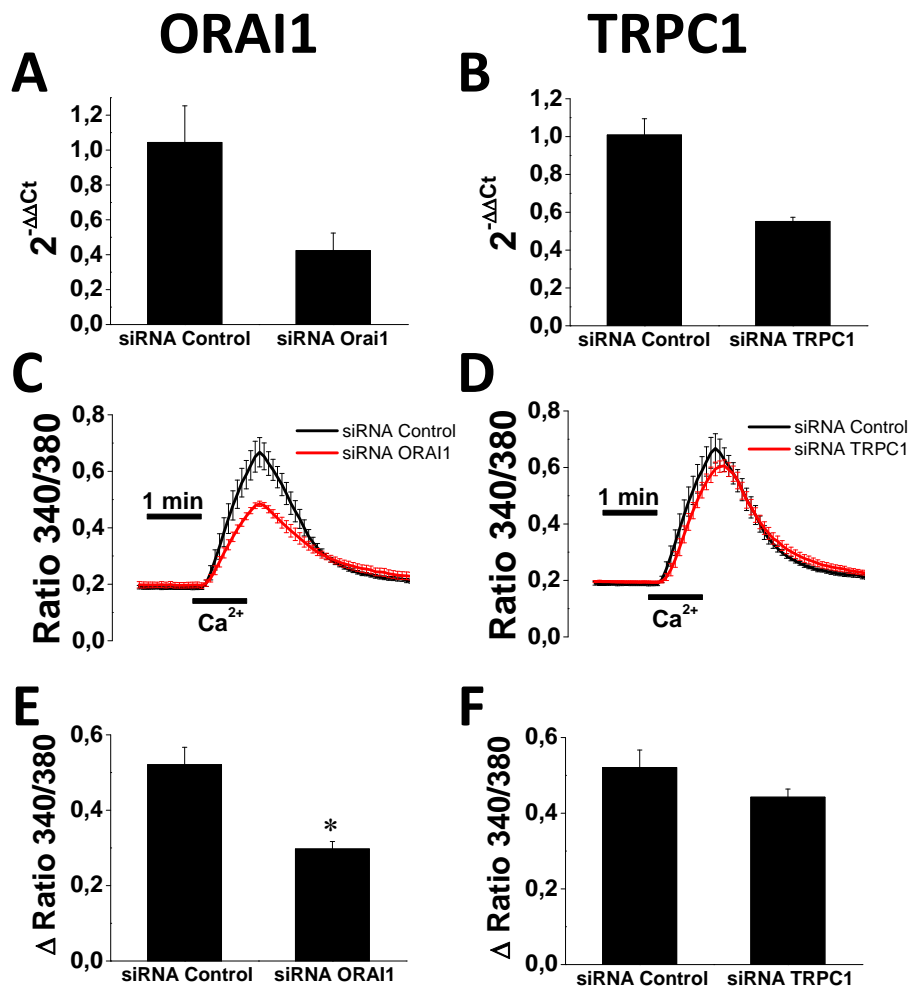


Figura 62. El silenciamiento de ORAI1, pero no el de TRPC1, reduce la ECC en las células normales de colon. El silenciamiento de ORAI1 y el de TRPC1 tienen lugar mediante la transfección de las células NCM460 con siRNAs. Los resultados del silenciamiento de ambos canales son comparados con los del siRNA Control. Las células fueron tratadas previamente con tapsigargina 1 μ M en medio libre de Ca^{2+} para, a continuación, inducir la ECC perfundiendo medio con Ca^{2+} 1 mM. A. qRT-PCR de *ORAI1* en células normales transfectadas con siRNA Control y siRNA ORAI1. La β -actina fue usada como gen de referencia (media \pm EEM, n=3 experimentos). B. qRT-PCR de *TRPC1* en células normales transfectadas con siRNA Control y siRNA TRPC1. La β -actina fue usada como gen de referencia (media \pm EEM, n=3 experimentos). C y D. El registro de la ECC tiene lugar mediante imagen de fluorescencia con fura-2/AM. Media \pm EEM de los registros de la ECC de 8 experimentos independientes en células normales con siRNA ORAI1 (C) y siRNA TRPC1 (D). E y F. Las barras muestran la media \pm EEM del incremento del ratio de los registros de la ECC de 8 experimentos independientes en los que se silencia ORAI1 (E) y TRPC1 (F) (* $p < 0,05$).

Seguidamente, nos planteamos comprobar si ORAI1 y TRPC1 están participando en la I_{SOC} de las células normales. Por tanto, silenciamos ambos canales con siRNA por separado en células NCM460 y, a continuación, registramos la corriente activada con tapsigargina mediante *patch-clamp* planar en configuración *whole cell* fijando el voltaje (Fig 63A-E). El silenciamiento de ORAI1 provoca una reducción de la corriente observada en las células normales patente

tanto en la amplitud de la relación corriente-voltaje (Fig. 63A) como en la amplitud de la secuencia temporal de la corriente a -80 mV (Fig. 63C y E). En cambio, el silenciamiento de TRPC1 en las mismas células no produce cambios significativos en la I_{SOC} de las células normales (Fig 63B, D y E). Estos resultados sugieren que solo ORAI1 está implicado en la I_{SOC} de las células normales. Este hecho, apoya la idea de que la I_{SOC} de las células normales se trata de una I_{CRAC} mediada por ORAI1 que es un canal selectivo para Ca^{2+} . Además, es consistente con la participación de este canal en la ECC al contrario que TRPC1.

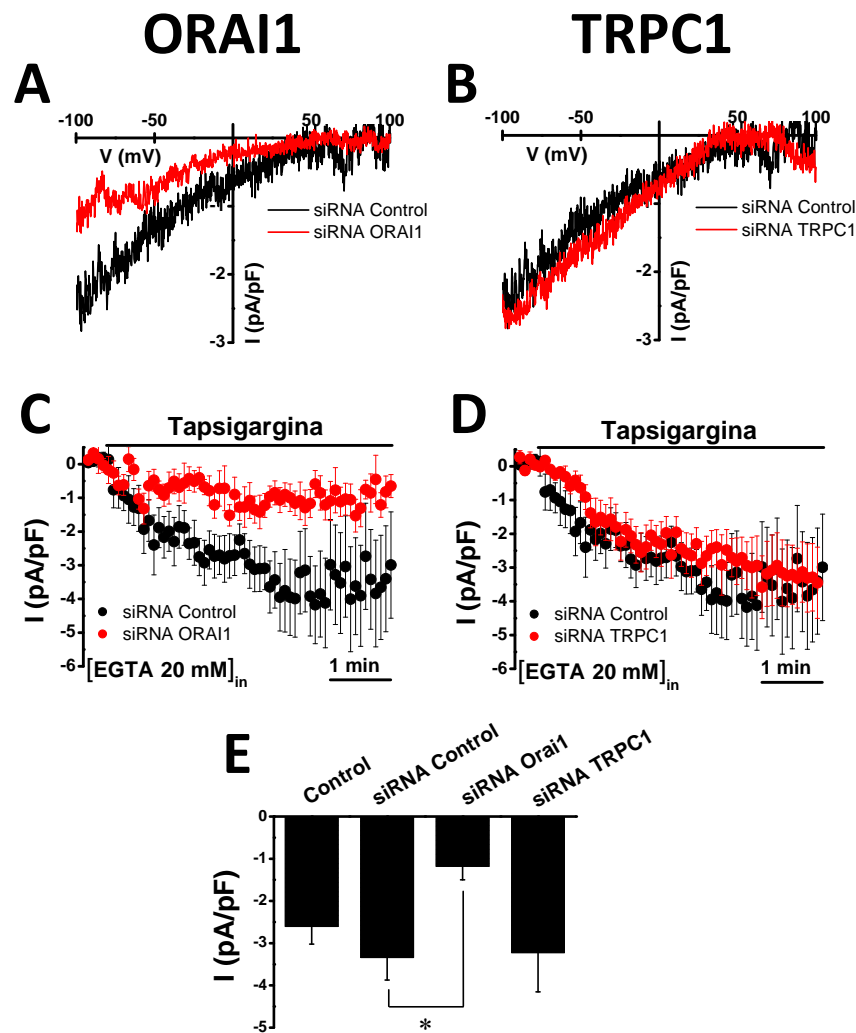


Figura 63. Solo el silenciamiento de ORAI1 reduce la I_{SOC} en las células normales de colon. Las células NCM460 fueron transfectadas con siRNA ORAI1 y siRNA TRPC1. Los datos procedentes del silenciamiento de estos canales son comparados con los del siRNA Control. La corriente fue registrada mediante patch-clamp planar en la configuración whole cell y voltage clamp. I_{SOC} fue activada con tapsigargina 1 μ M. A. Registro I-V representativo de I_{SOC} en células normales transfectadas con siRNA Control y siRNA ORAI1. B. Registro I-V representativo de I_{SOC} en células normales transfectadas con siRNA Control y siRNA TRPC1. C. Media \pm EEM de los registros curso temporales de la I_{SOC} a -80 mV en células normales transfectadas con siRNA Control y siRNA ORAI1 (n=12-14 células). D. Media \pm EEM de los registros curso temporales de la I_{SOC} a -80 mV en células normales transfectadas con siRNA Control y siRNA TRPC1 (n=8-12 células). E. Media \pm EEM de la amplitud máxima de la I_{SOC} a -80 mV en células no silenciadas (control) y células transfectadas con siRNA Control, siRNA ORAI1 y siRNA TRPC1 (n=8-14 células, *p<0,05).

4.2. STIM1 y STIM2 están implicados en la entrada capacitativa de Ca^{2+} de las células normales de colon

STIM1 y STIM2 parecen funcionar como sensores de Ca^{2+} en la ECC. STIM1 activa la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos de la mayoría de las células donde se ha estudiado, sin embargo, hay más controversia sobre la función de STIM2. Por tanto, decidimos estudiar primero el papel de ambos sensores de Ca^{2+} en la ECC de las células normales de colon. Para ello, silenciamos STIM1 y STIM2 con siRNA en células NCM460 y registramos la ECC inducida por tapsigargina mediante imagen de fluorescencia con fura-2/AM (Fig. 64A-F). Realizando una qRT-PCR comprobamos que tanto la expresión de *STIM1* como la de *STIM2* se reducen con los siRNAs específicos con respecto al siRNA Control (Fig. 64A y B). Encontramos que la ECC en las células normales silenciadas con siRNA STIM1 es menor que la de las células transfectadas con siRNA Control lo que sugiere que la reducción de la expresión de STIM1 provoca una disminución en la ECC (Fig. 64C y E). Por otra parte, el silenciamiento de STIM2 también reduce la ECC en las células normales (Fig. 64D y F). Los datos sugieren que tanto STIM1 como STIM2 participan en la ECC inducida por tapsigargina de los colonocitos normales.

Por otro lado, llevamos a cabo un silenciamiento doble de STIM1 y STIM2 con siRNA y registramos la ECC inducida por tapsigargina en las células normales (Fig. 65A-D). La expresión de *STIM1* y *STIM2* es menor tras la transfección conjunta de los siRNAs específicos con respecto al siRNA Control como muestra la qRT-PCR (Fig. 65A y B). La reducción de ambos integrantes de la familia STIM provoca una disminución de la ECC (Fig. 65C y D). Asimismo, el doble silenciamiento da lugar a un efecto aditivo, es decir, provoca aproximadamente la misma reducción en la entrada de Ca^{2+} que la suma de las reducciones consecuencia de cada silenciamiento por separado. Este resultado confirma la importancia de ambos sensores de Ca^{2+} en la ECC de las células normales.

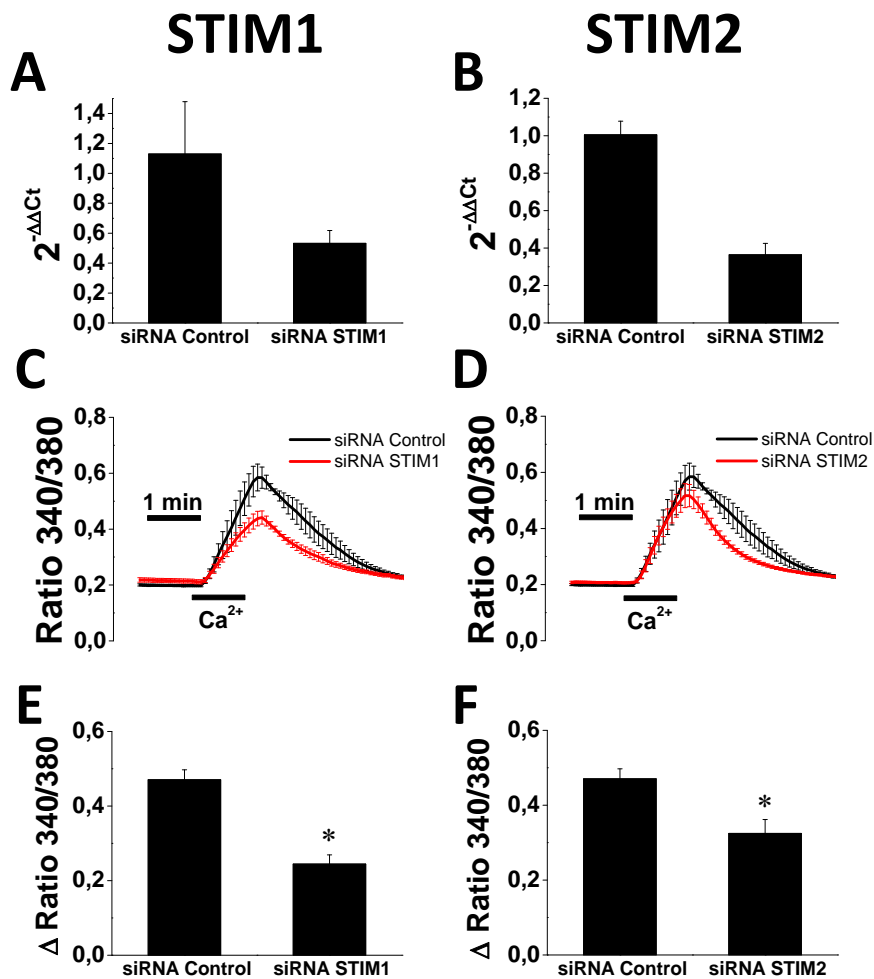


Figura 64. Los silenciamientos de STIM1 y STIM2 reducen la ECC en las células normales de colon. El silenciamiento de STIM1, así como el de STIM2 tienen lugar mediante la transfección de las células NCM460 con siRNAs. Los resultados del silenciamiento de ambos sensores son comparados con los del siRNA Control. Las células fueron tratadas previamente con taspigargina 1 μ M para inducir la ECC. A. qRT-PCR de *STIM1* en células normales transfectadas con siRNA Control y siRNA STIM1. La β -actina fue usada como gen de referencia (media \pm EEM, n=3 experimentos). B. qRT-PCR de *STIM2* en células normales transfectadas con siRNA Control y siRNA STIM2. La β -actina fue usada como gen de referencia (media \pm EEM, n=3 experimentos). C y D. El registro de la ECC tiene lugar mediante imagen de fluorescencia con fura-2/AM. Media \pm EEM de los registros de la ECC en células normales con siRNA STIM1 (C) y siRNA STIM2 (D) (n=9 experimentos). E y F. Las barras muestran la media \pm EEM del incremento del ratio de los registros de la ECC en los que se silencia STIM1 (E) y STIM2 (F) (n=9 experimentos, *p<0,05).

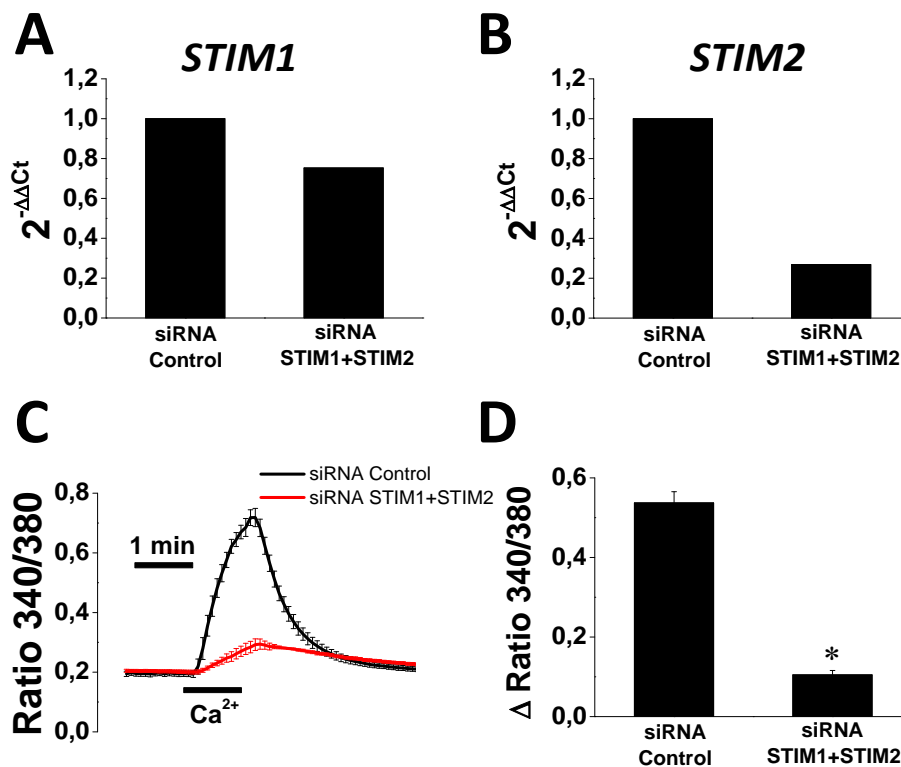


Figura 65. El silenciamiento doble de *STIM1* y *STIM2* reduce drásticamente la ECC en las células normales de colon. Las células NCM460 son transfectadas con siRNA *STIM1* y siRNA *STIM2* de manera conjunta. Los resultados del silenciamiento doble son comparados con los del siRNA Control. Las células fueron tratadas previamente con tapsigargina 1 μ M para inducir la ECC. A y B. qRT-PCR de *STIM1* (A) y *STIM2* (B) que muestra la reducción de la expresión de ambos *STIMs* consecuencia del silenciamiento doble. La β -actina fue usada como gen de referencia. C. El registro de la ECC es llevado a cabo mediante imagen de fluorescencia con fura-2/AM. Media \pm EEM de los registros de la ECC en células normales con siRNA *STIM1* y siRNA *STIM2* comparada con la del siRNA Control (n=4 experimentos). D. Las barras muestran la media \pm EEM del incremento del ratio de los registros de la ECC en los que se silencia conjuntamente *STIM1* y *STIM2* (n=4 experimentos, *p<0,05).

4.3. Solo *Orai1*, y no *Orai2*, *Orai3* ni *TRPC1*, está implicado en la entrada capacitativa de Ca^{2+} de las células de adenocarcinoma de colon

El silenciamiento de *Orai1* en las células normales ha dejado clara su implicación en la ECC de esas células. A continuación, nos preguntamos si *Orai1* tiene un papel relevante en la ECC de las células tumorales, ya que es donde este canal se sobreexpresa con respecto a las células normales de colon. Por tanto, silenciamos *Orai1* con siRNA en las células tumorales HT29 y registramos la ECC mediante imagen de fluorescencia. Antes, demostramos que el siRNA utilizado reduce la expresión de *Orai1* mediante qRT-PCR (Fig. 66A). Seguidamente, observamos que el silenciamiento de *Orai1* en las células tumorales disminuye la ECC inducida por tapsigargina (Fig. 66B y C) lo que sugiere que *Orai1* está participando como canal de Ca^{2+} en la ECC de las células de adenocarcinoma de colon. Este dato indica que el aumento de la

expresión de ORAI1 en las células tumorales con respecto a las normales puede contribuir al incremento de la ECC en las mismas.

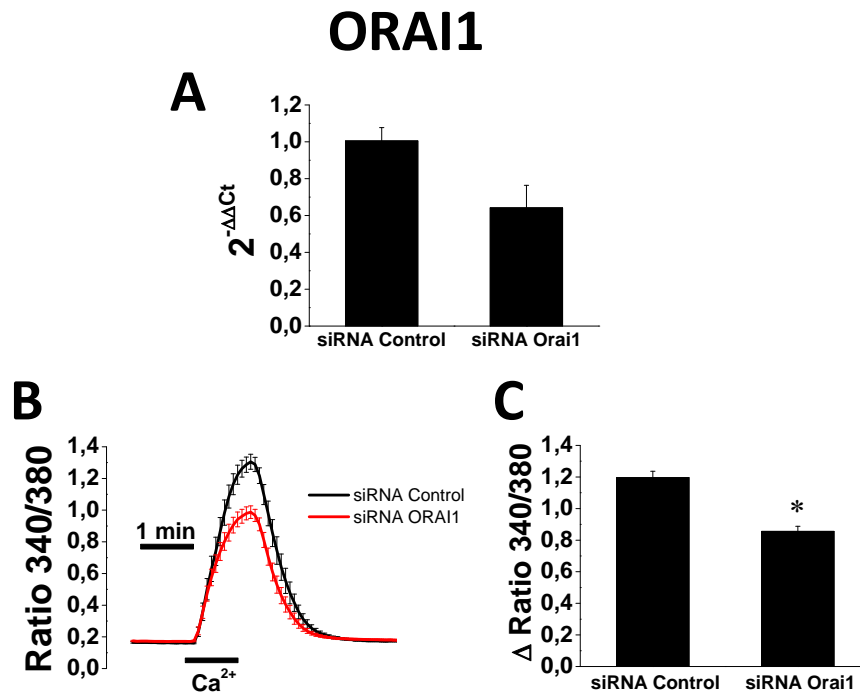


Figura 66. El silenciamiento de ORAI1 reduce la ECC en las células tumorales de colon. El silenciamiento de ORAI1 se lleva a cabo mediante la transfección de las células HT29 con siRNA. Las células fueron tratadas previamente con tapsigargina 1 μ M en medio libre de Ca^{2+} para, a continuación, inducir la ECC perfundiendo medio con Ca^{2+} 1 mM. A. qRT-PCR de *ORAI1* en células tumorales transfectadas con siRNA Control y siRNA ORAI1. La β -actina fue usada como gen de referencia (media \pm EEM, n=3 experimentos). B. Media \pm EEM de los registros de la ECC en células tumorales siRNA Control y siRNA ORAI1 (n=16 experimentos). El registro de la ECC tiene lugar mediante imagen de fluorescencia con fura-2/AM. C. Las barras muestran la media \pm EEM del incremento del ratio de los registros de la ECC (n=15 experimentos, *p<0,05).

Además de ORAI1, se ha descrito que el resto de isoformas de ORAI, ORAI2 y ORAI3 funcionan como canales de Ca^{2+} activados por depósitos (Mercer *et al.*, 2006). Así, puede que estas isoformas también participen en la ECC de las células tumorales de colon. Para comprobarlo, llevamos a cabo su silenciamiento en células HT29 mediante la transfección con siRNAs y utilizamos técnicas de imagen de fluorescencia para registrar la ECC (Fig. 67A-F). La reducción de la expresión de ambos *ORAI2* y *ORAI3* con los siRNAs es demostrada mediante qRT-PCR (Fig. 67A y B). El silenciamiento de ORAI2 no provoca ningún efecto en la ECC registrada en las células tumorales (Fig. 67C y E). El mismo resultado se obtiene en el caso del silenciamiento de ORAI3 en esas células (Fig. 67D y F). Por tanto, parece que ni ORAI2 ni ORAI3 están implicados en la ECC de las células tumorales de colon. Para asegurarnos de que el

efecto del silenciamiento de uno de estos canales es suplido por el otro realizamos un doble silenciamiento de los mismos.

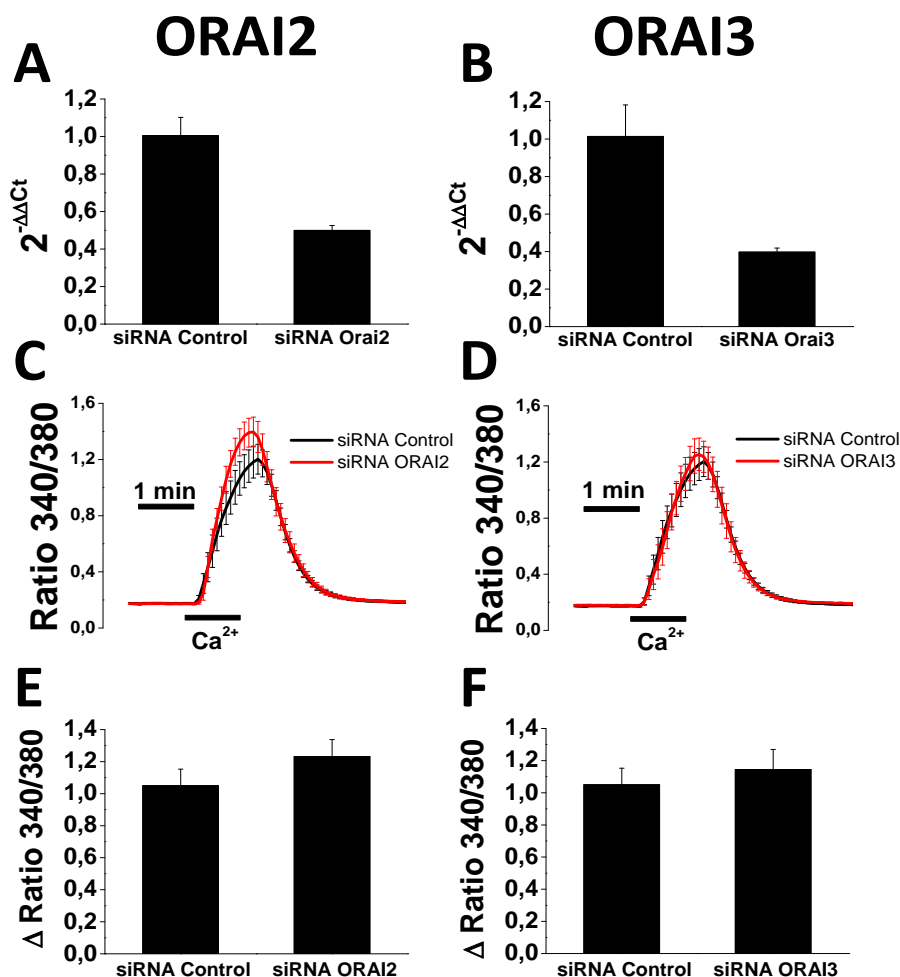


Figura 67. Los silenciamientos de ORAI2 y de ORAI3 no producen ningún efecto sobre la ECC de las células tumorales de colon. El silenciamiento de ORAI2, así como el de ORAI3 tienen lugar mediante la transfección de las células HT29 con siRNAs. Los resultados del silenciamiento de ambos canales son comparados con los del siRNA Control. Las células fueron tratadas previamente con taspigargina 1 μ M para inducir la ECC. A. qRT-PCR de *ORAI2* que muestra la reducción de la expresión de este gen mediante el silenciamiento con siRNA ORAI2. B. qRT-PCR de *ORAI3* que muestra la reducción de la expresión de este gen mediante el silenciamiento con siRNA ORAI3. La β -actina fue usada como gen de referencia en A y B. C y D. El registro de la ECC es llevado a cabo mediante imagen de fluorescencia con fura-2/AM. Media \pm EEM de los registros de la ECC en células tumorales con siRNA ORAI2 (C) y siRNA ORAI3 (D) (n=7 experimentos). E y F. Las barras muestran la media \pm EEM del incremento del ratio de los registros de la ECC en los que se silencia ORAI2 (E) y ORAI3 (F) (n=7 experimentos, *p<0,05).

En la figura 68 se muestra que la reducción de la expresión conjunta de ORAI2 y ORAI3 con siRNAs no produce ningún cambio significativo en la ECC registrada en las células tumorales. De esta forma, confirmamos que ORAI2 y ORAI3 no están implicados en la ECC de

esas células. Por consiguiente, ORAI1 es la única isoforma que participa en la ECC y puede contribuir a su aumento en las células de adenocarcinoma de colon.

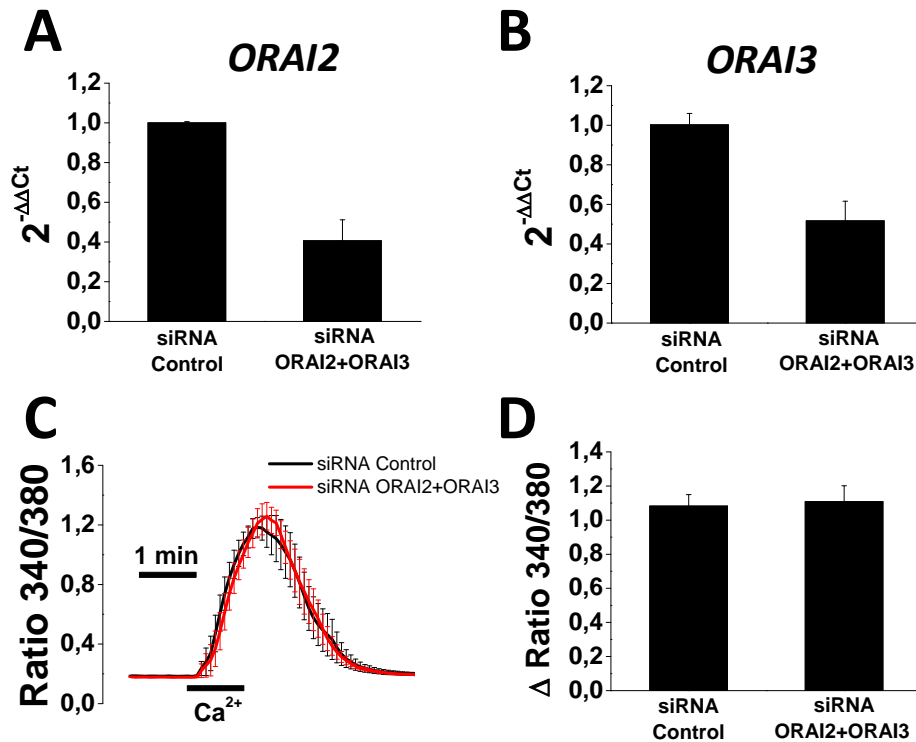


Figura 68. El silenciamiento doble de ORAI2 y ORAI3 no produce cambios en la ECC de las células normales de colon. Las células HT29 fueron transfectadas con siRNA ORAI2 y siRNA ORAI3 de forma conjunta. Los resultados del silenciamiento doble son comparados con los del siRNA Control. Las células fueron tratadas previamente con tapsigargina 1 μM para inducir la ECC. A y B. qRT-PCR de ORAI1 (A) y ORAI2 (B) que muestra la reducción de la expresión de ambos ORAIs consecuencia del silenciamiento doble. La β -actina fue usada como gen de referencia. C. El registro de la ECC tiene lugar mediante imagen de fluorescencia con fura-2/AM. Media \pm EEM de los registros de la ECC en células tumorales con siRNA ORAI2 y siRNA ORAI3 comparada con la del siRNA Control (n=5 experimentos). D. Las barras muestran la media \pm EEM del incremento del ratio de los registros de la ECC en los que se silencia conjuntamente ORAI2 y ORAI3 (n=5 experimentos, *p<0,05).

Otro canal considerado operado por depósitos que se encuentra presente en las células tumorales y que podría explicar el aumento de la ECC en las mismas con respecto a las células normales es el TRPC1. Por tanto, nos propusimos estudiar su participación en la ECC de las células HT29 y, para ello, silenciamos TRPC1, de nuevo, con siRNA en esas células (Fig. 69A-C). Una qRT-PCR permite comprobar la eficacia del silenciamiento de TRPC1 en las células HT29 tras la transfección con el siRNA (Fig. 69A). El registro de Ca^{2+} mediante imagen de fluorescencia muestra que no hay diferencias significativas entre la ECC de las células transfectadas con el siRNA TRPC1 y con el siRNA Control (Fig. 69B y C). Este resultado indica que el silenciamiento no produce ningún efecto en la entrada de Ca^{2+} inducida por tapsigargina de lo que se deduce que TRPC1 no está implicado en la ECC de las células tumorales de colon.

Por tanto, el incremento de expresión de TRPC1 en las células tumorales con respecto a las normales no contribuye al aumento de la ECC en estas células.

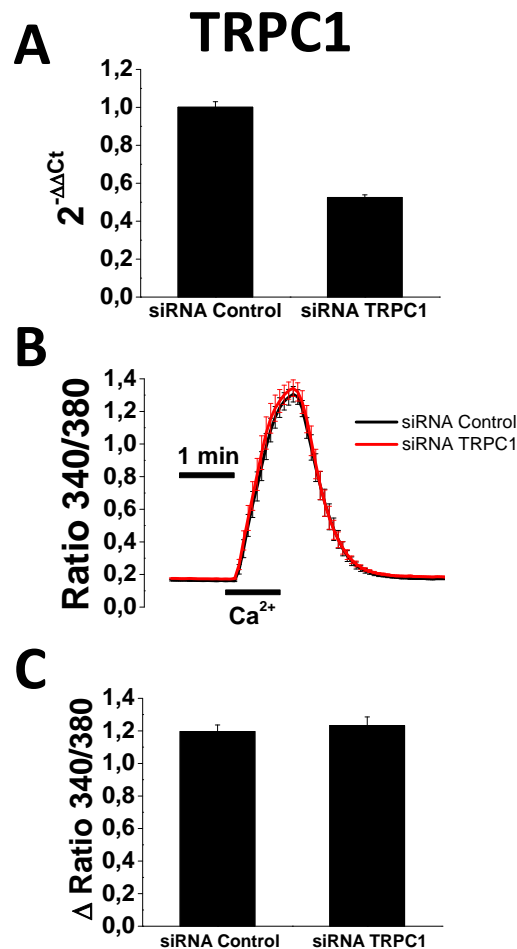


Figura 69. El silenciamiento de TRPC1 no modifica la ECC de las células de adenocarcinoma de colon. El silenciamiento de TRPC1 se lleva a cabo mediante la transfección de las células HT29 con siRNA. Las células fueron tratadas previamente con tapsigargina 1 μ M para inducir la ECC. A. qRT-PCR de *TRPC1* en células tumorales transfectadas con siRNA Control y siRNA TRPC1 (media \pm EEM, n=3). La β -actina fue usada como gen de referencia. B. El registro de la ECC tiene lugar mediante imagen de fluorescencia con fura-2/AM. Media \pm EEM de los registros de la ECC en células tumorales con siRNA Control y siRNA TRPC1 (n=15-16 experimentos). C. Las barras muestran la media \pm EEM del incremento del ratio de los registros de la ECC en los que se silencia TRPC1 (n=15-16 experimentos, *p<0,05).

4.4. ORAI1 y TRPC1 intervienen en la I_{SOC} de las células tumorales de colon

Las diferencias observadas en la I_{SOC} de las células normales y tumorales de colon nos hacen pensar que esta corriente podría estar mediada por canales distintos en ambos tipos celulares. Anteriormente, mostramos que la I_{SOC} de las células normales estaba mediada por ORAI1 y no por TRPC1 lo que confirma que esa corriente se trata de una I_{CRAC} . Ahora, nos planteamos estudiar la participación de ORAI1 y TRPC1 en la I_{SOC} de las células tumorales de

colon. Con este propósito, silenciamos ambos canales iónicos en las células HT29 con siRNA y registramos I_{SOc} mediante *patch-clamp* planar en la configuración *whole cell* fijando el voltaje (Fig 70A-D). Si recordamos, en las células tumorales encontrábamos una corriente parecida a I_{CRAC} que presenta solo un componente entrante y otra corriente I_{SOc} no selectiva formada en su mayoría por un componente saliente, pero también, por un componente entrante. El silenciamiento de ORAI1 provoca una reducción tanto en la amplitud del componente entrante como del saliente (Fig. 70A, B y D). Igualmente, la reducción de la expresión de TRPC1 produce una disminución en la amplitud de ambos componentes de la I_{SOc} , siendo mayor el efecto sobre el componente saliente (Fig. 70A, C y D). Este hecho sugiere que ORAI1 y TRPC1 son canales clave en la I_{SOc} de las células tumorales, al contrario que en las células normales, cuya corriente solo depende de ORAI1. Estos resultados contrastan con los encontrados en el estudio del efecto del silenciamiento de los canales sobre la ECC de las células tumorales puesto que mostraban que solo ORAI1 participa en la entrada de Ca^{2+} .

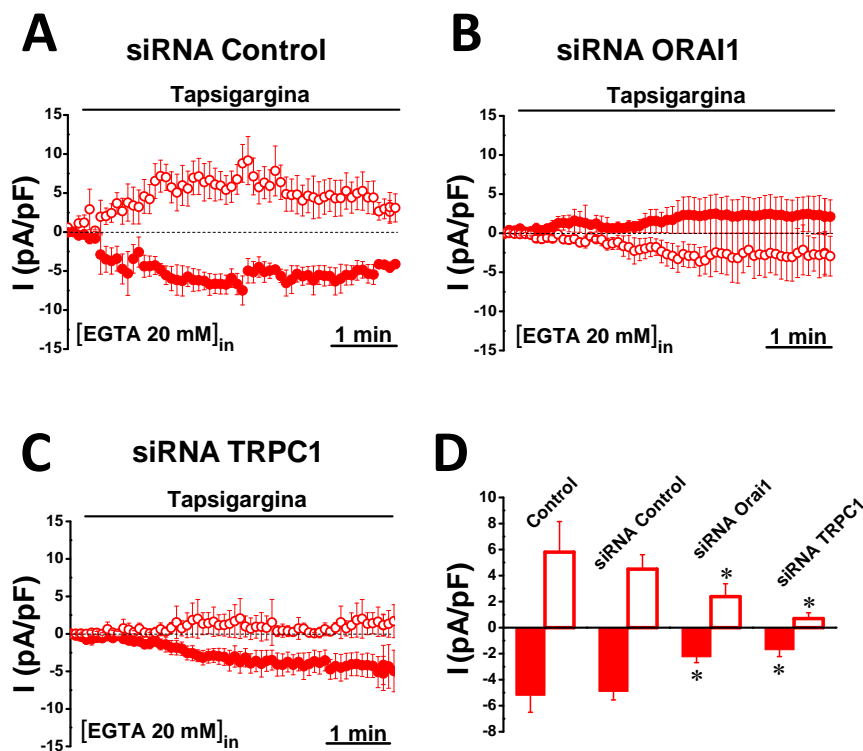


Figura 70. Los silenciamientos de ORAI1 y TRPC1 reducen tanto el componente entrante como el saliente de la I_{SOc} en las células tumorales de colon. Las células HT29 fueron transfectadas con siRNA Control, siRNA ORAI1 y siRNA TRPC1. La corriente fue registrada mediante *patch-clamp* planar en la configuración *whole cell* y *voltage clamp*. La I_{SOc} fue activada con tapsigargina 1 μ M. A. Media \pm EEM de los registros curso temporales de la I_{SOc} a -80 mV (componente entrante) y +80 mV (componente saliente) de 13 células tumorales transfectadas con siRNA Control. B. Media \pm EEM de los registros curso temporales de la I_{SOc} a -80 mV (componente entrante) y +80 mV (componente saliente) de 19 células tumorales transfectadas con siRNA ORAI1. C. Media \pm EEM de los registros curso temporales de la I_{SOc} a -80 mV (componente entrante) y +80 mV (componente saliente) de 17 células tumorales transfectadas con siRNA TRPC1. D. Amplitud máxima de la I_{SOc} a -80 mV en células no silenciadas (control) y células transfectadas con siRNA Control, siRNA ORAI1 y siRNA TRPC1 (media \pm EEM, n=13-19 células, * $p < 0,05$).

4.5. Papel de STIM1 y STIM2 en la entrada capacitativa de Ca^{2+} de las células tumorales de colon

Previamente describimos que tanto STIM1 como STIM2 participan en la ECC de los colonocitos normales. Por lo que, a continuación nos propusimos estudiar si ambos sensores de Ca^{2+} ejercen una función similar en la ECC de las células de adenocarcinoma de colon. Para ello, como en los experimentos con las células normales, silenciamos ambos STIMs por separado con siRNA, en este caso, en las células HT29 (Fig. 71A-F). El silenciamiento de *STIM1* y *STIM2* se confirma mediante qRT-PCR (Fig. 71A y B). La ECC es inducida por taspigargina y registrada mediante técnicas de imagen de fluorescencia. Encontramos que el silenciamiento de STIM1 provoca una reducción de la ECC en las células tumorales (Fig. 71C y E). En cuanto al silenciamiento de STIM2, la reducción de la expresión de este sensor de Ca^{2+} no conduce a ningún cambio significativo de la ECC en las células tumorales (Fig. 71D y F). Por tanto, los resultados obtenidos sugieren que solo STIM1 está implicado en la ECC de las células de adenocarcinoma de colon.

La reducción de la expresión de solo uno de los sensores de Ca^{2+} puede provocar que la pérdida de función de éste pueda ser suplida al menos en parte por el otro. En este caso particular, la reducción de la función de STIM2 en la ECC podría ser compensada por STIM1, ya que el silenciamiento de STIM2 no produjo ningún efecto en la entrada de Ca^{2+} . Por consiguiente, nos preguntamos si esta posibilidad tiene lugar en los experimentos de silenciamiento anteriores. Para comprobarlo, llevamos a cabo un silenciamiento doble en las células tumorales de colon. Los registros de Ca^{2+} citosólico indican que la reducción conjunta de la expresión de STIM1 y STIM2 disminuye de manera significativa la ECC en esas células (Fig. 72A-D). Además, esa disminución de la ECC es sustancialmente mayor a la causada tan solo por el silenciamiento de STIM1. Este resultado podría ser consecuencia de que el efecto de la disminución de la expresión de STIM2 es compensada por STIM1 en las células tumorales de colon. Por tanto, STIM2 también puede participar en la ECC de las células tumorales, sin embargo, su función puede ser llevada a cabo por STIM1 y no al contrario.

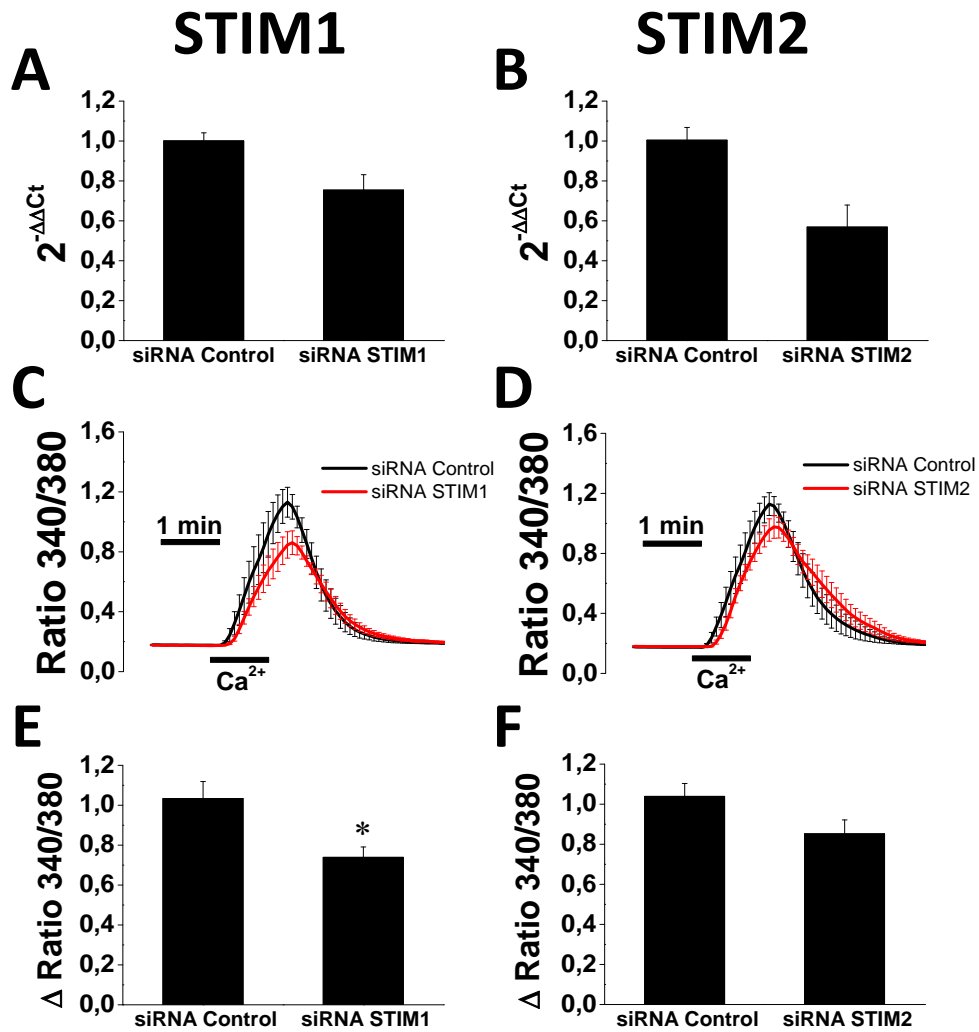


Figura 71. El silenciamiento de STIM1 reduce la ECC de las células tumorales de colon, mientras que el de STIM2 no produce ningún efecto. El silenciamiento de STIM1 y STIM2 se lleva a cabo mediante la transfección de las células HT29 con siRNAs. Los resultados del silenciamiento de ambos canales son comparados con los del siRNA Control. Las células fueron tratadas previamente con taspigargina 1 μ M para inducir la ECC. A. qRT-PCR de *STIM1* en células normales transfectadas con siRNA Control y siRNA STIM1 (n=3 experimentos). La β -actina fue usada como gen de referencia (media \pm EEM, n=3 experimentos). B. qRT-PCR de *STIM2* en células normales transfectadas con siRNA Control y siRNA STIM2 (n=3 experimentos). La β -actina fue usada como gen de referencia (media \pm EEM, n=3 experimentos). C y D. El registro de la ECC tiene lugar mediante imagen de fluorescencia con fura-2/AM. Media \pm EEM de los registros de la ECC en células tumorales con siRNA STIM1 (C) y siRNA STIM2 (D) (n=6-10 experimentos). E y F. Las barras muestran la media \pm EEM del incremento del ratio de los registros de la ECC en los que se silencia STIM1 (E) y STIM2 (F) (n=6-10 experimentos, *p<0,05).

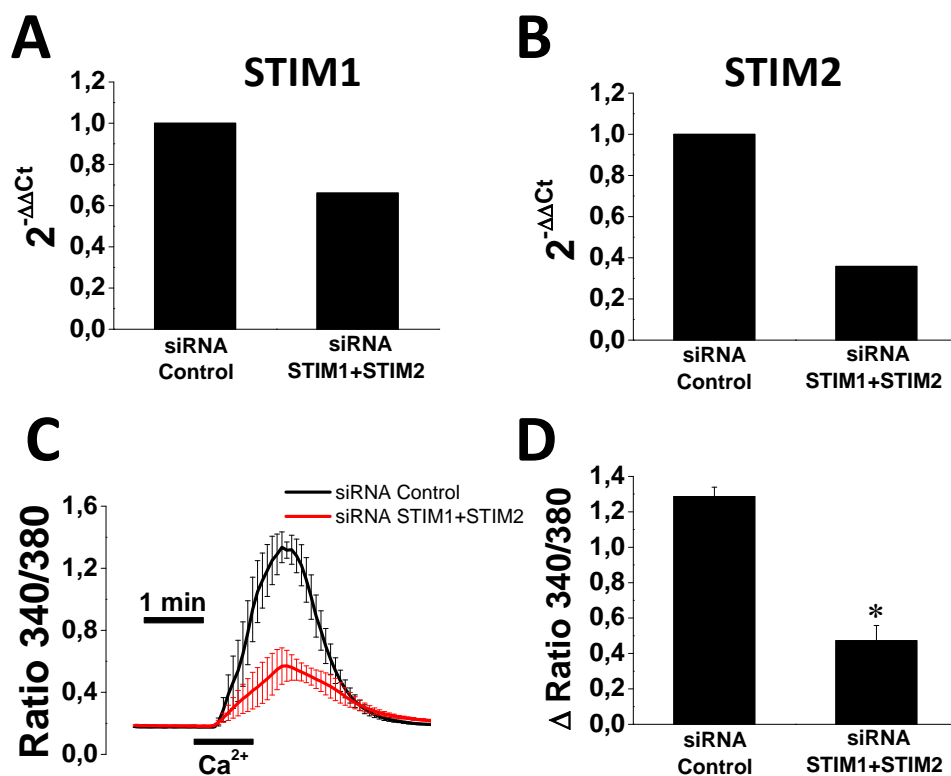


Figura 72. El silenciamiento doble de *STIM1* y *STIM2* disminuye significativamente en la ECC de las células tumorales de colon. Las células HT29 son transfectadas con siRNA *STIM1* y siRNA *STIM2* de forma conjunta. Los resultados del silenciamiento doble son comparados con los del siRNA Control. Las células fueron tratadas previamente con tapsigargina 1 μ M para inducir la ECC. A y B. qRT-PCR de *STIM1* (A) y *STIM2* (B) que muestra la reducción de la expresión de ambos STIMs consecuencia del silenciamiento doble. La β -actina fue usada como gen de referencia. C. El registro de la ECC es llevado a cabo mediante imagen de fluorescencia con fura-2/AM. Media \pm EEM de los registros de la ECC en células tumorales con siRNA *STIM1* y siRNA *STIM2* comparada con la del siRNA Control (n=4 experimentos). D. Las barras muestran la media \pm EEM del incremento del ratio de los registros de la ECC en los que se silencia conjuntamente *STIM1* y *STIM2* (n=4 experimentos, *p<0,05).

4.6. *STIM2* participa en la regulación del contenido de Ca²⁺ de los depósitos y en la resistencia a la muerte celular

La elevada reducción de la expresión de *STIM2* observada en las células tumorales de colon con respecto a las normales induce a pensar que esta proteína puede funcionar como un supresor tumoral. Por tanto, nos propusimos estudiar cuál es el papel de *STIM2* en la tumorigénesis del cáncer de colon.

Se ha descrito que *STIM2* es importante en la regulación del contenido de Ca²⁺ de los depósitos (Brandman *et al.*, 2007). Puesto que las células tumorales presentan una menor expresión de *STIM2* que las células normales, esta característica podría contribuir a que el contenido de Ca²⁺ de los depósitos sea, como encontramos anteriormente, inferior en las

células tumorales. Para contrastar esta hipótesis, decidimos estudiar el efecto del silenciamiento de STIM2 sobre el contenido de Ca^{2+} de los depósitos. Para ello, utilizamos como modelo a las células NCM460, en las cuales, STIM2 se sobreexpresa con respecto a las células HT29 y donde el contenido de Ca^{2+} es más elevado. Por tanto, transfectamos las células normales con siRNA Control y siRNA STIM2 y estimamos el contenido de Ca^{2+} de los depósitos con ionomicina en medio libre de Ca^{2+} (Fig. 73A y B). Así, observamos que el incremento de Ca^{2+} inducido por ionomicina es menor en el caso del silenciamiento de STIM2 lo que sugiere que la reducción de la expresión de STIM2 en las células normales de colon provoca una disminución en el contenido de Ca^{2+} de los depósitos.

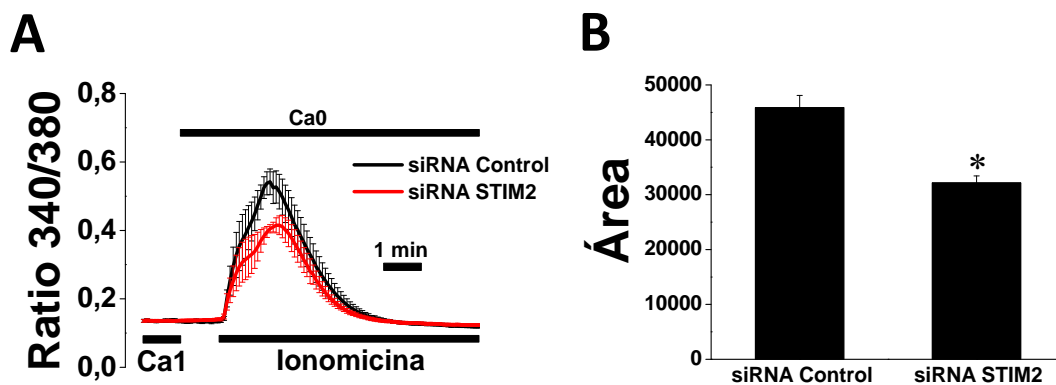


Figura 73. El silenciamiento de STIM2 reduce el contenido de Ca^{2+} de los depósitos en las células normales de colon. El silenciamiento de STIM2 se lleva a cabo mediante la transfección de las células NCM460 con siRNA. El contenido de Ca^{2+} de los depósitos es registrado en células NCM460 con ionomicina 400 nM en medio libre de Ca^{2+} (Ca0). Se utiliza fura-4F/AM para registrar el Ca^{2+} citosólico. A. Media \pm EEM de los registros del contenido de Ca^{2+} de los depósitos en células normales con siRNA STIM2 comparada con la del siRNA Control (n=8 experimentos). Las barras muestran la media \pm EEM del área bajo la curva de los registros del contenido de Ca^{2+} de los depósitos de las células normales silenciadas (n=8 experimentos, *p<0,05).

El contenido de Ca^{2+} de los depósitos puede influir en la resistencia a la muerte celular, ya que cuanto mayor es ese contenido, más elevada es la cantidad de Ca^{2+} disponible para que se induzca la apoptosis en la célula (Pinton *et al.*, 2008). Por tanto, estudiamos si STIM2 controla la muerte celular a través de su papel en la regulación del contenido de Ca^{2+} de los depósitos. Para lo cual, silenciamos de nuevo STIM2 en las células normales y, a continuación, llevamos a cabo un experimento de muerte celular inducida por estrés oxidativo. Así, tratamos las células con H_2O_2 , las marcamos con anexina V y yoduro de propidio y las analizamos mediante citometría de flujo. La figura 74 muestra que el silenciamiento de STIM2 reduce la diferencia entre el porcentaje de muerte celular inducida por H_2O_2 y el control. Como consecuencia, la reducción de la expresión de STIM2 en las células normales incrementa su resistencia a la muerte inducida por estrés oxidativo. Por tanto, estos resultados sugieren que STIM2 controla la resistencia a la muerte celular a través de la regulación del contenido de Ca^{2+}

de los depósitos. Así, durante la tumorigénesis la reducción de su expresión provoca un incremento de la resistencia a la muerte en las células tumorales de colon.

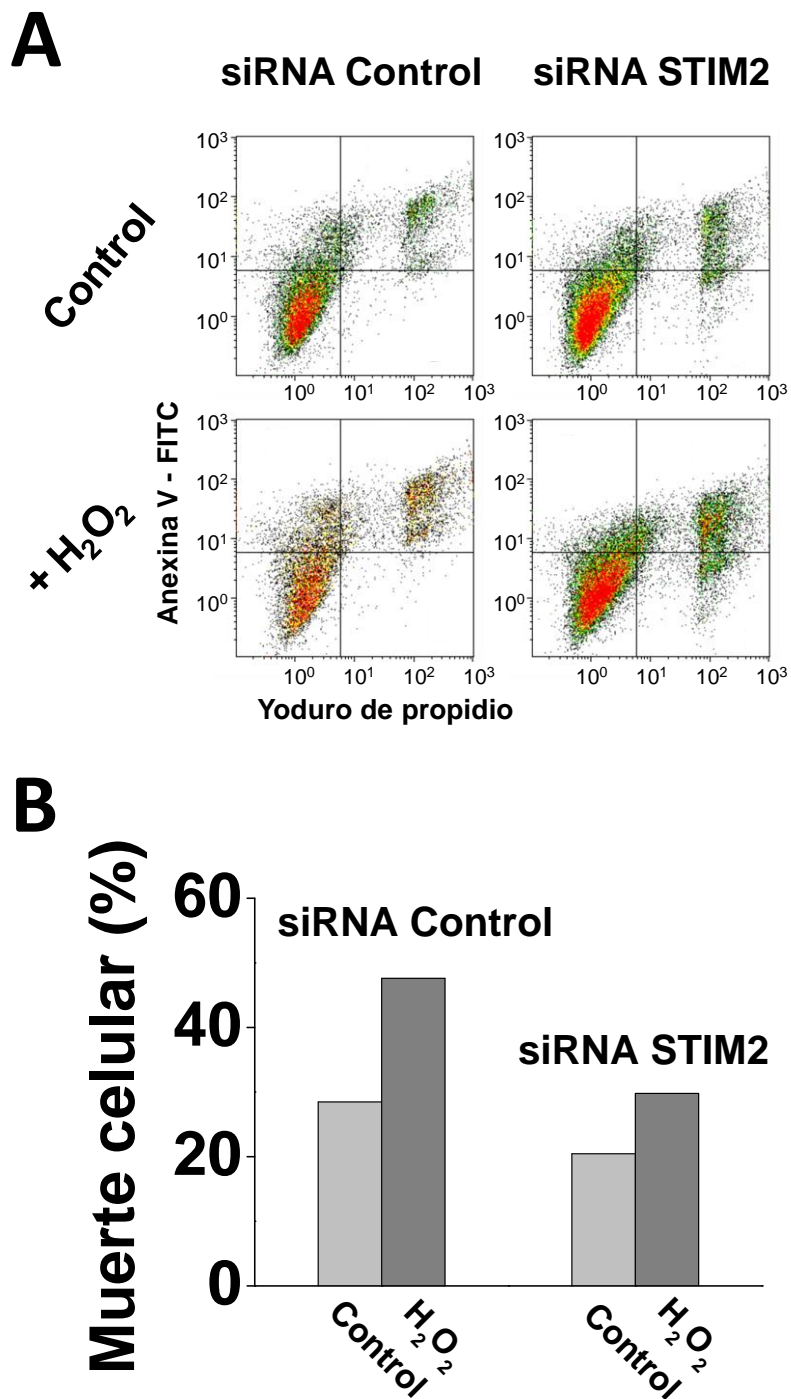


Figura 74. El silenciamiento de STIM2 aumenta la resistencia a la muerte en las células normales de colon. El silenciamiento de STIM2 tiene lugar mediante la transfección de las células NCM460 con siRNA. La muerte celular se induce mediante estrés oxidativo con H₂O₂ 1 mM durante 30 min. A. Ensayo representativo de muerte celular de doble marcaje con anexina V-FITC y yoduro de propidio analizado mediante citometría de flujo. B. Las barras muestran el porcentaje de muerte de células normales transfectadas con siRNA Control o siRNA STIM2 tratadas y no tratadas con H₂O₂ correspondiente al ensayo representado en A.

V. DISCUSIÓN

Hace unos años, nuestro grupo demostró que el salicilato, el principal metabolito de la aspirina, inhibía la ECC y la proliferación celular en la línea de adenocarcinoma de colon humano HT29 a través de un mecanismo dependiente de la mitocondria (Núñez *et al.*, 2006; Valero *et al.*, 2008). Puesto que existen múltiples evidencias que indican que la aspirina y otros AINEs podrían proteger frente al cáncer de colon, este trabajo pretérito sugería que la ECC podría ocupar un lugar relevante en la tumorigénesis del cáncer colorrectal lo que indicaba la necesidad de estudiar esta vía de entrada de Ca^{2+} en células tumorales y sus posibles cambios respecto a las células normales. Durante, el inicio y el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral, se han ido acumulando evidencias que indican que el Ca^{2+} intracelular parece tener un papel clave en la carcinogénesis. En esta tesis doctoral nos propusimos estudiar el posible remodelado del transporte de Ca^{2+} en el cáncer de colon, sus bases moleculares y sus consecuencias funcionales. El tema es tan amplio que nos hemos centrado principalmente en el papel de la ECC en la tumorigénesis. Para el estudio, utilizamos líneas celulares de epitelio de colon normal y de adenocarcinoma de colon.

El primer hallazgo fue encontrar que la ECC inducida por taspigargina es mayor en las líneas celulares tumorales que en las normales (Fig. 75). Este incremento de la ECC es reportado por primera vez en células de cáncer de colon y es consistente con el descrito recientemente en otros tumores como el glioblastoma (Motiani *et al.*, 2013), el melanoma (Umemura *et al.*, 2014) y el cáncer escamoso esofágico (Zhu *et al.*, 2014). Además, mostramos una correlación positiva entre el grado de proliferación celular y la amplitud de la ECC de todas las líneas celulares estudiadas. Estos datos sugieren que cambios en la ECC contribuyen al aumento de la tasa de proliferación de las células de adenocarcinoma colorrectal (Fig. 75). La implicación de la ECC en la proliferación de estas células fue previamente descrita por nuestro laboratorio al observar que antagonistas de esta entrada de Ca^{2+} como BTP2 o 2-APB inhiben la proliferación celular (Nuñez *et al.*, 2006; Valero *et al.*, 2008). Además, demostramos en su día la perfecta correlación entre la inhibición de la ECC y la inhibición de la proliferación celular en las mismas células. Por otro lado, la ECC también ha sido implicada en otras características de las células tumorales como son la capacidad de migración e invasión. Nuestros resultados muestran que 2-APB inhibe la invasión de las células HT29 en un ensayo de Matrigel. Por tanto, los datos indican que el aumento de la entrada capacitativa de Ca^{2+} o ECC podría contribuir a la proliferación excesiva y la capacidad invasiva de las células de adenocarcinoma de colon humano.

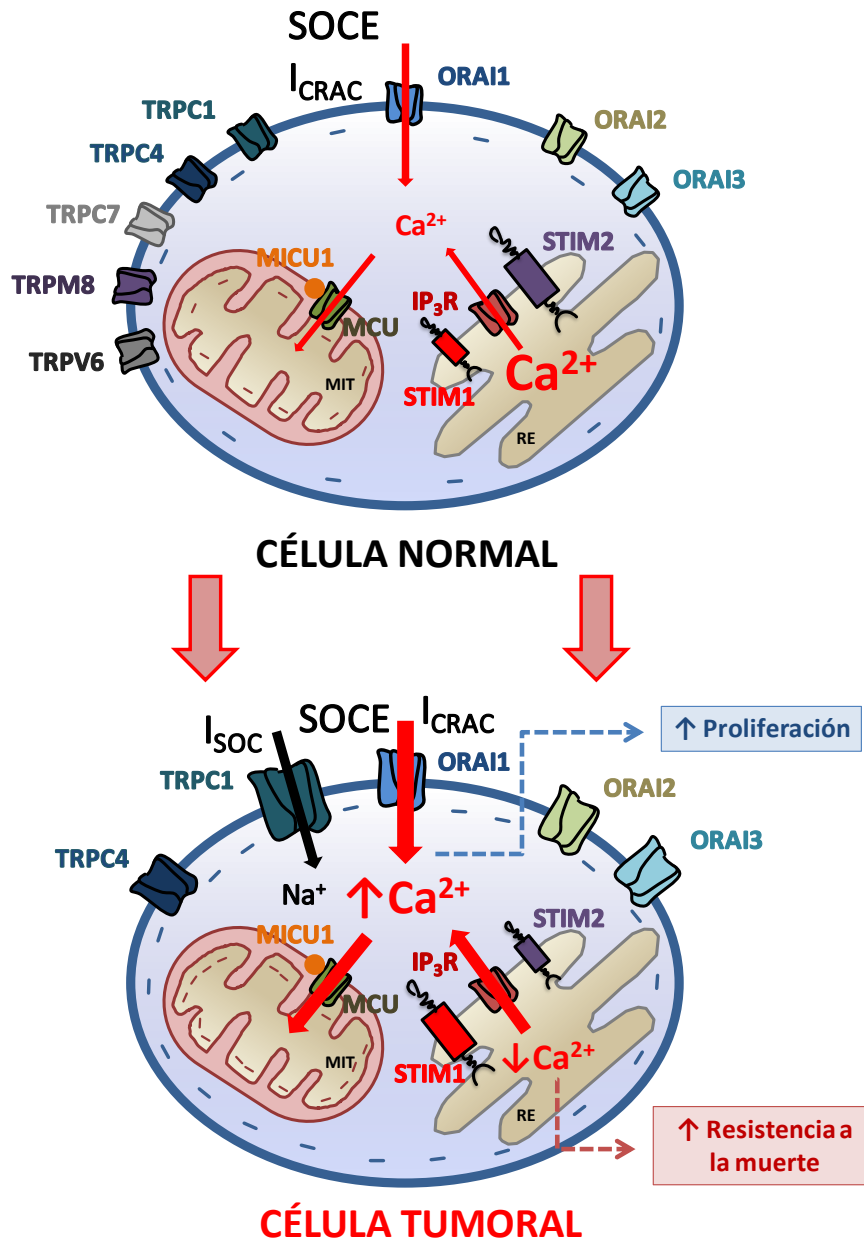


Figura 75. Cambios funcionales y moleculares observados en el remodelado del transporte de Ca^{2+} en el cáncer de colon. Entre los cambios funcionales que tienen lugar en las células tumorales destacan el aumento de la ECC, de la I_{CRAC} , de la captación mitocondrial de Ca^{2+} , de la liberación de Ca^{2+} , de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basal, del potencial de membrana, así como la aparición de una I_{SOC} no selectiva y la reducción del contenido del Ca^{2+} de los depósitos. El incremento de la captación mitocondrial de Ca^{2+} puede ser debido al aumento del potencial mitocondrial. El incremento de la ECC se traduce en un aumento de la proliferación y la disminución del contenido del Ca^{2+} de los depósitos, en un incremento de la resistencia a la muerte celular. Entre los cambios moleculares se produce la pérdida de expresión de TRPC7, TRPM8 y TRPV6, el incremento de ORAI1, ORAI2, ORAI3, TRPC1, TRPC4 y STIM1 y la reducción de STIM2. El aumento de la expresión de ORAI1 y de STIM1 puede explicar el incremento de la ECC y de la I_{CRAC} . Además, el incremento de TRPC1 conjuntamente con el de STIM1 puede ser responsable de la aparición de la I_{SOC} . Por otra parte, el descenso en el contenido de Ca^{2+} podría ser debido a la disminución de la expresión de STIM2. MIT, mitocondria y RE, retículo endoplásmico.

A continuación, nos planteamos estudiar los mecanismos por los cuales la ECC se incrementa en las células de cáncer de colon. Para ello, decidimos usar como modelos de células normales y tumorales a las células NCM460 y HT29, respectivamente, los cuales han sido validados recientemente desde un punto de vista metabólico (Acarraz-Vizan *et al.*, 2013). Asimismo, descartamos utilizar las NCM356 como modelo de células normales en experimentos sucesivos puesto que su proliferación es superior a la de las células NCM460 y se aproxima a la de las células tumorales. Además, son positivas para algunos marcadores tumorales como mutante p53 y TAG72 (Stauffer *et al.*, 1995). Por otro lado, apenas hay trabajos realizados con esta línea celular, sin embargo, las células NCM460 han sido ampliamente utilizadas.

El estudio de la ECC inducida por taspigargina no es una forma muy fisiológica de inducir esta entrada de Ca^{2+} , por lo que, también, decidimos estudiar esta entrada de Ca^{2+} con agonistas como ATP y carbacol que movilizan Ca^{2+} de depósitos intracelulares tras la activación de receptores metabotrópicos. El uso de estos agonistas nos llevó a una observación sorprendente: los agonistas fisiológicos inducen liberación de Ca^{2+} en células normales y tumorales, pero solo inducen entrada de Ca^{2+} en las células tumorales. Además, la liberación de Ca^{2+} inducida por ATP o carbacol es mucho mayor en las células tumorales de colon que en las normales, a pesar de que, paradójicamente, el contenido de Ca^{2+} de los depósitos es sensiblemente inferior en las tumorales con respecto a las normales (Fig. 75). La mayor liberación podría deberse a mayor expresión de receptores para ATP y carbacol que darían lugar, por tanto, a una mayor producción de IP_3 . Sin embargo, en condiciones controladas en las que se generó la misma cantidad de IP_3 , las células tumorales todavía liberaban más Ca^{2+} que las células normales. Ello podría ser debido a una expresión diferencial de receptores de IP_3 o una diferente sensibilidad al agonista IP_3 . Estos extremos deben ser investigados todavía, pero en otros tipos celulares los IP_3R podrían contribuir a las características tumorales (Szatkowsky *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2010; Prevarskaya *et al.*, 2014).

El análisis cuantitativo del Ca^{2+} liberado por agonistas respecto al contenido total de Ca^{2+} estimado con el ionóforo ionomicina, sugiere que las células normales tienen unos depósitos de Ca^{2+} mucho mayores que las células tumorales, donde éstos están parcialmente depletados. Además, puesto que los agonistas fisiológicos liberan mucha menor cantidad de Ca^{2+} que en las células tumorales, es muy posible que el umbral de activación de la ECC no se alcance con los agonistas fisiológicos en las células normales. Sin embargo, en las células tumorales, con un nivel de llenado mucho más cerca al del umbral, cualquier estímulo es suficiente para activar la ECC. Por tanto, el bajo nivel de llenado de los depósitos favorece la ECC y, secundariamente, la excesiva proliferación y puede que la invasión. Por otro lado, se ha descrito que un elevado nivel de llenado de los depósitos puede promover muerte celular. En este caso, el depletado parcial de los depósitos de las células tumorales podría aumentar la resistencia a la muerte. Así, una reducción en el contenido de Ca^{2+} de los depósitos previene la inducción de la apoptosis en la célula, ya que evita la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial (Smali *et*

al., 2013). De manera consistente, mostramos que las células tumorales de colon son más resistentes a la apoptosis que las células normales (Fig. 75).

Consistentemente, observamos que la captación mitocondrial de Ca^{2+} es superior en las células de adenocarcinoma de colon que en las normales, tanto si el Ca^{2+} proviene de la ECC, de la liberación o, incluso, en células permeabilizadas donde se simula el mismo incremento de Ca^{2+} en ambos tipos celulares (Fig. 75). La mitocondria por su capacidad para captar Ca^{2+} regula la activación e inactivación de la ECC actuando principalmente como un tampón. Así, las mitocondrias pueden retrasar la inactivación de los receptores de IP_3 y el relleno de los depósitos lo que favorece la activación de la ECC y, además, dificulta la inactivación de los canales CRAC (Watson y Parekh, 2012). De esta forma, la mitocondria podría favorecer el aumento de la entrada de Ca^{2+} en las células tumorales, retirando más Ca^{2+} que en las células normales de colon. Además, mostramos que el potencial mitocondrial de las células tumorales es más negativo que en las normales (Fig. 75). Este incremento en el potencial mitocondrial podría explicar el aumento de la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria de las células tumorales, ya que la fuerza motriz con la que se transporta el Ca^{2+} hacia este orgánulo subcelular se incrementa en esas células. El aumento del potencial mitocondrial puede ser debido a la sobreexpresión del factor de la H^+ -ATP sintasa mitocondrial 1 (IF1; del inglés, ATPase inhibitory factor 1) en el cáncer de colon (Sánchez-Aragó *et al.*, 2013). Las células tumorales obtienen la energía principalmente de la glucólisis aeróbica a lo que se le denominó el efecto Warburg. Así, estas células transforman la mayoría de la glucosa en lactato independientemente de la disponibilidad de O_2 (Vander Heiden *et al.*, 2009). Recientemente, este hecho se ha explicado por la sobreexpresión del IF1 en el cáncer, un factor que inhibe la H^+ -ATP sintasa de la mitocondria lo que limita la disipación del potencial mitocondrial que ocurriría durante la síntesis de ATP pero que está ausente o es muy limitada en las células tumorales. Es decir, la inhibición de la H^+ -ATP sintasa por la sobreexpresión de IF1 en el cáncer de colon disminuye el bombeo de H^+ al interior de la mitocondria lo que podría aumentar el potencial mitocondrial de las células tumorales (Sánchez-Cenizo *et al.*, 2010). Por tanto, el aumento del potencial mitocondrial en las células tumorales de colon con respecto a las normales permite a la mitocondria captar más Ca^{2+} incrementando su eficiencia para regular la ECC.

Por otra parte, las diferencias en la captación mitocondrial podrían ser debidas, también, a un remodelado en la expresión del *MCU* y de *MICU1*. Una mayor expresión de *MCU* explicaría el incremento de la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria de las células tumorales. Así como, un aumento de *MICU1* provocaría un incremento de la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria a consecuencia de un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, en cambio, produciría una disminución de la captación a la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basal (Marchi y Pinton, 2014). Sin embargo, no obtenemos diferencias significativas en la expresión ni de *MCU* ni de *MICU1* entre células normales y tumorales de colon (Fig. 75), por lo que los cambios en la captación mitocondrial no son debidos a una variación en su expresión.

Por otro lado, mostramos que la $[Ca^{2+}]_C$ basal es superior en las células tumorales de colon que en las normales. Este hecho puede ser debido al incremento tanto de la ECC como de la liberación de Ca^{2+} en las células tumorales. Por otro lado, estudiamos el potencial de membrana en reposo y notamos que éste es más negativo en las células tumorales que en las normales (Fig. 75). Este factor podría contribuir al incremento de la ECC en las células tumorales. El estudio de la ECC mediante imagen de fluorescencia está condicionado, por tanto, por el potencial de membrana de las células normales y tumorales de colon. Así, decidimos estudiar las corrientes operadas por depósitos en ambos tipos celulares en condiciones de *whole-cell* y *voltage-clamp* o fijación de voltaje. Además, el estudio de la I_{SOC} nos aportó indicios interesantes sobre cuáles podrían ser los componentes moleculares que median la ECC en cada caso. Los resultados revelaron que tanto las células normales como las tumorales presentan una corriente I_{CRAC} caracterizada por su alta selectividad a Ca^{2+} , independencia de voltaje, pequeño tamaño, gran rectificación entrante y sensibilidad a La^{3+} y bajas concentraciones de 2-APB. Sin embargo, la densidad de corriente era diferente en ambos tipos celulares, siendo la I_{CRAC} de las células normales de menor tamaño que la de las células de adenocarcinoma de colon (Fig. 75).

Por otro lado, observamos que en las células tumorales aparecía otra corriente operada por depósitos, una I_{SOC} no selectiva, la cual no está presente en las células normales (Fig. 75). La existencia de diferentes I_{SOC} en el mismo tipo celular ha sido reportada en otras ocasiones (Gusev *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2011; Skopin *et al.*, 2013). En cambio, es la primera vez que se observa un remodelado de la I_{SOC} en el cáncer. Las diferencias en las corrientes operadas por depósitos indican que puede haber diferencias de expresión de los componentes moleculares de la ECC entre las células normales y tumorales.

La I_{CRAC} en las células normales y tumorales puede estar mediada por cualquiera de los canales de la familia ORAI o por una combinación de ellos, ya que se ha descrito que todos pueden funcionar como canales CRAC (Prakriya *et al.*, 2006; Yeromin *et al.*, 2006; Mercer *et al.*, 2006; Lis *et al.*, 2007). Sin embargo, la inhibición de esta corriente por el 2-APB descarta la implicación de ORAI3, puesto que se ha reportado que la corriente mediada por el mismo es potenciada por ese agonista (Lis *et al.*, 2007). Además, la I_{CRAC} no fue alterada en ausencia de Na^+ extracelular y fue reducida al sustituir el Ca^{2+} por Ba^{2+} lo que demuestra su alta selectividad a Ca^{2+} y sugiere que esta corriente está mediada al menos por Orai1 (Dehaven *et al.*, 2007; Lis *et al.*, 2007).

En cuanto a la corriente I_{SOC} no selectiva a Ca^{2+} presente en las células tumorales de colon, por sus características podría estar mediada por alguno o varios integrantes de la superfamilia de los TRPs. La baja selectividad a Ca^{2+} y la relación corriente-voltaje aproximadamente lineal, así como el potencial de reversión próximo a 0 mV es similar a la mediada por TRPC1 por lo que sería posible su implicación en la misma (Lui *et al.*, 2003).

Incluso, esta corriente no selectiva podría estar llevada a cabo por la formación de heterómeros TRPC1/TRPC3 (Lui *et al.*, 2005) o TRPC1/TRPV4 (Ma *et al.*, 2011b).

Para determinar los participantes de la ECC en células normales y tumorales llevamos a cabo un detallado estudio a nivel molecular. Para ello, estudiamos la expresión de diferentes canales y sensores de Ca^{2+} con la finalidad de averiguar directamente cuáles son los componentes moleculares de la ECC y de las I_{SOC} presentes en las células normales y tumorales de colon. Para ello, seleccionamos una serie de candidatos que previamente han sido relacionados con la ECC y/o la I_{SOC} . Entre ellos, se encuentran los integrantes de la familia de los TRPCs (Potier y Trebak, 2008; Cheng *et al.*, 2013), TRPV4 (Ma *et al.*, 2011b), TRPV6 (Vanden Abeele *et al.*, 2003), TRPM8 (Thebault *et al.*, 2005) y todas las isoformas de ORAI y STIM (Potier y Trebak, 2008). Encontramos que *TRPC7*, *TRPV6* y *TRPM8* solo se expresan en las células normales de colon (Fig. 75). Como consecuencia, estos canales no podrían explicar el incremento de la ECC en las células tumorales ni las diferencias en la I_{SOC} entre ambos tipos celulares. En cambio, la ausencia de su expresión puede estar relacionada con una pérdida de función en las células tumorales. En el caso de TRPV6, se ha descrito que tiene un papel fisiológico importante en el transporte transcelular del Ca^{2+} en algunos epitelios absortivos intestinales, entre los que destaca el epitelio del colon (Peng *et al.*, 2000).

TRPC1, *TRPC4* y las isoformas de *ORAI* y *STIM* se expresan tanto en las células normales como en las tumorales. A nivel de mRNA, la expresión de *TRPC1*, *ORAI2*, *STIM1* y *STIM2* es superior en las células tumorales con respecto a las normales y la de *TRPC4*, *ORAI1*, *ORAI2* y *ORAI3* no varía significativamente. Sin embargo, a nivel de proteína, se sobreexpresan todos ellos en las células tumorales excepto *STIM2*, cuya expresión se reduce (Fig. 75). Por tanto, el incremento de la ECC podría ser debido al aumento de la expresión de *TRPC1*, *TRPC4*, *ORAI1-3* y *STIM1*. Además, puesto que sabemos que las isoformas de *ORAI* y *STIM1* sabemos que median I_{CRAC} en otros tipos celulares, su sobreexpresión podría contribuir al aumento de esta corriente en las células tumorales con respecto a las células normales. Por otra parte, la I_{SOC} no selectiva encontrada solo en las células de adenocarcinoma de colon podría estar mediada principalmente por *TRPC1*, ya que, como mencionamos previamente, las características de la misma son muy similares a las corrientes llevadas a cabo por este canal (Fig. 75). Además, el incremento de su expresión es de 5,2 veces, se trata de la proteína que más aumenta su expresión en las células tumorales. *TRPC4*, también, podría estar implicado en esa corriente, sin embargo, su expresión tan solo aumenta 1,4 veces y puede que no sea suficiente para promover la aparición de la I_{SOC} no selectiva exclusivamente en las células tumorales. Asimismo, se ha descrito que *TRPC4* forma una corriente I_{SOC} conjuntamente con *TRPC1*, pero ésta tiene un potencial de reversión cercano a +40 mV (Cioffi *et al.*, 2012) distinto del de la corriente encontrada en las células tumorales de colon, el cual es cercano a 0 mV. Por tanto, no es demasiado probable que *TRPC4* medie la I_{SOC} no selectiva de las células tumorales.

La contribución de estas proteínas a la ECC e I_{SOC} fue estudiada mediante silenciamiento génico. Encontramos que el silenciamiento de ORAI1 reduce la ECC tanto en las células normales como en las tumorales de colon lo que indica que está implicado en la entrada de Ca^{2+} en ambos tipos celulares. Su sobreexpresión en las células tumorales, por tanto, podría explicar el aumento de la ECC en esas células con respecto a las normales. En cambio, los resultados del silenciamiento de ORAI2 y ORAI3 apuntan a que ninguno de ellos participa en la ECC de las células tumorales y que no son relevantes en el remodelado de la misma en el cáncer de colon. Por su parte, la reducción de la expresión de TRPC1 no produce ninguna variación en la ECC ni de las células normales ni de las tumorales. Como consecuencia, TRPC1 parece no estar implicado, al menos, en la ECC inducida por taspigargina. Como consecuencia, el aumento de la ECC en las células tumorales, en principio, no se debe a la sobreexpresión de este canal.

Los resultados muestran que la implicación de STIM1 en la ECC de las células normales y tumorales de colon es clara, ya que su silenciamiento reduce significativamente esta entrada de Ca^{2+} en ambos tipos celulares. Sin embargo, la reducción de la expresión de STIM2 solo disminuye significativamente la ECC en las células normales. Los datos sugieren por tanto que STIM1 media la ECC en ambos tipos celulares, pero STIM2 participa fundamentalmente en la entrada de Ca^{2+} de las células normales. No obstante, el doble silenciamiento de STIM1 y STIM2 en las células tumorales provoca una disminución superior a la producida tan solo por la reducción de la expresión de STIM1 lo que sugiere que STIM2, también, puede participar en la ECC de las células tumorales. En estas células en las que la expresión de STIM1 aumenta 3,7 veces y la de STIM2 se reduce cerca de 7 veces con respecto a las células normales puede que el sensor de Ca^{2+} que medie mayoritariamente la ECC sea STIM1. De esta forma, en las células tumorales el efecto del silenciamiento de STIM2 sobre la ECC podría ser compensado por STIM1. Debemos tener en cuenta que este resultado se obtiene al inducir la ECC con taspigargina, lo que provoca un vaciamiento máximo de los depósitos y, como consecuencia, la activación de ambos sensores de Ca^{2+} . Puede que un vaciamiento más leve no produjera la compensación de ese efecto, ya que en ese caso la ECC es activada principalmente por STIM2 (Brandman *et al.*, 2007). Sin embargo, en las células normales el ratio STIM1/STIM2 es inferior al de las células tumorales y, probablemente, STIM2 tenga un papel más relevante mediando la ECC.

En cuanto a los efectos sobre las corrientes, el silenciamiento de ORAI1 provoca una disminución en esa corriente tanto en células normales como en tumorales. Por tanto, este hecho confirmaría que la I_{CRAC} está mediada por ORAI1 en ambos tipos celulares. Por otro lado, el silenciamiento de TRPC1 en las células normales no reduce la I_{CRAC} , lo que descarta su participación en la corriente selectiva a Ca^{2+} . En cambio, la reducción de la expresión de TRPC1 disminuye tanto el componente entrante como el saliente de la I_{SOC} total de las células tumorales. La reducción de la corriente saliente sugiere que TRPC1 está participando en la I_{SOC} no selectiva. Por otra parte, la reducción de la corriente entrante puede ser debido a que el

silenciamiento tiene un efecto sobre el componente entrante de la I_{SOC} no selectiva. Además, es poco probable que TRPC1 participe en la I_{CRAC} , ya que la baja selectividad de este canal a Ca^{2+} ha sido ampliamente descrita. Alternativamente, este resultado podría ser debido a que ORAI1 y TRPC1 puede formar un complejo conjuntamente con STIM1 para llevar a cabo la corriente operada por depósitos (Kim *et al.*, 2009). Esta posibilidad se ve reforzada por el hecho de que la reducción de la expresión de ORAI1 en las células tumorales disminuye, también, la I_{SOC} no selectiva. Además, la implicación de ORAI1 en una corriente no selectiva a Ca^{2+} podría explicarse también por su participación en la inserción en la membrana de TRPC1, puesto que se ha descrito que la entrada de Ca^{2+} mediada por ORAI1 puede controlar el reclutamiento de TRPC1 a la membrana plasmática (Cheng *et al.*, 2011).

Se hace necesario discutir cuál podría ser la función de TRPC1 en el remodelado del cáncer de colon, puesto que nuestros resultados apuntan a que participa en la corriente I_{SOC} no selectiva de las células tumorales, pero no está implicado en la ECC. Este resultado es consistente con su papel de canal no selectivo a Ca^{2+} capaz de permear también Na^+ , ya que el componente saliente de la I_{SOC} no selectiva observado está mediado principalmente por este último ión. Por tanto, su implicación en la tumorigénesis puede que no venga dada por el transporte de Ca^{2+} . De esta manera, TRPC1 puede que ejerza su función controlando el potencial de membrana y, como consecuencia, la fuerza motriz para la entrada de Ca^{2+} durante la ECC (Gees *et al.*, 2010). Además, se ha reportado que este canal puede regular la progresión del ciclo celular a través del control del volumen celular (Madsen *et al.*, 2012). Así, de esta forma podría aumentar la proliferación de las células tumorales. La contribución de TRPC1 a la proliferación en otros cánceres como glioma (Bomben y Shonheimer, 2010), cáncer de pulmón microcítico (Tajeddine y Gailly, 2012) y de ovario (Zeng *et al.*, 2013) es clara, por lo que el aumento de expresión de 5,2 veces en el cáncer de colon puede ser clave en el desarrollo del mismo aumentando la proliferación de las células tumorales.

Una vez descrito el remodelado del Ca^{2+} intracelular en las células de adenocarcinoma de colon, las principales bases moleculares del mismo y su implicación en algunas de las características tumorales como la excesiva proliferación, capacidad de invasión y resistencia a la muerte celular, se hace necesario saber cómo se insertan estos cambios en la historia molecular del cáncer y si son comunes a otros tipos de tumor o son específicos de colon. También deberíamos conocer las rutas señalización, oncogenes, genes supresores de tumores y/o mutaciones particulares que pueden llevar al remodelado del Ca^{2+} intracelular en el cáncer colorrectal. Evidentemente queda mucho por saber al respecto, pero cabe discutir algunas posibilidades. Por ejemplo, el aumento de expresión de TRPC1 en las células tumorales con respecto a las normales podría ser explicado por la reducción en el contenido de Ca^{2+} de los depósitos en las células de adenocarcinoma de colon. Este hecho, es posible debido a que se ha descrito que el vaciamiento de los depósitos con tapsigargina incrementa la expresión de este canal sin afectar a la ECC en células de cáncer de próstata (Pigozzi *et al.*, 2006). Además, de forma similar, en la enfermedad de Darier, la cual afecta al epitelio de la piel, una mutación

en la SERCA2 reduce el contenido de Ca^{2+} de los depósitos aumentando, también, la expresión de TRPC1 y con ello la proliferación celular (Pani *et al.*, 2006).

ORAI1 está implicado a través de su participación en la ECC en la proliferación de las células procedentes de numerosos cánceres como glioblastoma (Liu *et al.*, 2011), cáncer renal (Kim *et al.*, 2014), cáncer escamoso esofágico (Zhu *et al.*, 2014) y melanoma (Umemura *et al.*, 2014). Así, la implicación de ORAI1 tanto en la ECC como en la I_{SOC} de las células normales y tumorales de colon sugiere que el incremento de ambas observado en el cáncer de colon puede ser consecuencia del aumento de la expresión de este canal selectivo a Ca^{2+} .

Por otra parte, la sobreexpresión de STIM1 en las células tumorales de colon podría explicar, también, el aumento de la ECC y de la I_{CRAC} por medio de su interacción con ORAI1 (Peinelt *et al.*, 2006). Asimismo, puede contribuir a la aparición de la I_{SOC} no selectiva en las células tumorales por la posibilidad de interactuar con TRPC1 (Huang *et al.*, 2006; López *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2007). Previamente, se ha descrito que STIM1 está implicado en la proliferación de células de cáncer cervical (Chen *et al.*, 2011), epidermoide (Yoshida *et al.*, 2012), glioblastoma (Liu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013), cáncer hepático (Wu *et al.*, 2015). Como consecuencia, el aumento de la proliferación en las células de cáncer de colon obtenido en nuestro estudio podría ser debido al incremento de la expresión de STIM1 en esas células con respecto a las normales. Además, de manera consistente con nuestros resultados, se observó que este sensor de Ca^{2+} se encuentra sobreexpresado en tejido de cáncer colorrectal respecto a muestras de tejido normal del mismo paciente. En ese caso, el incremento de su expresión fue relacionado con la migración e invasión del tumor (Wang *et al.*, 2014).

También, es importante tener en cuenta cómo cambia el ratio STIM1/STIM2 en las células tumorales. Así, en cáncer de mama un ratio elevado STIM1/STIM2 es asociado con un mal pronóstico (McAndrew *et al.*, 2011). Nuestro trabajo apunta que en las células tumorales se produce un aumento del cociente STIM1/STIM2 de 25 veces a favor de STIM1. Por otra parte, en células epiteliales de intestino de rata se ha mostrado que el aumento de la expresión de STIM2 dificulta la translocación de STIM1 a la membrana plasmática y la interacción con TRPC1, la cual es esencial para la migración celular cuando se produce un daño (Rao *et al.*, 2012). De esta forma, en nuestro modelo de células de adenocarcinoma de colon se reduce la expresión de STIM2 considerablemente con respecto a STIM1. Por tanto, puede que el remodelado de la expresión de ambos sensores de Ca^{2+} favorezca la interacción entre STIM1 y TRPC1 dando lugar a la aparición de la I_{SOC} no selectiva en las células tumorales. Es interesante destacar que la expresión STIM2 se reduce a nivel de proteína, en cambio, observamos que ésta aumenta a nivel de mRNA. El incremento de la expresión del mRNA de STIM2 ha sido documentado previamente en tumores de cáncer colon lo que puede sugerir que este aumento contribuye a la tumorigénesis. Por el contrario, el estudio muestra que el silenciamiento de STIM2 provoca un aumento de la proliferación en células de cáncer de colon lo que indica que pudiera funcionar como un supresor tumoral (Aytes *et al.*, 2012). Puede que

la determinación de la expresión de STIM2 a nivel de proteína en ese trabajo hubiera sido esencial en el esclarecimiento de su función en el cáncer de colon. El aumento de la expresión de mRNA de este sensor de Ca^{2+} en las células tumorales de colon puede que se trate de un mecanismo de compensación a la reducción de la expresión de la proteína.

Por último, nos queda aclarar cuál sería el posible mecanismo implicado en la disminución del contenido de Ca^{2+} de los depósitos en las células de adenocarcinoma de colon con respecto a las células normales. Éste puede consistir en el cambio de expresión de STIM2, ya que se ha descrito que tiene un papel importante en la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ (Brandmann *et al.*, 2007). Tanto STIM1 como STIM2 se activan con el vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} lo que va a permitir su relleno posterior. Sin embargo, STIM1 presenta una afinidad a Ca^{2+} superior a la de STIM2. De esta manera, STIM2 es capaz de sentir descensos más leves de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ (Brandmann *et al.*, 2007). En las células normales de colon el ratio STIM1/STIM2 es mayor, es decir, la diferencia de expresión de ambos sensores de Ca^{2+} no es tan acusada como en las células tumorales. En este caso, STIM2 va a controlar el relleno de los depósitos cuando se producen descensos leves en su concentración manteniendo así, el contenido de Ca^{2+} de los depósitos. En cambio, en las células tumorales de colon el ratio STIM1/STIM2 se incrementa 25 veces por lo que el relleno de los depósitos es controlado principalmente por STIM1. Este sensor de Ca^{2+} induce el relleno solo cuando se produce un gran vaciamiento de los depósitos. El relleno de los depósitos a consecuencia de vaciamientos leves en las células tumorales es menor que en las células normales lo que disminuye su contenido en Ca^{2+} . Por tanto, la reducción de la expresión de STIM2 en las células tumorales de colon produce una disminución en el contenido de Ca^{2+} de los depósitos. Este hecho fue confirmado con el silenciamiento de STIM2 en las células normales, puesto que provocó una reducción del contenido de Ca^{2+} de los depósitos en esas células. Además, esta disminución de la expresión de STIM2 aumentó la resistencia a apoptosis de las células normales de colon. Por tanto, STIM2 podría actuar como supresor tumoral incrementando la sensibilidad de las células a la apoptosis al contribuir a mantener un elevado contenido de Ca^{2+} de los depósitos. Asimismo, su papel como supresor tumoral es consistente con la localización de su gen en la región 4p15, una zona susceptible de sufrir pérdida de heterocigosidad y con la disminución de su expresión en la transición de moderado a alto grado Gleason en cáncer de próstata (Ashida *et al.*, 2012).

Además de la reducción de la expresión de STIM2 en las células tumorales, puede haber otros mecanismos que disminuyan el contenido de Ca^{2+} de los depósitos. Así, en el cáncer se ha descrito que tanto un aumento de la función del canal *leak* de Ca^{2+} de los depósitos como una disminución de la SERCA pueden provocar ese mismo efecto (Prevarskaya *et al.*, 2014). Anteriormente, se ha propuesto que IP_3R puede operar, también como canal *leak* (Szlufcik *et al.*, 2006) y puesto que nuestros resultados muestran que en las células tumorales hay una mayor expresión o actividad del IP_3R que en las células normales, pudiera ser que esas células presentaran, también, una mayor función del canal *leak* de Ca^{2+} . Por otra parte, la SERCA puede estar regulada por la proteína supresora tumoral p53, ya que modifica su estado

de oxidación aumentando la carga del RE y con ello la apoptosis (Giorgi *et al.*, 2015). En las células HT29 se ha observado una mutación en el gen de esta proteína (Ahmed *et al.*, 2013), por lo que puede que la pérdida de función de p53 disminuya el contenido de Ca^{2+} de los depósitos al reducir la actividad de la SERCA aumentando la resistencia a la apoptosis de las células tumorales de colon. Para confirmar el papel del canal *leak* de Ca^{2+} del RE y de la SERCA en la tumorigénesis del cáncer de colon sería necesario llevar a cabo más experimentos centrados en estudiar la actividad de ambos en las células normales y tumorales.

En resumen, nuestros resultados muestran que se produce un remodelado del Ca^{2+} en el cáncer de colon consistente principalmente en un aumento de la ECC y una reducción del contenido de Ca^{2+} de los depósitos. El incremento de la ECC se correlaciona perfectamente con un aumento en la proliferación, así como, la disminución del contenido de Ca^{2+} provoca un incremento de la supervivencia en las células de adenocarcinoma de colon. También, observamos que las células tumorales presentan una liberación de Ca^{2+} superior a la de las células normales lo que podría ser explicado por un aumento en la actividad y/o expresión de los IP_3R . Asimismo, las células de adenocarcinoma de colon presentan un potencial de membrana más negativo, así como una $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basal incrementada. Por otro lado, la captación mitocondrial de Ca^{2+} es superior en las células tumorales de colon posiblemente a consecuencia del aumento del potencial de la mitocondria lo que puede contribuir al incremento de la ECC. Por primera vez, reportamos que el aumento de la ECC y de la I_{CRAC} en las células tumorales de colon puede deberse a un incremento en la expresión de ORAI1. Además, es muy relevante el elevado aumento de la expresión de TRPC1, ya que puede estar involucrado en la aparición de una I_{SOC} no selectiva que podría ser clave en la tumorigénesis. El remodelado de la ECC y de la I_{CRAC} , también, puede deberse a una mayor expresión de STIM1 en el cáncer de colon. Por último, es interesante destacar que la reducción de la expresión de STIM2 es responsable de la disminución del contenido de Ca^{2+} en las células tumorales de colon lo que aumenta la resistencia a la apoptosis de esas células (Fig. 75). Así, el estudio del remodelado del transporte de Ca^{2+} en el cáncer de colon presentado en esta tesis pone de manifiesto que tanto la ECC como el contenido de Ca^{2+} de los depósitos y las proteínas implicadas en ambos procesos pueden ser una buena diana terapéutica o, incluso, pueden ser útiles a la hora de diseñar un nuevo método de diagnóstico de los tumores de colon.

VI. CONCLUSIONES

1. La entrada capacitativa de Ca^{2+} inducida tanto por taspigargina como por agonistas fisiológicos es mayor en las células de adenocarcinoma de colon humano que en las células epiteliales normales. Ese incremento de la entrada capacitativa de Ca^{2+} en las células tumorales de colon se correlaciona con un aumento en la proliferación celular y su inhibición previene la invasión de las células de adenocarcinoma de colon.
2. Las células de adenocarcinoma de colon presentan una liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares mayor que las células normales debido posiblemente a un aumento de la actividad y/o de la expresión de los receptores de IP_3 .
3. El contenido de Ca^{2+} de los depósitos de las células tumorales de colon es menor que el de las células normales lo que podría contribuir a la resistencia a la muerte y a la entrada capacitativa de calcio inducida por agonistas fisiológicos.
4. Las células tumorales de colon muestran una $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basal mayor, así como un potencial de membrana en reposo más negativo que las células normales. El aumento del potencial de membrana en reposo de las células tumorales podría favorecer, al menos en parte, el aumento de la entrada capacitativa de Ca^{2+} .
5. La captación mitocondrial de Ca^{2+} es mayor en las células de adenocarcinoma de colon que en las células normales lo que puede ser explicado por el aumento del potencial mitocondrial en las células tumorales. Este aumento de la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria no es debido a cambios en la expresión ni de MCU ni de MICU1. El incremento en la captación de Ca^{2+} mitocondrial en el cáncer de colon podría contribuir al aumento de la entrada capacitativa de Ca^{2+} .
6. Las células tumorales de colon muestran una I_{CRAC} mayor que las células normales, así como una I_{SOC} no selectiva presente solo en las mismas.
7. Los canales TRPV6, TRPM8 y TRPC7 se expresan en las células normales de colon pero desaparecen en las células tumorales lo que puede estar relacionado con una pérdida de función en estas células.
8. La expresión de todas las isoformas de ORAI, así como de STIM1 está incrementada en las células tumorales de colon. El aumento de ORAI1 y STIM1 podría explicar el incremento de la entrada capacitativa de Ca^{2+} y de la I_{CRAC} . Por el contrario, ORAI2 y ORAI3 no participan en la ECC de las células de cáncer de colon.
9. TRPC1 se sobreexpresa de manera importante en las células de adenocarcinoma de colon con respecto a las células normales, mientras que TRPC4 solo aumenta ligeramente en esas células. Asimismo, TRPC1 está implicado en la I_{SOC} no selectiva lo que indica que el aumento de su expresión puede ser el responsable de la aparición de esa corriente en las células tumorales.

VI. CONCLUSIONES

10. La expresión de STIM2 se reduce considerablemente en las células tumorales de colon lo que podría ser responsable del vaciamiento de los depósitos y la resistencia a la muerte de las células tumorales.

VII. REFERENCIAS

VII. REFERENCIAS

- Abdullaev IF, Bisailon JM, Potier M, Gonzalez JC, Motiani RK, Trebak M** (2008). Stim1 and Orai1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. *Circ Res*. 103: 1289-99.
- Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK** (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev*. 67: 657-85.
- Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknaes M, Hektoen M, Lind GE, Lothe RA** (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*. 2: e71.
- Akrami SM** (2006). Genetics of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Arch Iran Med*. 9: 381-9.
- Alcarraz-Vizan G, Sanchez-Tena S, Moyer MP, Cascante M** (2014). Validation of NCM460 cell model as control in antitumor strategies targeting colon adenocarcinoma metabolic reprogramming: trichostatin A as a case study. *Biochim Biophys Acta*. 1840: 1634-9.
- Allen DG, Blinks JR, Prendergast FG** (1977). Aequorin luminescence: relation of light emission to calcium concentration--a calcium-independent component. *Science*. 195: 996-8.
- Altimimi HF, Schnetkamp PP** (2007). Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchangers (NCKX): functional properties and physiological roles. *Channels (Austin)*. 1: 62-9.
- Ambrosi P, Becchetti A** (2013). Targeting neuronal nicotinic receptors in cancer: new ligands and potential side-effects. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 8: 38-52.
- Arbajian A, Brouland JP, Apati A, Paszty K, Hegedus L, Enyedi A, Chomienne C, Papp B** (2013). Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump expression during lung cancer cell differentiation. *FEBS J*. 280: 5408-18.
- Artalejo AR, Ellory JC, Parekh AB** (1998). Ca²⁺-dependent capacitance increases in rat basophilic leukemia cells following activation of store-operated Ca²⁺ entry and dialysis with high-Ca²⁺-containing intracellular solution. *Pflugers Arch*. 436: 934-9.
- Arvizo RR, Moyano DF, Saha S, Thompson MA, Bhattacharya R, Rotello VM, Prakash YS, Mukherjee P** (2013). Probing novel roles of the mitochondrial uniporter in ovarian cancer cells using nanoparticles. *J Biol Chem*. 288: 17610-8.
- Ashida S, Orloff MS, Bebek G, Zhang L, Zheng P, Peehl DM, Eng C** (2012). Integrated analysis reveals critical genomic regions in prostate tumor microenvironment associated with clinicopathologic phenotypes. *Clin Cancer Res*. 18: 1578-87.
- Aung CS, Ye W, Plowman G, Peters AA, Monteith GR, Roberts-Thomson SJ** (2009). Plasma membrane calcium ATPase 4 and the remodeling of calcium homeostasis in human colon cancer cells. *Carcinogenesis*. 30: 1962-9.
- Ay AS, Benzerdjeb N, Sevestre H, Ahidouch A, Ouadid-Ahidouch H** (2013). Orai3 constitutes a native store-operated calcium entry that regulates non small cell lung adenocarcinoma cell proliferation. *PLoS One*. 8: e72889.
- Aydar E, Yeo S, Djamgoz M, Palmer C** (2009). Abnormal expression, localization and interaction of canonical transient receptor potential ion channels in human breast cancer cell lines and tissues: a potential target for breast cancer diagnosis and therapy. *Cancer Cell Int*. 9: 23.
- Aytes A, Mollevi DG, Martinez-Iniesta M, Nadal M, Vidal A, Morales A, Salazar R, Capella G, Villanueva A** (2012). Stromal interaction molecule 2 (STIM2) is frequently overexpressed in colorectal tumors and confers a tumor cell growth suppressor phenotype. *Mol Carcinog*. 51: 746-53.

- Baggott RR, Mohamed TM, Oceandy D, Holton M, Blanc MC, Roux-Soro SC, Brown S, Brown JE, Cartwright EJ, Wang W, Neyses L, Armesilla AL** (2012). Disruption of the interaction between PMCA2 and calcineurin triggers apoptosis and enhances paclitaxel-induced cytotoxicity in breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 33: 2362-8.
- Baggott RR, Alfranca A, Lopez-Maderuelo D, Mohamed TM, Escolano A, Oller J, Ornes BC, Kurusamy S, Rowther FB, Brown JE, Oceandy D, Cartwright EJ, Wang W, Gomez-del Arco P, Martinez-Martinez S, Neyses L, Redondo JM, Armesilla AL** (2014). Plasma membrane calcium ATPase isoform 4 inhibits vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis through interaction with calcineurin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 34: 2310-20.
- Bakowski D, Parekh AB** (2000). Voltage-dependent conductance changes in the store-operated Ca^{2+} current ICRAc in rat basophilic leukaemia cells. *J Physiol*. 529 Pt 2: 295-306.
- Bakowski D, Parekh AB** (2001). Sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum- Ca^{2+} -ATPase-mediated Ca^{2+} reuptake, and not Ins(1,4,5)P3 receptor inactivation, prevents the activation of macroscopic Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current in the presence of physiological Ca^{2+} buffer in rat basophilic leukaemia-1 cells. *Biochem J*. 353: 561-7.
- Bakowski D, Parekh AB** (2002). Monovalent cation permeability and Ca^{2+} block of the store-operated Ca^{2+} current I(CRAc) in rat basophilic leukemia cells. *Pflugers Arch*. 443: 892-902.
- Bakowski D, Parekh AB** (2007). Regulation of store-operated calcium channels by the intermediary metabolite pyruvic acid. *Curr Biol*. 17: 1076-81.
- Balasuriya D, Srivats S, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM** (2014). Atomic force microscopy (AFM) imaging suggests that stromal interaction molecule 1 (STIM1) binds to Orai1 with sixfold symmetry. *FEBS Lett*. 588: 2874-80.
- Baldi C, Vazquez G, Boland R** (2003). Capacitative calcium influx in human epithelial breast cancer and non-tumorigenic cells occurs through Ca^{2+} entry pathways with different permeabilities to divalent cations. *J Cell Biochem*. 88: 1265-72.
- Bandyopadhyay BC, Pingle SC, Ahern GP** (2011). Store-operated Ca^{2+} signaling in dendritic cells occurs independently of STIM1. *J Leukoc Biol*. 89: 57-62.
- Banerjee S, Hasan G** (2005). The InsP3 receptor: its role in neuronal physiology and neurodegeneration. *Bioessays*. 27: 1035-47.
- Baryshnikov SG, Pulina MV, Zulian A, Linde CI, Golovina VA** (2009). Orai1, a critical component of store-operated Ca^{2+} entry, is functionally associated with $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger and plasma membrane Ca^{2+} pump in proliferating human arterial myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 297: C1103-12.
- Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL, Kotliansky V, Mootha VK** (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 476: 341-5.
- Beck B, Zholos A, Sydorenko V, Roudbaraki M, Lehen'kyi V, Bordat P, Prevarskaya N, Skryma R** (2006). TRPC7 is a receptor-operated DAG-activated channel in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 126: 1982-93.
- Beech DJ** (2007). Ion channel switching and activation in smooth-muscle cells of occlusive vascular diseases. *Biochem Soc Trans*. 35: 890-4.

VII. REFERENCIAS

- Berna-Erro A, Braun A, Kraft R, Kleinschnitz C, Schuhmann MK, Stegner D, Wultsch T, Eilers J, Meuth SG, Stoll G, Nieswandt B** (2009). STIM2 regulates capacitive Ca^{2+} entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death. *Sci Signal*. 2: ra67.
- Berna-Erro A, Woodard GE, Rosado JA** (2012). Orais and STIMs: physiological mechanisms and disease. *J Cell Mol Med*. 16: 407-24.
- Bernaldo de Quiros S, Merlo A, Secades P, Zambrano I, de Santa Maria IS, Ugidos N, Jantus-Lewintre E, Sirera R, Suarez C, Chiara MD** (2013). Identification of TRPC6 as a possible candidate target gene within an amplicon at 11q21-q22.2 for migratory capacity in head and neck squamous cell carcinomas. *BMC Cancer*. 13: 116.
- Berridge MJ, Heslop JP, Irvine RF, Brown KD** (1984). Inositol trisphosphate formation and calcium mobilization in Swiss 3T3 cells in response to platelet-derived growth factor. *Biochem J*. 222: 195-201.
- Berridge MJ** (1995). Capacitative calcium entry. *Biochem J*. 312 (Pt 1): 1-11.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD** (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1: 11-21.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL** (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4: 517-29.
- Berridge MJ** (2006). Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium*. 40: 405-12.
- Berridge MJ** (2014). Ion channels. *Cell Signalling Biology*. Portland Press.
- Berrout J, Isokawa M** (2009). Homeostatic and stimulus-induced coupling of the L-type Ca^{2+} channel to the ryanodine receptor in the hippocampal neuron in slices. *Cell Calcium*. 46: 30-8.
- Bertolino M, Llinas RR** (1992). The central role of voltage-activated and receptor-operated calcium channels in neuronal cells. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 32: 399-421.
- Beskina O, Miller A, Mazzocco-Spezia A, Pulina MV, Golovina VA** (2007). Mechanisms of interleukin-1beta-induced Ca^{2+} signals in mouse cortical astrocytes: roles of store- and receptor-operated Ca^{2+} entry. *Am J Physiol Cell Physiol*. 293: C1103-11.
- Bidaux G, Roudbaraki M, Merle C, Crepin A, Delcourt P, Slomianny C, Thebault S, Bonnal JL, Benahmed M, Cabon F, Mauroy B, Prevarskaya N** (2005). Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement. *Endocr Relat Cancer*. 12: 367-82.
- Bidaux G, Flourakis M, Thebault S, Zholos A, Beck B, Gkika D, Roudbaraki M, Bonnal JL, Mauroy B, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N** (2007). Prostate cell differentiation status determines transient receptor potential melastatin member 8 channel subcellular localization and function. *J Clin Invest*. 117: 1647-57.
- Bird GS, Putney JW, Jr.** (2005). Capacitative calcium entry supports calcium oscillations in human embryonic kidney cells. *J Physiol*. 562: 697-706.
- Bird GS, DeHaven WI, Smyth JT, Putney JW, Jr.** (2008). Methods for studying store-operated calcium entry. *Methods*. 46: 204-12.
- Blinks JR, Prendergast FG, Allen DG** (1976). Photoproteins as biological calcium indicators. *Pharmacol Rev*. 28: 1-93.
- Bogaert J, Prenen H** (2014). Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol*. 27: 9-14.

- Bogeski I, Kummerow C, Al-Ansary D, Schwarz EC, Koehler R, Kozai D, Takahashi N, Peinelt C, Griesemer D, Bozem M, Mori Y, Hoth M, Niemeyer BA** (2010). Differential redox regulation of ORAI ion channels: a mechanism to tune cellular calcium signaling. *Sci Signal.* 3: ra24.
- Bolanz KA, Hediger MA, Landowski CP** (2008). The role of TRPV6 in breast carcinogenesis. *Mol Cancer Ther.* 7: 271-9.
- Bomben VC, Sontheimer H** (2010). Disruption of transient receptor potential canonical channel 1 causes incomplete cytokinesis and slows the growth of human malignant gliomas. *Glia.* 58: 1145-56.
- Bomben VC, Turner KL, Barclay TT, Sontheimer H** (2011). Transient receptor potential canonical channels are essential for chemotactic migration of human malignant gliomas. *J Cell Physiol.* 226: 1879-88.
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE** (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 106: 761-71.
- Brandman O, Liou J, Park WS, Meyer T** (2007). STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} levels. *Cell.* 131: 1327-39.
- Breitbart H** (2002). Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol.* 187: 139-44.
- Brenner H, Kloor M, Pox CP** (2014). Colorectal cancer. *Lancet.* 383: 1490-502.
- Brierley GP, Baysal K, Jung DW** (1994). Cation transport systems in mitochondria: Na^+ and K^+ uniports and exchangers. *J Bioenerg Biomembr.* 26: 519-26.
- Brini M, Murgia M, Pasti L, Picard D, Pozzan T, Rizzuto R** (1993). Nuclear Ca^{2+} concentration measured with specifically targeted recombinant aequorin. *EMBO J.* 12: 4813-9.
- Brini M, Marsault R, Bastianutto C, Alvarez J, Pozzan T, Rizzuto R** (1995). Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_c$). A critical evaluation. *J Biol Chem.* 270: 9896-903.
- Brini M, Carafoli E** (2009). Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev.* 89: 1341-78.
- Brini M, Cali T, Ottolini D, Carafoli E** (2013). The plasma membrane calcium pump in health and disease. *FEBS J.* 280: 5385-97.
- Brocardo M, Nathke IS, Henderson BR** (2005). Redefining the subcellular location and transport of APC: new insights using a panel of antibodies. *EMBO Rep.* 6: 184-90.
- Bruggemann A, Farre C, Haarmann C, Haythornthwaite A, Kreir M, Stoelzle S, George M, Fertig N** (2008). Planar patch clamp: advances in electrophysiology. *Methods Mol Biol.* 491: 165-76.
- Burn J, Gerdes AM, Macrae F, Mecklin JP, Moeslein G, Olschwang S, Eccles D, Evans DG, Maher ER, Bertario L, Bisgaard ML, Dunlop MG, Ho JW, Hodgson SV, Lindblom A, Lubinski J, Morrison PJ, Murday V, Ramesar R, Side L, Scott RJ, Thomas HJ, Vasen HF, Barker G, Crawford G, Elliott F, Movahedi M, Pylvanainen K, Wijnen JT, Fodde R, Lynch HT, Mathers JC, Bishop DT** (2011). Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *Lancet.* 378: 2081-7.
- Burnstock G** (2013). Purinergic signalling: pathophysiology and therapeutic potential. *Keio J Med.* 62: 63-73.

VII. REFERENCIAS

- Cai S, Fatherazi S, Presland RB, Belton CM, Roberts FA, Goodwin PC, Schubert MM, Izutsu KT** (2006). Evidence that TRPC1 contributes to calcium-induced differentiation of human keratinocytes. *Pflugers Arch.* 452: 43-52.
- Cai R, Ding X, Zhou K, Shi Y, Ge R, Ren G, Jin Y, Wang Y** (2009). Blockade of TRPC6 channels induced G2/M phase arrest and suppressed growth in human gastric cancer cells. *Int J Cancer.* 125: 2281-7.
- Carafoli E** (1987). Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem.* 56: 395-433.
- Carafoli E** (1992). The plasma membrane calcium pump. Structure, function, regulation. *Biochim Biophys Acta.* 1101: 266-7.
- Carafoli E, Brini M** (2000). Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Curr Opin Chem Biol.* 4: 152-61.
- Carafoli E** (2002). Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 1115-22.
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J** (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev.* 57: 411-25.
- Catterall WA** (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3: a003947.
- Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E** (2009). Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin.* 59: 366-78.
- Chamero P, Villalobos C, Alonso MT, Garcia-Sancho J** (2002). Dampening of cytosolic Ca²⁺ oscillations on propagation to nucleus. *J Biol Chem.* 277: 50226-9.
- Chen R, Valencia I, Zhong F, McColl KS, Roderick HL, Bootman MD, Berridge MJ, Conway SJ, Holmes AB, Mignery GA, Velez P, Distelhorst CW** (2004). Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Cell Biol.* 166: 193-203.
- Chen YF, Chiu WT, Chen YT, Lin PY, Huang HJ, Chou CY, Chang HC, Tang MJ, Shen MR** (2011). Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 15225-30.
- Chen YF, Chen YT, Chiu WT, Shen MR** (2013). Remodeling of calcium signaling in tumor progression. *J Biomed Sci.* 20: 23.
- Chen J, Luan Y, Yu R, Zhang Z, Zhang J, Wang W** (2014a). Transient receptor potential (TRP) channels, promising potential diagnostic and therapeutic tools for cancer. *Biosci Trends.* 8: 1-10.
- Chen L, Yang Y, Liu S, Piao L, Zhang Y, Lin Z, Li Z** (2014b). High expression of leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1 predicts poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Biomed Res Int.* 2014: 850316.
- Chen W, Thielmann I, Gupta S, Subramanian H, Stegner D, van Kruchten R, Dietrich A, Gambaryan S, Heemskerk JW, Hermanns HM, Nieswandt B, Braun A** (2014c). Orai1-induced store-operated Ca²⁺ entry enhances phospholipase activity and modulates canonical transient receptor potential channel 6 function in murine platelets. *J Thromb Haemost.* 12: 528-39.

- Cheng H, Wang SQ** (2002). Calcium signaling between sarcolemmal calcium channels and ryanodine receptors in heart cells. *Front Biosci.* 7: d1867-78.
- Cheng KT, Ong HL, Liu X, Ambudkar IS** (2011). Contribution of TRPC1 and Orai1 to Ca^{2+} entry activated by store depletion. *Adv Exp Med Biol.* 704: 435-49.
- Cheng KT, Ong HL, Liu X, Ambudkar IS** (2013). Contribution and regulation of TRPC channels in store-operated Ca^{2+} entry. *Curr Top Membr.* 71: 149-79.
- Chigurupati S, Venkataraman R, Barrera D, Naganathan A, Madan M, Paul L, Pattisapu JV, Kyriazis GA, Sugaya K, Bushnev S, Lathia JD, Rich JN, Chan SL** (2010). Receptor channel TRPC6 is a key mediator of Notch-driven glioblastoma growth and invasiveness. *Cancer Res.* 70: 418-27.
- Chodon D, Guilbert A, Dhennin-Duthille I, Gautier M, Telliez MS, Sevestre H, Ouadid-Ahidouch H** (2010). Estrogen regulation of TRPM8 expression in breast cancer cells. *BMC Cancer.* 10: 212.
- Chung FY, Lin SR, Lu CY, Yeh CS, Chen FM, Hsieh JS, Huang TJ, Wang JY** (2006). Sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase 2 expression as a tumor marker in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol.* 30: 969-74.
- Cioffi DL, Wu S, Chen H, Alexeyev M, St Croix CM, Pitt BR, Uhlig S, Stevens T** (2012). Orai1 determines calcium selectivity of an endogenous TRPC heterotetramer channel. *Circ Res.* 110: 1435-44.
- Clapham DE** (2007). Calcium signaling. *Cell.* 131: 1047-58.
- Contreras L, Drago I, Zampese E, Pozzan T** (2010). Mitochondria: the calcium connection. *Biochim Biophys Acta.* 1797: 607-18.
- Cooper DM, Karpen JW, Fagan KA, Mons NE** (1998). Ca^{2+} -sensitive adenylyl cyclases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 32: 23-51.
- Corbett EF, Michalak M** (2000). Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum? *Trends Biochem Sci.* 25: 307-11.
- Covington ED, Wu MM, Lewis RS** (2010). Essential role for the CRAC activation domain in store-dependent oligomerization of STIM1. *Mol Biol Cell.* 21: 1897-907.
- Criddle DN, Gerasimenko JV, Baumgartner HK, Jaffar M, Voronina S, Sutton R, Petersen OH, Gerasimenko OV** (2007). Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? *Cell Death Differ.* 14: 1285-94.
- Csordas G, Golenar T, Seifert EL, Kamer KJ, Sancak Y, Perocchi F, Moffat C, Weaver D, de la Fuente Perez S, Bogorad R, Koteliansky V, Adijanto J, Mootha VK, Hajnoczky G** (2013). MICU1 controls both the threshold and cooperative activation of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter. *Cell Metab.* 17: 976-87.
- Cucu D, Chiritoiu G, Petrescu S, Babes A, Stanica L, Duda DG, Horii A, Dima SO, Popescu I** (2014). Characterization of functional transient receptor potential melastatin 8 channels in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Pancreas.* 43: 795-800.
- Cuddapah VA, Turner KL, Sontheimer H** (2013). Calcium entry via TRPC1 channels activates chloride currents in human glioma cells. *Cell Calcium.* 53: 187-94.
- Curry MC, Luk NA, Kenny PA, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR** (2012). Distinct regulation of cytoplasmic calcium signals and cell death pathways by different plasma membrane calcium ATPase isoforms in MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Biol Chem.* 287: 28598-608.

- Curry MC, Peters AA, Kenny PA, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR** (2013). Mitochondrial calcium uniporter silencing potentiates caspase-independent cell death in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 434: 695-700.
- Dally S, Bredoux R, Corvazier E, Andersen JP, Clausen JD, Dode L, Fanchaouy M, Gelebart P, Monceau V, Del Monte F, Gwathmey JK, Hajjar R, Chaabane C, Bober R, Raies A, Enouf J** (2006). Ca²⁺-ATPases in non-failing and failing heart: evidence for a novel cardiac sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2 isoform (SERCA2c). *Biochem J.* 395: 249-58.
- David G, Barrett EF** (2003). Mitochondrial Ca²⁺ uptake prevents desynchronization of quantal release and minimizes depletion during repetitive stimulation of mouse motor nerve terminals. *J Physiol.* 548: 425-38.
- Davies RJ, Miller R, Coleman N** (2005). Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nat Rev Cancer.* 5: 199-209.
- Davis FM, Parsonage MT, Cabot PJ, Parat MO, Thompson EW, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR** (2013). Assessment of gene expression of intracellular calcium channels, pumps and exchangers with epidermal growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition in a breast cancer cell line. *Cancer Cell Int.* 13: 76.
- de la Fuente S, Fonteriz RI, Montero M, Alvarez J** (2013). Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum measured with a new low-Ca²⁺-affinity targeted aequorin. *Cell Calcium.* 54: 37-45.
- de la Fuente S, Matesanz-Isabel J, Fonteriz RI, Montero M, Alvarez J** (2014). Dynamics of mitochondrial Ca²⁺ uptake in MICU1-knockdown cells. *Biochem J.* 458: 33-40.
- De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabo I, Rizzuto R** (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature.* 476: 336-40.
- Decuypere JP, Bultynck G, Parys JB** (2011a). A dual role for Ca²⁺ in autophagy regulation. *Cell Calcium.* 50: 242-50.
- Decuypere JP, Monaco G, Bultynck G, Missiaen L, De Smedt H, Parys JB** (2011b). The IP₃ receptor-mitochondria connection in apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 1813: 1003-13.
- DeHaven WI, Jones BF, Petranka JG, Smyth JT, Tomita T, Bird GS, Putney JW, Jr.** (2009). TRPC channels function independently of STIM1 and Orai1. *J Physiol.* 587: 2275-98.
- del Monte F, Williams E, Lebeche D, Schmidt U, Rosenzweig A, Gwathmey JK, Lewandowski ED, Hajjar RJ** (2001). Improvement in survival and cardiac metabolism after gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in a rat model of heart failure. *Circulation.* 104: 1424-9.
- Deluca HF, Engstrom GW** (1961). Calcium uptake by rat kidney mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 47: 1744-50.
- Deng HW, Kwan CY** (1991). Cyclopiazonic acid is a sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-pump inhibitor of rat aortic muscle. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 12: 53-8.
- Derouiche S, Warnier M, Mariot P, Gosset P, Mauroy B, Bonnal JL, Slomianny C, Delcourt P, Prevarskaya N, Roudbaraki M** (2013). Bisphenol A stimulates human prostate cancer cell migration via remodelling of calcium signalling. *Springerplus.* 2: 54.
- Dhennin-Duthille I, Gautier M, Faouzi M, Guilbert A, Brevet M, Vaudry D, Ahidouch A, Sevestre H, Oquadid-Ahidouch H** (2011). High expression of transient receptor potential channels in human breast cancer epithelial cells and tissues: correlation with pathological parameters. *Cell Physiol Biochem.* 28: 813-22.

- Diaz-Hernandez JI, Gomez-Villafuertes R, Leon-Otegui M, Hontecillas-Prieto L, Del Puerto A, Trejo JL, Lucas JJ, Garrido JJ, Gualix J, Miras-Portugal MT, Diaz-Hernandez M** (2012). In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3beta and secretases. *Neurobiol Aging*. 33: 1816-28.
- Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Kalwa H, Storch U, Gudermann T** (2005). Functional characterization and physiological relevance of the TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 371: 257-65.
- Ding X, He Z, Zhou K, Cheng J, Yao H, Lu D, Cai R, Jin Y, Dong B, Xu Y, Wang Y** (2010). Essential role of TRPC6 channels in G2/M phase transition and development of human glioma. *J Natl Cancer Inst*. 102: 1052-68.
- Dirksen RT** (2009). Checking your SOCCs and feet: the molecular mechanisms of Ca²⁺ entry in skeletal muscle. *J Physiol*. 587: 3139-47.
- Dominguez-Rodriguez A, Diaz I, Rodriguez-Moyano M, Calderon-Sanchez E, Rosado JA, Ordóñez A, Smani T** (2012). Urotensin-II signaling mechanism in rat coronary artery: role of STIM1 and Orai1-dependent store operated calcium influx in vasoconstriction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 32: 1325-32.
- Dong H, Shim KN, Li JM, Estrema C, Ornelas TA, Nguyen F, Liu S, Ramamoorthy SL, Ho S, Carethers JM, Chow JY** (2010). Molecular mechanisms underlying Ca²⁺-mediated motility of human pancreatic duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 299: C1493-503.
- Dubois C, Vanden Abeele F, Lehen'kyi V, Gkika D, Guarmit B, Lepage G, Slomianny C, Borowiec AS, Bidaux G, Benahmed M, Shuba Y, Prevarskaya N** (2014). Remodeling of channel-forming ORAI proteins determines an oncogenic switch in prostate cancer. *Cancer Cell*. 26: 19-32.
- Dziadek MA, Johnstone LS** (2007). Biochemical properties and cellular localisation of STIM proteins. *Cell Calcium*. 42: 123-32.
- Eder P, Groschner K** (2008). TRPC3/6/7: Topical aspects of biophysics and pathophysiology. *Channels (Austin)*. 2: 94-9.
- El Boustany C, Bidaux G, Enfissi A, Delcourt P, Prevarskaya N, Capiod T** (2008). Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation. *Hepatology*. 47: 2068-77.
- Elmore S** (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 35: 495-516.
- Endo Y, Uzawa K, Mochida Y, Shiiba M, Bukawa H, Yokoe H, Tanzawa H** (2004). Sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase type 2 downregulated in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 110: 225-31.
- Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA** (2006). P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch*. 452: 552-62.
- Erdmann K, Kaulke K, Thomae C, Huebner D, Sergon M, Froehner M, Wirth MP, Fuessel S** (2014). Elevated expression of prostate cancer-associated genes is linked to down-regulation of microRNAs. *BMC Cancer*. 14: 82.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA** (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*. 25: 533-5.
- Faddy HM, Smart CE, Xu R, Lee GY, Kenny PA, Feng M, Rao R, Brown MA, Bissell MJ, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR** (2008). Localization of plasma membrane and secretory calcium pumps in the mammary gland. *Biochem Biophys Res Commun*. 369: 977-81.

- Fairclough RJ, Dode L, Vanoevelen J, Andersen JP, Missiaen L, Raeymaekers L, Wuytack F, Hovnanian A** (2003). Effect of Hailey-Hailey Disease mutations on the function of a new variant of human secretory pathway $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase (hSPCA1). *J Biol Chem.* 278: 24721-30.
- Fan L, Li A, Li W, Cai P, Yang B, Zhang M, Gu Y, Shu Y, Sun Y, Shen Y, Wu X, Hu G, Wu X, Xu Q** (2014a). Novel role of Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 in development of colorectal cancer and its regulation by F36, a curcumin analog. *Biomed Pharmacother.* 68: 1141-8.
- Fan H, Shen YX, Yuan YF** (2014b). Expression and prognostic roles of TRPV5 and TRPV6 in non-small cell lung cancer after curative resection. *Asian Pac J Cancer Prev.* 15: 2559-63.
- Fanger CM, Hoth M, Crabtree GR, Lewis RS** (1995). Characterization of T cell mutants with defects in capacitative calcium entry: genetic evidence for the physiological roles of CRAC channels. *J Cell Biol.* 131: 655-67.
- Faouzi M, Hague F, Potier M, Ahidouch A, Sevestre H, Ouadid-Ahidouch H** (2011). Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *J Cell Physiol.* 226: 542-51.
- Faouzi M, Kischel P, Hague F, Ahidouch A, Benzerdjeb N, Sevestre H, Penner R, Ouadid-Ahidouch H** (2013). Orai3 silencing alters cell proliferation and cell cycle progression via c-myc pathway in breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 1833: 752-60.
- Felix R** (2005). Molecular regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *J Recept Signal Transduct Res.* 25: 57-71.
- Feng M, Grice DM, Faddy HM, Nguyen N, Leitch S, Wang Y, Muend S, Kenny PA, Sukumar S, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR, Rao R** (2010). Store-independent activation of Orai1 by SPCA2 in mammary tumors. *Cell.* 143: 84-98.
- Feng MY, Rao R** (2013). New insights into store-independent Ca^{2+} entry: secretory pathway calcium ATPase 2 in normal physiology and cancer. *Int J Oral Sci.* 5: 71-4.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F** (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 136: E359-86.
- Fernandez RA, Wan J, Song S, Smith KA, Gu Y, Tauseef M, Tang H, Makino A, Mehta D, Yuan JX** (2015). Upregulated STIM2, TRPC6 and Orai2 Contribute to the Transition of Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells from a Contractile to Proliferative Phenotype. *Am J Physiol Cell Physiol.* ajpcell 00202 2014.
- Feske S, Giltzane J, Dolmetsch R, Staudt LM, Rao A** (2001). Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol.* 2: 316-24.
- Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A** (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature.* 441: 179-85.
- Fierro L, Parekh AB** (1999). Fast calcium-dependent inactivation of calcium release-activated calcium current (CRAC) in RBL-1 cells. *J Membr Biol.* 168: 9-17.
- Fierro L, Parekh AB** (2000). Substantial depletion of the intracellular Ca^{2+} stores is required for macroscopic activation of the Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current in rat basophilic leukaemia cells. *J Physiol.* 522 Pt 2: 247-57.
- Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS** (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol.* 15: 331-41.

- Fiorio Pla A, Ong HL, Cheng KT, Brossa A, Bussolati B, Lockwich T, Paria B, Munaron L, Ambudkar IS** (2012). TRPV4 mediates tumor-derived endothelial cell migration via arachidonic acid-activated actin remodeling. *Oncogene*. 31: 200-12.
- Flourakis M, Lehen'kyi V, Beck B, Raphael M, Vandenberghe M, Abeele FV, Roudbaraki M, Lepage G, Mauroy B, Romanin C, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N** (2010). Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. *Cell Death Dis*. 1: e75.
- Fogh J, Trempe G** (1975). New Human Tumor Cell Lines. *Human Tumor Cells in Vitro*, J. Fogh, ed. Springer US, pp. 115-159.
- Fomina AF, Nowycky MC** (1999). A current activated on depletion of intracellular Ca^{2+} stores can regulate exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J Neurosci*. 19: 3711-22.
- Forrest AS, Angermann JE, Raghunathan R, Lachendro C, Greenwood IA, Leblanc N** (2010). Intricate interaction between store-operated calcium entry and calcium-activated chloride channels in pulmonary artery smooth muscle cells. *Adv Exp Med Biol*. 661: 31-55.
- Foskett JK** (2010). Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels in neurological diseases. *Pflugers Arch*. 460: 481-94.
- Foyouzi-Youssefi R, Arnaudeau S, Borner C, Kelley WL, Tschopp J, Lew DP, Demaurex N, Krause KH** (2000). Bcl-2 decreases the free Ca^{2+} concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 5723-8.
- Frischauf I, Schindl R, Derler I, Bergsmann J, Fahrner M, Romanin C** (2008). The STIM/Orai coupling machinery. *Channels (Austin)*. 2: 261-8.
- Fuessel S, Sickert D, Meye A, Klenk U, Schmidt U, Schmitz M, Rost AK, Weigle B, Kiessling A, Wirth MP** (2003). Multiple tumor marker analyses (PSA, hK2, PSCA, trp-p8) in primary prostate cancers using quantitative RT-PCR. *Int J Oncol*. 23: 221-8.
- Furuichi T, Furutama D, Hakamata Y, Nakai J, Takeshima H, Mikoshiba K** (1994). Multiple types of ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels are differentially expressed in rabbit brain. *J Neurosci*. 14: 4794-805.
- Fusi C, Materazzi S, Minocci D, Maio V, Oranges T, Massi D, Nassini R** (2014). Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) is downregulated in keratinocytes in human non-melanoma skin cancer. *J Invest Dermatol*. 134: 2408-17.
- Gackiere F, Bidaux G, Delcourt P, Van Coppennolle F, Katsogiannou M, Dewailly E, Bavencoffe A, Van Chuoi-Mariot MT, Mauroy B, Prevarskaya N, Mariot P** (2008). $CaV3.2$ T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 283: 10162-73.
- Gackiere F, Warnier M, Katsogiannou M, Derouiche S, Delcourt P, Dewailly E, Slomianny C, Humez S, Prevarskaya N, Roudbaraki M, Mariot P** (2013). Functional coupling between large-conductance potassium channels and $CaV3.2$ voltage-dependent calcium channels participates in prostate cancer cell growth. *Biol Open*. 2: 941-51.
- Gala M, Chung DC** (2011). Hereditary colon cancer syndromes. *Semin Oncol*. 38: 490-9.
- Ge R, Tai Y, Sun Y, Zhou K, Yang S, Cheng T, Zou Q, Shen F, Wang Y** (2009). Critical role of TRPC6 channels in VEGF-mediated angiogenesis. *Cancer Lett*. 283: 43-51.
- Gees M, Colsool B, Nilius B** (2010). The role of transient receptor potential cation channels in Ca^{2+} signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2: a003962.

VII. REFERENCIAS

- Geiersbach KB, Samowitz WS** (2011). Microsatellite instability and colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 135: 1269-77.
- Gelebart P, Kovacs T, Brouland JP, van Gorp R, Grossmann J, Rivard N, Panis Y, Martin V, Bredoux R, Enouf J, Papp B** (2002). Expression of endomembrane calcium pumps in colon and gastric cancer cells. Induction of SERCA3 expression during differentiation. *J Biol Chem.* 277: 26310-20.
- Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Belan PV, Petersen OH** (1996). Inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from single isolated pancreatic zymogen granules. *Cell.* 84: 473-80.
- Giacomello M, De Mario A, Scarlatti C, Primerano S, Carafoli E** (2013). Plasma membrane calcium ATPases and related disorders. *Int J Biochem Cell Biol.* 45: 753-62.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP** (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 51: 1417-23.
- Gilroy DW, Colville-Nash PR** (2000). New insights into the role of COX 2 in inflammation. *J Mol Med (Berl).* 78: 121-9.
- Gilabert JA, Parekh AB** (2000). Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca²⁺ current I(CRAC). *EMBO J.* 19: 6401-7.
- Gilabert JA, Bakowski D, Parekh AB** (2001). Energized mitochondria increase the dynamic range over which inositol 1,4,5-trisphosphate activates store-operated calcium influx. *EMBO J.* 20: 2672-9.
- Giorgi C, Bonora M, Sorrentino G, Missiroli S, Poletti F, Suski JM, Galindo Ramirez F, Rizzuto R, Di Virgilio F, Zito E, Pandolfi PP, Wieckowski MR, Mammano F, Del Sal G, Pinton P** (2015). p53 at the endoplasmic reticulum regulates apoptosis in a Ca²⁺-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112: 1779-84.
- Gkika D, Flourakis M, Lemonnier L, Prevarskaya N** (2010). PSA reduces prostate cancer cell motility by stimulating TRPM8 activity and plasma membrane expression. *Oncogene.* 29: 4611-6.
- Glitsch MD, Bakowski D, Parekh AB** (2002). Store-operated Ca²⁺ entry depends on mitochondrial Ca²⁺ uptake. *EMBO J.* 21: 6744-54.
- Golovina VA, Platoshyn O, Bailey CL, Wang J, Limsuwan A, Sweeney M, Rubin LJ, Yuan JX** (2001). Upregulated TRP and enhanced capacitative Ca²⁺ entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280: H746-55.
- Gonzalez-Cobos JC, Zhang X, Zhang W, Ruhle B, Motiani RK, Schindl R, Muik M, Spinelli AM, Bisailon JM, Shinde AV, Fahrner M, Singer HA, Matrougui K, Barroso M, Romanin C, Trebak M** (2013). Store-independent Orai1/3 channels activated by intracrine leukotriene C4: role in neointimal hyperplasia. *Circ Res.* 112: 1013-25.
- Gou WF, Niu ZF, Zhao S, Takano Y, Zheng HC** (2014). Aberrant SERCA3 expression during the colorectal adenoma-adenocarcinoma sequence. *Oncol Rep.* 31: 232-40.
- Graham SJ, Dziadek MA, Johnstone LS** (2011). A cytosolic STIM2 preprotein created by signal peptide inefficiency activates ORAI1 in a store-independent manner. *J Biol Chem.* 286: 16174-85.
- Grice DM, Vetter I, Faddy HM, Kenny PA, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR** (2010). Golgi calcium pump secretory pathway calcium ATPase 1 (SPCA1) is a key regulator of insulin-

- like growth factor receptor (IGF1R) processing in the basal-like breast cancer cell line MDA-MB-231. *J Biol Chem.* 285: 37458-66.
- Grimaldi M, Maratos M, Verma A** (2003). Transient receptor potential channel activation causes a novel form of $[Ca^{2+}]_i$ oscillations and is not involved in capacitative Ca^{2+} entry in glial cells. *J Neurosci.* 23: 4737-45.
- Gross SA, Guzman GA, Wissenbach U, Philipp SE, Zhu MX, Bruns D, Cavalie A** (2009). TRPC5 is a Ca^{2+} -activated channel functionally coupled to Ca^{2+} -selective ion channels. *J Biol Chem.* 284: 34423-32.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY** (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260: 3440-50.
- Gu P, Zhou YB, Yang DR, Shan YX, Xue BX** (2014). [Inhibition of stromal interaction molecule 1 and the expression of apoptosis-related proteins in prostate cancer PC-3 cells]. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 20: 225-8.
- Guerini D** (1998). The significance of the isoforms of plasma membrane calcium ATPase. *Cell Tissue Res.* 292: 191-7.
- Guerini D, Garcia-Martin E, Zecca A, Guidi F, Carafoli E** (1998). The calcium pump of the plasma membrane: membrane targeting, calcium binding sites, tissue-specific isoform expression. *Acta Physiol Scand Suppl.* 643: 265-73.
- Guilbert A, Dhennin-Duthille I, Hiani YE, Haren N, Khorsi H, Sevestre H, Ahidouch A, Oquadid-Ahidouch H** (2008). Expression of TRPC6 channels in human epithelial breast cancer cells. *BMC Cancer.* 8: 125.
- Gunter TE, Gunter KK** (2001). Uptake of calcium by mitochondria: transport and possible function. *IUBMB Life.* 52: 197-204.
- Gurkoff G, Shahlaie K, Lyeth B, Berman R** (2013). Voltage-gated calcium channel antagonists and traumatic brain injury. *Pharmaceuticals (Basel).* 6: 788-812.
- Gusev K, Glouchankova L, Zubov A, Kaznacheyeva E, Wang Z, Bezprozvanny I, Mozhayeva GN** (2003). The store-operated calcium entry pathways in human carcinoma A431 cells: functional properties and activation mechanisms. *J Gen Physiol.* 122: 81-94.
- Gyorke S, Velez P, Suarez-Isla B, Fill M** (1994). Activation of single cardiac and skeletal ryanodine receptor channels by flash photolysis of caged Ca^{2+} . *Biophys J.* 66: 1879-86.
- Haglund F, Ma R, Huss M, Sulaiman L, Lu M, Nilsson IL, Hoog A, Juhlin CC, Hartman J, Larsson C** (2012). Evidence of a functional estrogen receptor in parathyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 97: 4631-9.
- Hajnoczky G, Csordas G, Das S, Garcia-Perez C, Saotome M, Sinha Roy S, Yi M** (2006). Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca^{2+} uptake in apoptosis. *Cell Calcium.* 40: 553-60.
- Half E, Bercovich D, Rozen P** (2009). Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis.* 4: 22.
- Hamilton SL** (2005). Ryanodine receptors. *Cell Calcium.* 38: 253-60.
- Hamilton SL, Serysheva, II** (2009). Ryanodine receptor structure: progress and challenges. *J Biol Chem.* 284: 4047-51.
- Hammadi M, Chopin V, Matifat F, Dhennin-Duthille I, Chasseraud M, Sevestre H, Oquadid-Ahidouch H** (2012). Human ether a-gogo K^+ channel 1 (hEag1) regulates MDA-MB-231

VII. REFERENCIAS

- breast cancer cell migration through Orai1-dependent calcium entry. *J Cell Physiol.* 227: 3837-46.
- Hanson CJ, Bootman MD, Roderick HL** (2004). Cell signalling: IP3 receptors channel calcium into cell death. *Curr Biol.* 14: R933-5.
- He B, Liu F, Ruan J, Li A, Chen J, Li R, Shen J, Zheng D, Luo R** (2012). Silencing TRPC1 expression inhibits invasion of CNE2 nasopharyngeal tumor cells. *Oncol Rep.* 27: 1548-54.
- Head JF, Inouye S, Teranishi K, Shimomura O** (2000). The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution. *Nature.* 405: 372-6.
- Hedberg C, Niceta M, Fattori F, Lindvall B, Ciolfi A, D'Amico A, Tasca G, Petrini S, Tulinius M, Tartaglia M, Oldfors A, Bertini E** (2014). Childhood onset tubular aggregate myopathy associated with de novo STIM1 mutations. *J Neurol.* 261: 870-6.
- Hedgepeth SC, Garcia MI, Wagner LE, 2nd, Rodriguez AM, Chintapalli SV, Snyder RR, Hankins GD, Henderson BR, Brodie KM, Yule DI, van Rossum DB, Boehning D** (2015). The BRCA1 Tumor Suppressor Binds to Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors to Stimulate Apoptotic Calcium Release. *J Biol Chem.*
- Henshall SM, Afar DE, Hiller J, Horvath LG, Quinn DI, Rasiah KK, Gish K, Willhite D, Kench JG, Gardiner-Garden M, Stricker PD, Scher HI, Grygiel JJ, Agus DB, Mack DH, Sutherland RL** (2003). Survival analysis of genome-wide gene expression profiles of prostate cancers identifies new prognostic targets of disease relapse. *Cancer Res.* 63: 4196-203.
- Hewavitharana T, Deng X, Soboloff J, Gill DL** (2007). Role of STIM and Orai proteins in the store-operated calcium signaling pathway. *Cell Calcium.* 42: 173-82.
- Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B** (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol.* 116: 424-48.
- Holzmann C, Kilch T, Kappel S, Armbruster A, Jung V, Stockle M, Bogeski I, Schwarz EC, Peinelt C** (2013). I_{CRAC} controls the rapid androgen response in human primary prostate epithelial cells and is altered in prostate cancer. *Oncotarget.* 4: 2096-107.
- Horton JS, Buckley CL, Alvarez EM, Schorlemmer A, Stokes AJ** (2014). The calcium release-activated calcium channel Orai1 represents a crucial component in hypertrophic compensation and the development of dilated cardiomyopathy. *Channels (Austin).* 8: 35-48.
- Hoth M, Penner R** (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature.* 355: 353-6.
- Hoth M, Penner R** (1993). Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol.* 465: 359-86.
- Hoth M, Fanger CM, Lewis RS** (1997). Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol.* 137: 633-48.
- Hoth M, Niemeyer BA** (2013). The neglected CRAC proteins: Orai2, Orai3, and STIM2. *Curr Top Membr.* 71: 237-71.
- Hou MF, Kuo HC, Li JH, Wang YS, Chang CC, Chen KC, Chen WC, Chiu CC, Yang S, Chang WC** (2011). Orai1/CRACM1 overexpression suppresses cell proliferation via attenuation of the store-operated calcium influx-mediated signalling pathway in A549 lung cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 1810: 1278-84.
- Hou X, Pedi L, Diver MM, Long SB** (2012). Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. *Science.* 338: 1308-13.

- House SJ, Potier M, Bisailon J, Singer HA, Trebak M** (2008). The non-excitabile smooth muscle: calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. *Pflugers Arch.* 456: 769-85.
- Hu Z, Bonifas JM, Beech J, Bench G, Shigihara T, Ogawa H, Ikeda S, Mauro T, Epstein EH, Jr.** (2000). Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nat Genet.* 24: 61-5.
- Hu J, Qin K, Zhang Y, Gong J, Li N, Lv D, Xiang R, Tan X** (2011). Downregulation of transcription factor Oct4 induces an epithelial-to-mesenchymal transition via enhancement of Ca^{2+} influx in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 411: 786-91.
- Hu F, Pan L, Zhang K, Xing F, Wang X, Lee I, Zhang X, Xu J** (2014). Elevation of extracellular Ca^{2+} induces store-operated calcium entry via calcium-sensing receptors: a pathway contributes to the proliferation of osteoblasts. *PLoS One.* 9: e107217.
- Huang GN, Zeng W, Kim JY, Yuan JP, Han L, Muallem S, Worley PF** (2006). STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol.* 8: 1003-10.
- Inserra MC, Lewis RJ** (2011). Venom Peptide modulators of the immune system. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 10: 399-410.
- Irvine RF** (1990). 'Quantal' Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphates--a possible mechanism. *FEBS Lett.* 263: 5-9.
- Jardin I, Redondo PC, Salido GM, Rosado JA** (2008). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate enhances store-operated calcium entry through hTRPC6 channel in human platelets. *Biochim Biophys Acta.* 1783: 84-97.
- Jiang D, Zhao L, Clapham DE** (2009). Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca^{2+}/H^{+} antiporter. *Science.* 326: 144-7.
- Jiang D, Zhao L, Clish CB, Clapham DE** (2013). Letm1, the mitochondrial Ca^{2+}/H^{+} antiporter, is essential for normal glucose metabolism and alters brain function in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110: E2249-54.
- Joiner ML, Koval OM, Li J, He BJ, Allamargot C, Gao Z, Luczak ED, Hall DD, Fink BD, Chen B, Yang J, Moore SA, Scholz TD, Strack S, Mohler PJ, Sivitz WI, Song LS, Anderson ME** (2012). CaMKII determines mitochondrial stress responses in heart. *Nature.* 491: 269-73.
- Jones RG, Bui T, White C, Madesh M, Krawczyk CM, Lindsten T, Hawkins BJ, Kubek S, Frauwirth KA, Wang YL, Conway SJ, Roderick HL, Bootman MD, Shen H, Foscett JK, Thompson CB** (2007). The proapoptotic factors Bax and Bak regulate T Cell proliferation through control of endoplasmic reticulum Ca^{2+} homeostasis. *Immunity.* 27: 268-80.
- Joseph SK** (1996). The inositol triphosphate receptor family. *Cell Signal.* 8: 1-7.
- Jouaville LS, Ichas F, Holmuhamedov EL, Camacho P, Lechleiter JD** (1995). Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature.* 377: 438-41.
- Jouaville LS, Pinton P, Bastianutto C, Rutter GA, Rizzuto R** (1999). Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 13807-12.
- Kang SS, Han KS, Ku BM, Lee YK, Hong J, Shin HY, Almonte AG, Woo DH, Brat DJ, Hwang EM, Yoo SH, Chung CK, Park SH, Paek SH, Roh EJ, Lee SJ, Park JY, Traynelis SF, Lee CJ** (2010). Caffeine-mediated inhibition of calcium release channel inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtype 3 blocks glioblastoma invasion and extends survival. *Cancer Res.* 70: 1173-83.

VII. REFERENCIAS

- Kar P, Bakowski D, Di Capite J, Nelson C, Parekh AB** (2012). Different agonists recruit different stromal interaction molecule proteins to support cytoplasmic Ca²⁺ oscillations and gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109: 6969-74.
- Kaznacheyeva E, Zubov A, Nikolaev A, Alexeenko V, Bezprozvanny I, Mozhayeva GN** (2000). Plasma membrane calcium channels in human carcinoma A431 cells are functionally coupled to inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate complexes. *J Biol Chem*. 275: 4561-4.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26: 239-57.
- Khananshvili D** (2014). Sodium-calcium exchangers (NCX): molecular hallmarks underlying the tissue-specific and systemic functions. *Pflugers Arch*. 466: 43-60.
- Kim MS, Hong JH, Li Q, Shin DM, Abramowitz J, Birnbaumer L, Muallem S** (2009). Deletion of TRPC3 in mice reduces store-operated Ca²⁺ influx and the severity of acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 137: 1509-17.
- Kim JY, Muallem S** (2011). Unlocking SOAR releases STIM. *EMBO J*. 30: 1673-5.
- Kim JH, Lkhagvadorj S, Lee MR, Hwang KH, Chung HC, Jung JH, Cha SK, Eom M** (2014). Orai1 and STIM1 are critical for cell migration and proliferation of clear cell renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 448: 76-82.
- Kimura T, Nakamori M, Lueck JD, Pouliquin P, Aoike F, Fujimura H, Dirksen RT, Takahashi MP, Dulhunty AF, Sakoda S** (2005). Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet*. 14: 2189-200.
- Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE** (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*. 427: 360-4.
- Kiselyov K, Mignery GA, Zhu MX, Muallem S** (1999). The N-terminal domain of the IP3 receptor gates store-operated hTrp3 channels. *Mol Cell*. 4: 423-9.
- Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR** (1982). Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry*. 21: 6188-93.
- Klemic KG, Klemic JF, Sigworth FJ** (2005). An air-molding technique for fabricating PDMS planar patch-clamp electrodes. *Pflugers Arch*. 449: 564-72.
- Kojima M, Morisaki T, Uchiyama A, Doi F, Mibu R, Katano M, Tanaka M** (2001). Association of enhanced cyclooxygenase-2 expression with possible local immunosuppression in human colorectal carcinomas. *Ann Surg Oncol*. 8: 458-65.
- Kondratska K, Kondratskyi A, Yassine M, Lemonnier L, Lepage G, Morabito A, Skryma R, Prevarskaya N** (2014). Orai1 and STIM1 mediate SOCE and contribute to apoptotic resistance of pancreatic adenocarcinoma. *Biochim Biophys Acta*. 1843: 2263-9.
- Kondratskyi A, Kondratska K, Skryma R, Prevarskaya N** (2014). Ion channels in the regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta*.
- Kranias EG, Bers DM** (2007). Calcium and cardiomyopathies. *Subcell Biochem*. 45: 523-37.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C** (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*. 87: 99-163.

- Kuga T, Kobayashi S, Hirakawa Y, Kanaide H, Takeshita A** (1996). Cell cycle--dependent expression of L- and T-type Ca^{2+} currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Circ Res.* 79: 14-9.
- Kuwajima G, Futatsugi A, Niinobe M, Nakanishi S, Mikoshiba K** (1992). Two types of ryanodine receptors in mouse brain: skeletal muscle type exclusively in Purkinje cells and cardiac muscle type in various neurons. *Neuron.* 9: 1133-42.
- Landolfi B, Curci S, Debellis L, Pozzan T, Hofer AM** (1998). Ca^{2+} homeostasis in the agonist-sensitive internal store: functional interactions between mitochondria and the ER measured in situ in intact cells. *J Cell Biol.* 142: 1235-43.
- Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL** (2010). Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2: a003996.
- Lasorsa FM, Pinton P, Palmieri L, Fiermonte G, Rizzuto R, Palmieri F** (2003). Recombinant expression of the Ca^{2+} -sensitive aspartate/glutamate carrier increases mitochondrial ATP production in agonist-stimulated Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 278: 38686-92.
- Launikonis BS, Rios E** (2007). Store-operated Ca^{2+} entry during intracellular Ca^{2+} release in mammalian skeletal muscle. *J Physiol.* 583: 81-97.
- Launikonis BS, Murphy RM, Edwards JN** (2010). Toward the roles of store-operated Ca^{2+} entry in skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 460: 813-23.
- Lee WJ, Roberts-Thomson SJ, Holman NA, May FJ, Lehrbach GM, Monteith GR** (2002). Expression of plasma membrane calcium pump isoform mRNAs in breast cancer cell lines. *Cell Signal.* 14: 1015-22.
- Lee WJ, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR** (2005a). Plasma membrane calcium-ATPase 2 and 4 in human breast cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 337: 779-83.
- Lee WJ, Robinson JA, Holman NA, McCall MN, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR** (2005b). Antisense-mediated inhibition of the plasma membrane calcium-ATPase suppresses proliferation of MCF-7 cells. *J Biol Chem.* 280: 27076-84.
- Lee KP, Yuan JP, Zeng W, So I, Worley PF, Muallem S** (2009). Molecular determinants of fast Ca^{2+} -dependent inactivation and gating of the Orai channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 14687-92.
- Lee JM, Davis FM, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR** (2011). Ion channels and transporters in cancer. 4. Remodeling of Ca^{2+} signaling in tumorigenesis: role of Ca^{2+} transport. *Am J Physiol Cell Physiol.* 301: C969-76.
- Leggett B, Whitehall V** (2010). Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 138: 2088-100.
- Lehen'kyi V, Flourakis M, Skryma R, Prevarskaya N** (2007). TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca^{2+} /NFAT-dependent pathways. *Oncogene.* 26: 7380-5.
- Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB, 3rd, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND** (1976). Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* 36: 4562-9.
- Lenz P, Bacot SM, Frazier-Jessen MR, Feldman GM** (2003). Nucleoporation of dendritic cells: efficient gene transfer by electroporation into human monocyte-derived dendritic cells. *FEBS Lett.* 538: 149-54.
- Levine B, Klionsky DJ** (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell.* 6: 463-77.

VII. REFERENCIAS

- Lewis RS** (2001). Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 19: 497-521.
- Lewis RS** (2011). Store-operated calcium channels: new perspectives on mechanism and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3.
- Li Q, Wang X, Yang Z, Wang B, Li S** (2009). Menthol induces cell death via the TRPM8 channel in the human bladder cancer cell line T24. *Oncology.* 77: 335-41.
- Li G, Zhang Z, Wang R, Ma W, Yang Y, Wei J, Wei Y** (2013a). Suppression of STIM1 inhibits human glioblastoma cell proliferation and induces G0/G1 phase arrest. *J Exp Clin Cancer Res.* 32: 20.
- Li W, Zhang M, Xu L, Lin D, Cai S, Zou F** (2013b). The apoptosis of non-small cell lung cancer induced by cisplatin through modulation of STIM1. *Exp Toxicol Pathol.* 65: 1073-81.
- Lievremont JP, Bird GS, Putney JW, Jr.** (2004). Canonical transient receptor potential TRPC7 can function as both a receptor- and store-operated channel in HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 287: C1709-16.
- Lin S, Fagan KA, Li KX, Shaul PW, Cooper DM, Rodman DM** (2000). Sustained endothelial nitric-oxide synthase activation requires capacitative Ca^{2+} entry. *J Biol Chem.* 275: 17979-85.
- Lin MJ, Leung GP, Zhang WM, Yang XR, Yip KP, Tse CM, Sham JS** (2004). Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca^{2+} channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. *Circ Res.* 95: 496-505.
- Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE, Jr., Meyer T** (2005). STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx. *Curr Biol.* 15: 1235-41.
- Lis A, Peinelt C, Beck A, Parvez S, Monteilh-Zoller M, Fleig A, Penner R** (2007). CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca^{2+} channels with distinct functional properties. *Curr Biol.* 17: 794-800.
- Liu X, Wang W, Singh BB, Lockwich T, Jadowiec J, O'Connell B, Wellner R, Zhu MX, Ambudkar IS** (2000). Trp1, a candidate protein for the store-operated Ca^{2+} influx mechanism in salivary gland cells. *J Biol Chem.* 275: 3403-11.
- Liu X, Singh BB, Ambudkar IS** (2003). TRPC1 is required for functional store-operated Ca^{2+} channels. Role of acidic amino acid residues in the S5-S6 region. *J Biol Chem.* 278: 11337-43.
- Liu X, Bandyopadhyay BC, Singh BB, Groschner K, Ambudkar IS** (2005). Molecular analysis of a store-operated and 2-acetyl-sn-glycerol-sensitive non-selective cation channel. Heteromeric assembly of TRPC1-TRPC3. *J Biol Chem.* 280: 21600-6.
- Liu DY, Thilo F, Scholze A, Wittstock A, Zhao ZG, Harteneck C, Zidek W, Zhu ZM, Tepel M** (2007). Increased store-operated and 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol-induced calcium influx in monocytes is mediated by transient receptor potential canonical channels in human essential hypertension. *J Hypertens.* 25: 799-808.
- Liu H, Hughes JD, Rollins S, Chen B, Perkins E** (2011). Calcium entry via ORAI1 regulates glioblastoma cell proliferation and apoptosis. *Exp Mol Pathol.* 91: 753-60.
- Liu J, Chen Y, Shuai S, Ding D, Li R, Luo R** (2014). TRPM8 promotes aggressiveness of breast cancer cells by regulating EMT via activating AKT/GSK-3 β pathway. *Tumour Biol.* 35: 8969-77.

- Lodola F, Laforenza U, Bonetti E, Lim D, Dragoni S, Bottino C, Ong HL, Guerra G, Ganini C, Massa M, Manzoni M, Ambudkar IS, Genazzani AA, Rosti V, Pedrazzoli P, Tanzi F, Moccia F, Porta C (2012). Store-operated Ca^{2+} entry is remodelled and controls in vitro angiogenesis in endothelial progenitor cells isolated from tumoral patients. *PLoS One*. 7: e42541.
- Logan CV, Szabadkai G, Sharpe JA, Parry DA, Torelli S, Childs AM, Kriek M, Phadke R, Johnson CA, Roberts NY, Bonthron DT, Pysden KA, Whyte T, Munteanu I, Foley AR, Wheway G, Szymanska K, Natarajan S, Abdelhamed ZA, Morgan JE, Roper H, Santen GW, Niks EH, van der Pol WL, Lindhout D, Raffaello A, De Stefani D, den Dunnen JT, Sun Y, Ginjaar I, Sewry CA, Hurles M, Rizzuto R, Duchon MR, Muntoni F, Sheridan E (2014). Loss-of-function mutations in MICU1 cause a brain and muscle disorder linked to primary alterations in mitochondrial calcium signaling. *Nat Genet*. 46: 188-93.
- Lompre AM, Benard L, Saliba Y, Aubart F, Fauconnier J, Hulot JS (2013). STIM1 and Orai in cardiac hypertrophy and vascular proliferative diseases. *Front Biosci (Schol Ed)*. 5: 766-73.
- Lopez E, Salido GM, Rosado JA, Berna-Erro A (2012). Unraveling STIM2 function. *J Physiol Biochem*. 68: 619-33.
- Lopez JJ, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA (2006). Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular Ca^{2+} stores. *J Biol Chem*. 281: 28254-64.
- Lory P, Bidaud I, Chemin J (2006). T-type calcium channels in differentiation and proliferation. *Cell Calcium*. 40: 135-46.
- Lucas P, Ukhanov K, Leinders-Zufall T, Zufall F (2003). A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron*. 40: 551-61.
- Luckhoff A, Clapham DE (1994). Calcium channels activated by depletion of internal calcium stores in A431 cells. *Biophys J*. 67: 177-82.
- Ma J, Fill M, Knudson CM, Campbell KP, Coronado R (1988). Ryanodine receptor of skeletal muscle is a gap junction-type channel. *Science*. 242: 99-102.
- Ma J, McCarl CA, Khalil S, Luthy K, Feske S (2010). T-cell-specific deletion of STIM1 and STIM2 protects mice from EAE by impairing the effector functions of Th1 and Th17 cells. *Eur J Immunol*. 40: 3028-42.
- Ma X, Cai Y, He D, Zou C, Zhang P, Lo CY, Xu Z, Chan FL, Yu S, Chen Y, Zhu R, Lei J, Jin J, Yao X (2012). Transient receptor potential channel TRPC5 is essential for P-glycoprotein induction in drug-resistant cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109: 16282-7.
- Ma X, Cheng KT, Wong CO, O'Neil RG, Birnbaumer L, Ambudkar IS, Yao X (2011a). Heteromeric TRPV4-C1 channels contribute to store-operated Ca^{2+} entry in vascular endothelial cells. *Cell Calcium*. 50: 502-9.
- Ma X, Nilius B, Wong JW, Huang Y, Yao X (2011b). Electrophysiological properties of heteromeric TRPV4-C1 channels. *Biochim Biophys Acta*. 1808: 2789-97.
- Maasho K, Marusina A, Reynolds NM, Coligan JE, Borrego F (2004). Efficient gene transfer into the human natural killer cell line, NKL, using the Amaxa nucleofection system. *J Immunol Methods*. 284: 133-40.
- Madsen CP, Klausen TK, Fabian A, Hansen BJ, Pedersen SF, Hoffmann EK (2012). On the role of TRPC1 in control of Ca^{2+} influx, cell volume, and cell cycle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 303: C625-34.

VII. REFERENCIAS

- Malli R, Frieden M, Osibow K, Zoratti C, Mayer M, Demaurex N, Graier WF** (2003). Sustained Ca^{2+} transfer across mitochondria is Essential for mitochondrial Ca^{2+} buffering, store-operated Ca^{2+} entry, and Ca^{2+} store refilling. *J Biol Chem.* 278: 44769-79.
- Mallilankaraman K, Doonan P, Cardenas C, Chandramoorthy HC, Muller M, Miller R, Hoffman NE, Gandhirajan RK, Molgo J, Birnbaum MJ, Rothberg BS, Mak DO, Foskett JK, Madesh M** (2012). MICU1 is an essential gatekeeper for MCU-mediated mitochondrial Ca^{2+} uptake that regulates cell survival. *Cell.* 151: 630-44.
- Manji SS, Parker NJ, Williams RT, van Stekelenburg L, Pearson RB, Dziadek M, Smith PJ** (2000). STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface. *Biochim Biophys Acta.* 1481: 147-55.
- Marchi S, Lupini L, Patergnani S, Rimessi A, Missiroli S, Bonora M, Bononi A, Corra F, Giorgi C, De Marchi E, Poletti F, Gafa R, Lanza G, Negrini M, Rizzuto R, Pinton P** (2013). Downregulation of the mitochondrial calcium uniporter by cancer-related miR-25. *Curr Biol.* 23: 58-63.
- Marchi S, Pinton P** (2014). The mitochondrial calcium uniporter complex: molecular components, structure and physiopathological implications. *J Physiol.* 592: 829-39.
- Mariot P, Prevarskaya N, Roudbaraki MM, Le Bourhis X, Van Coppenolle F, Vanoverberghe K, Skryma R** (2000). Evidence of functional ryanodine receptor involved in apoptosis of prostate cancer (LNCaP) cells. *Prostate.* 43: 205-14.
- Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR** (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 182: 1545-56.
- Martin-Romero FJ, Lopez-Guerrero AM, Alvarez IS, Pozo-Guisado E** (2012). Role of store-operated calcium entry during meiotic progression and fertilization of mammalian oocytes. *Int Rev Cell Mol Biol.* 295: 291-328.
- Martonosi AN, Pikula S** (2003). The structure of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Acta Biochim Pol.* 50: 337-65.
- Maruyama Y, Ogura T, Mio K, Kato K, Kaneko T, Kiyonaka S, Mori Y, Sato C** (2009). Tetrameric Orai1 is a teardrop-shaped molecule with a long, tapered cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 284: 13676-85.
- Matsumoto M, Baba Y** (2013). [Role of STIM-dependent Ca^{2+} influx in regulatory B cells]. *Yakugaku Zasshi.* 133: 419-25.
- Matsumoto M, Fujii Y, Baba A, Hikida M, Kurosaki T, Baba Y** (2011). The calcium sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through interleukin-10 production. *Immunity.* 34: 703-14.
- McAndrew D, Grice DM, Peters AA, Davis FM, Stewart T, Rice M, Smart CE, Brown MA, Kenny PA, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR** (2011). ORAI1-mediated calcium influx in lactation and in breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 10: 448-60.
- McCormack JG, Denton RM** (1979). The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Biochem J.* 180: 533-44.
- McPherson PS, Campbell KP** (1993). The ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channel. *J Biol Chem.* 268: 13765-8.
- Meissner G** (1986). Ryanodine activation and inhibition of the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 261: 6300-6.

- Meldolesi J** (1993). Keeping the stores full. *Curr Biol.* 3: 910-2.
- Mercer JC, Dehaven WI, Smyth JT, Wedel B, Boyles RR, Bird GS, Putney JW, Jr.** (2006). Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *J Biol Chem.* 281: 24979-90.
- Michalak M, Robert Parker JM, Opas M** (2002). Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium.* 32: 269-78.
- Michelangeli F, East JM** (2011). A diversity of SERCA Ca²⁺ pump inhibitors. *Biochem Soc Trans.* 39: 789-97.
- Miederer AM, Alansary D, Schwar G, Lee PH, Jung M, Helms V, Niemeyer BA** (2015). A STIM2 splice variant negatively regulates store-operated calcium entry. *Nat Commun.* 6: 6899.
- Mignen O, Thompson JL, Shuttleworth TJ** (2007). STIM1 regulates Ca²⁺ entry via arachidonate-regulated Ca²⁺-selective (ARC) channels without store depletion or translocation to the plasma membrane. *J Physiol.* 579: 703-15.
- Mignen O, Thompson JL, Shuttleworth TJ** (2008a). Orai1 subunit stoichiometry of the mammalian CRAC channel pore. *J Physiol.* 586: 419-25.
- Mignen O, Thompson JL, Shuttleworth TJ** (2008b). Both Orai1 and Orai3 are essential components of the arachidonate-regulated Ca²⁺-selective (ARC) channels. *J Physiol.* 586: 185-95.
- Mignen O, Thompson JL, Shuttleworth TJ** (2009). The molecular architecture of the arachidonate-regulated Ca²⁺-selective ARC channel is a pentameric assembly of Orai1 and Orai3 subunits. *J Physiol.* 587: 4181-97.
- Miklavc P, Thompson KE, Frick M** (2013). A new role for P2X4 receptors as modulators of lung surfactant secretion. *Front Cell Neurosci.* 7: 171.
- Mikoshiba K** (2007). IP3 receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. *J Neurochem.* 102: 1426-46.
- Missiaen L, Van Acker K, Parys JB, De Smedt H, Van Baelen K, Weidema AF, Vanoevelen J, Raeymaekers L, Renders J, Callewaert G, Rizzuto R, Wuytack F** (2001). Baseline cytosolic Ca²⁺ oscillations derived from a non-endoplasmic reticulum Ca²⁺ store. *J Biol Chem.* 276: 39161-70.
- Missiaen L, Van Acker K, Van Baelen K, Raeymaekers L, Wuytack F, Parys JB, De Smedt H, Vanoevelen J, Dode L, Rizzuto R, Callewaert G** (2004). Calcium release from the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum in HeLa cells stably expressing targeted aequorin to these compartments. *Cell Calcium.* 36: 479-87.
- Missiaen L, Dode L, Vanoevelen J, Raeymaekers L, Wuytack F** (2007). Calcium in the Golgi apparatus. *Cell Calcium.* 41: 405-16.
- Mitchell P, Moyle J** (1967). Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature.* 213: 137-9.
- Mitchell KJ, Pinton P, Varadi A, Tacchetti C, Ainscow EK, Pozzan T, Rizzuto R, Rutter GA** (2001). Dense core secretory vesicles revealed as a dynamic Ca²⁺ store in neuroendocrine cells with a vesicle-associated membrane protein aequorin chimera. *J Cell Biol.* 155: 41-51.
- Mitchell KJ, Lai FA, Rutter GA** (2003). Ryanodine receptor type I and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate receptors mediate Ca²⁺ release from insulin-containing vesicles in living pancreatic beta-cells (MIN6). *J Biol Chem.* 278: 11057-64.

VII. REFERENCIAS

- Mizuno H, Suzuki Y, Watanabe M, Sokabe T, Yamamoto T, Hattori R, Gotoh M, Tominaga M** (2014). Potential role of transient receptor potential (TRP) channels in bladder cancer cells. *J Physiol Sci.* 64: 305-14.
- Moccia F, Poletto V** (2014). May the remodeling of the Ca toolkit in endothelial progenitor cells derived from cancer patients suggest alternative targets for anti-angiogenic treatment? *Biochim Biophys Acta.*
- Monteith GR, McAndrew D, Faddy HM, Roberts-Thomson SJ** (2007). Calcium and cancer: targeting Ca²⁺ transport. *Nat Rev Cancer.* 7: 519-30.
- Monteith GR, Davis FM, Roberts-Thomson SJ** (2012). Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences. *J Biol Chem.* 287: 31666-73.
- Montero M, Brini M, Marsault R, Alvarez J, Sitia R, Pozzan T, Rizzuto R** (1995). Monitoring dynamic changes in free Ca²⁺ concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells. *EMBO J.* 14: 5467-75.
- Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, Garcia AG, Garcia-Sancho J, Alvarez J** (2000). Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol.* 2: 57-61.
- Moreau B, Nelson C, Parekh AB** (2006). Biphasic regulation of mitochondrial Ca²⁺ uptake by cytosolic Ca²⁺ concentration. *Curr Biol.* 16: 1672-7.
- Mori Y, Wakamori M, Miyakawa T, Hermosura M, Hara Y, Nishida M, Hirose K, Mizushima A, Kurosaki M, Mori E, Gotoh K, Okada T, Fleig A, Penner R, Iino M, Kurosaki T** (2002). Transient receptor potential 1 regulates capacitative Ca²⁺ entry and Ca²⁺ release from endoplasmic reticulum in B lymphocytes. *J Exp Med.* 195: 673-81.
- Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y** (2002). An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem.* 277: 34287-94.
- Motiani RK, Abdullaev IF, Trebak M** (2010). A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells. *J Biol Chem.* 285: 19173-83.
- Motiani RK, Hyzinski-Garcia MC, Zhang X, Henkel MM, Abdullaev IF, Kuo YH, Matrougui K, Mongin AA, Trebak M** (2013a). STIM1 and Orai1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion. *Pflugers Arch.* 465: 1249-60.
- Motiani RK, Zhang X, Harmon KE, Keller RS, Matrougui K, Bennett JA, Trebak M** (2013b). Orai3 is an estrogen receptor alpha-regulated Ca²⁺ channel that promotes tumorigenesis. *FASEB J.* 27: 63-75.
- Moyer MP, Manzano LA, Merriman RL, Stauffer JS, Tanzer LR** (1996). NCM460, a normal human colon mucosal epithelial cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 32: 315-7.
- Muik M, Schindl R, Fahrner M, Romanin C** (2012). Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) current, structure, and function. *Cell Mol Life Sci.* 69: 4163-76.
- Mukherjee S, Brooks WH** (2014). Stromal interaction molecules as important therapeutic targets in diseases with dysregulated calcium flux. *Biochim Biophys Acta.* 1843: 2307-14.
- Mundade R, Imperiale TF, Prabhu L, Loehrer PJ, Lu T** (2014). Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience.* 1: 400-6.

- Nakagawa T, Yuan J** (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol.* 150: 887-94.
- Neher E, Sakmann B** (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature.* 260: 799-802.
- Newbury DF, Winchester L, Addis L, Paracchini S, Buckingham LL, Clark A, Cohen W, Cowie H, Dworzynski K, Everitt A, Goodyer IM, Hennessy E, Kindley AD, Miller LL, Nasir J, O'Hare A, Shaw D, Simkin Z, Simonoff E, Slonims V, Watson J, Ragoussis J, Fisher SE, Seckl JR, Helms PJ, Bolton PF, Pickles A, Conti-Ramsden G, Baird G, Bishop DV, Monaco AP** (2009). CMIP and ATP2C2 modulate phonological short-term memory in language impairment. *Am J Hum Genet.* 85: 264-72.
- Nilius B, Owsianik G** (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.* 12: 218.
- Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P** (1991). Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science.* 253: 665-9.
- Nunez L, Valero RA, Senovilla L, Sanz-Blasco S, Garcia-Sancho J, Villalobos C** (2006). Cell proliferation depends on mitochondrial Ca^{2+} uptake: inhibition by salicylate. *J Physiol.* 571: 57-73.
- Ohba T, Watanabe H, Murakami M, Takahashi Y, Iino K, Kuromitsu S, Mori Y, Ono K, Iijima T, Ito H** (2007). Upregulation of TRPC1 in the development of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 42: 498-507.
- Oh-Hora M, Yamashita M, Hogan PG, Sharma S, Lamperti E, Chung W, Prakriya M, Feske S, Rao A** (2008). Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nat Immunol.* 9: 432-43.
- Ohkubo T, Yamazaki J** (2012). T-type voltage-activated calcium channel Cav3.1, but not Cav3.2, is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Oncol.* 41: 267-75.
- Okamoto Y, Ohkubo T, Ikebe T, Yamazaki J** (2012). Blockade of TRPM8 activity reduces the invasion potential of oral squamous carcinoma cell lines. *Int J Oncol.* 40: 1431-40.
- Oldershaw KA, Taylor CW** (1990). 2,5-Di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone mobilizes inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive and -insensitive Ca^{2+} stores. *FEBS Lett.* 274: 214-6.
- Ong HL, Cheng KT, Liu X, Bandyopadhyay BC, Paria BC, Soboloff J, Pani B, Gwack Y, Srikanth S, Singh BB, Gill DL, Ambudkar IS** (2007). Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components. *J Biol Chem.* 282: 9105-16.
- Otsu K, Willard HF, Khanna VK, Zorzato F, Green NM, MacLennan DH** (1990). Molecular cloning of cDNA encoding the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 265: 13472-83.
- Pacher P, Thomas AP, Hajnoczky G** (2002). Ca^{2+} marks: miniature calcium signals in single mitochondria driven by ryanodine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 2380-5.
- Pacifico F, Ulianich L, De Micheli S, Treglia S, Leonardi A, Vito P, Formisano S, Consiglio E, Di Jeso B** (2003). The expression of the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases in thyroid and its down-regulation following neoplastic transformation. *J Mol Endocrinol.* 30: 399-409.

VII. REFERENCIAS

- Palmer HG, Gonzalez-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, Quintanilla M, Cano A, de Herreros AG, Lafarga M, Munoz A** (2001). Vitamin D₃ promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol.* 154: 369-87.
- Palmer AE, Jin C, Reed JC, Tsien RY** (2004). Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca²⁺ analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 17404-9.
- Palty R, Silverman WF, Hershinkel M, Caporale T, Sensi SL, Parnis J, Nolte C, Fishman D, Shoshan-Barmatz V, Herrmann S, Khananshvil D, Sekler I** (2010). NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 436-41.
- Pani B, Cornatzer E, Cornatzer W, Shin DM, Pittelkow MR, Hovnanian A, Ambudkar IS, Singh BB** (2006). Up-regulation of transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) following sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2 gene silencing promotes cell survival: a potential role for TRPC1 in Darier's disease. *Mol Biol Cell.* 17: 4446-58.
- Papp B, Brouland JP** (2011). Altered Endoplasmic Reticulum Calcium Pump Expression during Breast Tumorigenesis. *Breast Cancer (Auckl).* 5: 163-74.
- Parekh AB, Penner R** (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev.* 77: 901-30.
- Parekh AB** (1998). Slow feedback inhibition of calcium release-activated calcium current by calcium entry. *J Biol Chem.* 273: 14925-32.
- Parekh AB, Putney JW, Jr.** (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.* 85: 757-810.
- Parekh AB** (2008). Mitochondrial regulation of store-operated CRAC channels. *Cell Calcium.* 44: 6-13.
- Park CY, Shcheglovitov A, Dolmetsch R** (2010). The CRAC channel activator STIM1 binds and inhibits L-type voltage-gated calcium channels. *Science.* 330: 101-5.
- Parker NJ, Begley CG, Smith PJ, Fox RM** (1996). Molecular cloning of a novel human gene (D11S4896E) at chromosomal region 11p15.5. *Genomics.* 37: 253-6.
- Parvez S, Beck A, Peinelt C, Soboloff J, Lis A, Monteilh-Zoller M, Gill DL, Fleig A, Penner R** (2008). STIM2 protein mediates distinct store-dependent and store-independent modes of CRAC channel activation. *FASEB J.* 22: 752-61.
- Patel S, Joseph SK, Thomas AP** (1999). Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium.* 25: 247-64.
- Patel S, Docampo R** (2010). Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular Ca²⁺ signaling. *Trends Cell Biol.* 20: 277-86.
- Patron M, Raffaello A, Granatiero V, Tosatto A, Merli G, De Stefani D, Wright L, Pallafacchina G, Terrin A, Mammucari C, Rizzuto R** (2013). The mitochondrial calcium uniporter (MCU): molecular identity and physiological roles. *J Biol Chem.* 288: 10750-8.
- Patterson RL, van Rossum DB, Gill DL** (1999). Store-operated Ca²⁺ entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell.* 98: 487-99.
- Patterson RL, Boehning D, Snyder SH** (2004). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu Rev Biochem.* 73: 437-65.
- Paula-Lima AC, Brito-Moreira J, Ferreira ST** (2013). Deregulation of excitatory neurotransmission underlying synapse failure in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 126: 191-202.

- Peinelt C, Vig M, Koomoa DL, Beck A, Nadler MJ, Koblan-Huberson M, Lis A, Fleig A, Penner R, Kinet JP** (2006). Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol.* 8: 771-3.
- Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Vassilev PM, Tsukaguchi H, Brown EM, Hediger MA** (1999). Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J Biol Chem.* 274: 22739-46.
- Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Weremowicz S, Morton CC, Vassilev PM, Brown EM, Hediger MA** (2000). Human calcium transport protein CaT1. *Biochem Biophys Res Commun.* 278: 326-32.
- Peng JB, Zhuang L, Berger UV, Adam RM, Williams BJ, Brown EM, Hediger MA, Freeman MR** (2001). CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 282: 729-34.
- Penner R, Matthews G, Neher E** (1988). Regulation of calcium influx by second messengers in rat mast cells. *Nature.* 334: 499-504.
- Perocchi F, Gohil VM, Girgis HS, Bao XR, McCombs JE, Palmer AE, Mootha VK** (2010). MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca^{2+} uptake. *Nature.* 467: 291-6.
- Peters AA, Simpson PT, Bassett JJ, Lee JM, Da Silva L, Reid LE, Song S, Parat MO, Lakhani SR, Kenny PA, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR** (2012). Calcium channel TRPV6 as a potential therapeutic target in estrogen receptor-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 11: 2158-68.
- Petersen OH, Burdakova N** (2002). The specificity of Ca^{2+} signalling. *Acta Physiol Hung.* 89: 439-50.
- Petersen OH, Michalak M, Verkhratsky A** (2005). Calcium signalling: past, present and future. *Cell Calcium.* 38: 161-9.
- Philipp S, Cavalie A, Freichel M, Wissenbach U, Zimmer S, Trost C, Marquart A, Murakami M, Flockerzi V** (1996). A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to Drosophila TRP and TRPL. *EMBO J.* 15: 6166-71.
- Philipp S, Hambrecht J, Braslavski L, Schroth G, Freichel M, Murakami M, Cavalie A, Flockerzi V** (1998). A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *EMBO J.* 17: 4274-82.
- Philipp S, Trost C, Warnat J, Rautmann J, Himmerkus N, Schroth G, Kretz O, Nastainczyk W, Cavalie A, Hoth M, Flockerzi V** (2000). TRP4 (CCE1) protein is part of native calcium release-activated Ca^{2+} -like channels in adrenal cells. *J Biol Chem.* 275: 23965-72.
- Philipp S, Strauss B, Hirnet D, Wissenbach U, Mery L, Flockerzi V, Hoth M** (2003). TRPC3 mediates T-cell receptor-dependent calcium entry in human T-lymphocytes. *J Biol Chem.* 278: 26629-38.
- Philipson KD, Nicoll DA** (2000). Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annu Rev Physiol.* 62: 111-33.
- Philipson KD, Nicoll DA, Ottolia M, Quednau BD, Reuter H, John S, Qiu Z** (2002). The $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange molecule: an overview. *Ann N Y Acad Sci.* 976: 1-10.
- Piao L, Li Y, Kim SJ, Byun HS, Huang SM, Hwang SK, Yang KJ, Park KA, Won M, Hong J, Hur GM, Seok JH, Shong M, Cho MH, Brazil DP, Hemmings BA, Park J** (2009). Association of LETM1 and MRPL36 contributes to the regulation of mitochondrial ATP production and necrotic cell death. *Cancer Res.* 69: 3397-404.

VII. REFERENCIAS

- Pierro C, Cook SJ, Foets TC, Bootman MD, Roderick HL** (2014). Oncogenic K-Ras suppresses IP₃-dependent Ca²⁺ release through remodelling of the isoform composition of IP₃Rs and ER luminal Ca²⁺ levels in colorectal cancer cell lines. *J Cell Sci.* 127: 1607-19.
- Pigozzi D, Ducret T, Tajeddine N, Gala JL, Tombal B, Gailly P** (2006). Calcium store contents control the expression of TRPC1, TRPC3 and TRPV6 proteins in LNCaP prostate cancer cell line. *Cell Calcium.* 39: 401-15.
- Pinton P, Pozzan T, Rizzuto R** (1998). The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 17: 5298-308.
- Pinton P, Ferrari D, Magalhaes P, Schulze-Osthoff K, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R** (2000). Reduced loading of intracellular Ca²⁺ stores and downregulation of capacitative Ca²⁺ influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J Cell Biol.* 148: 857-62.
- Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R** (2008). Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene.* 27: 6407-18.
- Potier M, Trebak M** (2008). New developments in the signaling mechanisms of the store-operated calcium entry pathway. *Pflugers Arch.* 457: 405-15.
- Pouli AE, Karagenc N, Wasmeier C, Hutton JC, Bright N, Arden S, Schofield JG, Rutter GA** (1998). A phogrin-aequorin chimera to image free Ca²⁺ in the vicinity of secretory granules. *Biochem J.* 330 (Pt 3): 1399-404.
- Pozo-Guisado E, Martin-Romero FJ** (2013). The regulation of STIM1 by phosphorylation. *Commun Integr Biol.* 6: e26283.
- Pozzan T, Magalhaes P, Rizzuto R** (2000). The comeback of mitochondria to calcium signalling. *Cell Calcium.* 28: 279-83.
- Prakriya M, Feske S, Gwack Y, Srikanth S, Rao A, Hogan PG** (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature.* 443: 230-3.
- Prakriya M, Lewis RS** (2006). Regulation of CRAC channel activity by recruitment of silent channels to a high open-probability gating mode. *J Gen Physiol.* 128: 373-86.
- Prevarskaya N, Skryma R, Bidaux G, Flourakis M, Shuba Y** (2007). Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells. *Cell Death Differ.* 14: 1295-304.
- Prevarskaya N, Ouadid-Ahidouch H, Skryma R, Shuba Y** (2014). Remodelling of Ca²⁺ transport in cancer: how it contributes to cancer hallmarks? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 369: 20130097.
- Puskin JS, Gunter TE, Gunter KK, Russell PR** (1976). Evidence for more than one Ca²⁺ transport mechanism in mitochondria. *Biochemistry.* 15: 3834-42.
- Putney JW, Jr.** (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium.* 7: 1-12.
- Putney JW, Jr.** (1990). Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium.* 11: 611-24.
- Putney JW** (2009). Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunol Rev.* 231: 10-22.
- Quednau BD, Nicoll DA, Philipson KD** (2004). The sodium/calcium exchanger family-SLC8. *Pflugers Arch.* 447: 543-8.
- Quintana A, Schwindling C, Wenning AS, Becherer U, Rettig J, Schwarz EC, Hoth M** (2007). T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 14418-23.

- Quintana A, Pasche M, Junker C, Al-Ansary D, Rieger H, Kummerow C, Nunez L, Villalobos C, Meraner P, Becherer U, Rettig J, Niemeyer BA, Hoth M (2011). Calcium microdomains at the immunological synapse: how ORAI channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for efficient T-cell activation. *EMBO J*. 30: 3895-912.
- Randriamampita C, Tsien RY (1993). Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature*. 364: 809-14.
- Rao JN, Platoshyn O, Golovina VA, Liu L, Zou T, Marasa BS, Turner DJ, Yuan JX, Wang JY (2006). TRPC1 functions as a store-operated Ca^{2+} channel in intestinal epithelial cells and regulates early mucosal restitution after wounding. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 290: G782-92.
- Rao JN, Rathor N, Zhuang R, Zou T, Liu L, Xiao L, Turner DJ, Wang JY (2012). Polyamines regulate intestinal epithelial restitution through TRPC1-mediated Ca^{2+} signaling by differentially modulating STIM1 and STIM2. *Am J Physiol Cell Physiol*. 303: C308-17.
- Rao W, Zhang L, Su N, Wang K, Hui H, Wang L, Chen T, Luo P, Yang YF, Liu ZB, Fei Z (2013). Blockade of SOCE protects HT22 cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 441: 351-6.
- Raphael M, Lehen'kyi V, Vandenberghe M, Beck B, Khalimonchyk S, Vanden Abeele F, Farsetti L, Germain E, Bokhobza A, Mihalache A, Gosset P, Romanin C, Clezardin P, Skryma R, Prevarskaya N (2014). TRPV6 calcium channel translocates to the plasma membrane via Orai1-mediated mechanism and controls cancer cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111: E3870-9.
- Raymond CR, Redman SJ (2006). Spatial segregation of neuronal calcium signals encodes different forms of LTP in rat hippocampus. *J Physiol*. 570: 97-111.
- Reisner PD, Brandt PC, Vanaman TC (1997). Analysis of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase expression in control and SV40-transformed human fibroblasts. *Cell Calcium*. 21: 53-62.
- Ribiczey P, Tordai A, Andrikovics H, Filoteo AG, Penniston JT, Enouf J, Enyedi A, Papp B, Kovacs T (2007). Isoform-specific up-regulation of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase expression during colon and gastric cancer cell differentiation. *Cell Calcium*. 42: 590-605.
- Rizzuto R, Simpson AW, Brini M, Pozzan T (1992). Rapid changes of mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*. 358: 325-7.
- Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T (1993). Microdomains with high Ca^{2+} close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*. 262: 744-7.
- Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. *Science*. 280: 1763-6.
- Rizzuto R, Pozzan T (2006). Microdomains of intracellular Ca^{2+} : molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev*. 86: 369-408.
- Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13: 566-78.
- Rodman DM, Reese K, Harral J, Fouty B, Wu S, West J, Hoedt-Miller M, Tada Y, Li KX, Cool C, Fagan K, Cribbs L (2005). Low-voltage-activated (T-type) calcium channels control proliferation of human pulmonary artery myocytes. *Circ Res*. 96: 864-72.
- Rong YP, Bultynck G, Aromolaran AS, Zhong F, Parys JB, De Smedt H, Mignery GA, Roderick HL, Bootman MD, Distelhorst CW (2009). The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium

VII. REFERENCIAS

- release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP₃ receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106: 14397-402.
- Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Liudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Velicelebi G, Stauderman KA** (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol*. 169: 435-45.
- Ruano Y, Mollejo M, Ribalta T, Fiano C, Camacho FI, Gomez E, de Lope AR, Hernandez-Moneo JL, Martinez P, Melendez B** (2006). Identification of novel candidate target genes in amplicons of Glioblastoma multiforme tumors detected by expression and CGH microarray profiling. *Mol Cancer*. 5: 39.
- Ruhle B, Trebak M** (2013). Emerging roles for native Orai Ca²⁺ channels in cardiovascular disease. *Curr Top Membr*. 71: 209-35.
- Rustgi AK** (2013). BRAF: a driver of the serrated pathway in colon cancer. *Cancer Cell*. 24: 1-2.
- Ryazantseva M, Skobeleva K, Kaznacheyeva E** (2013). Familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutation M146V affects store-operated calcium entry: does gain look like loss? *Biochimie*. 95: 1506-9.
- Sabbioni S, Barbanti-Brodano G, Croce CM, Negrini M** (1997). GOK: a gene at 11p15 involved in rhabdomyosarcoma and rhabdoid tumor development. *Cancer Res*. 57: 4493-7.
- Sage SO** (1992). Three routes for receptor-mediated Ca²⁺ entry. *Curr Biol*. 2: 312-4.
- Saito K, Uzawa K, Endo Y, Kato Y, Nakashima D, Ogawara K, Shiba M, Bukawa H, Yokoe H, Tanzawa H** (2006). Plasma membrane Ca²⁺ ATPase isoform 1 down-regulated in human oral cancer. *Oncol Rep*. 15: 49-55.
- Saito H, Minamiya Y, Watanabe H, Takahashi N, Ito M, Toda H, Konno H, Mitsui M, Motoyama S, Ogawa J** (2011). Expression of the transient receptor potential channel c3 correlates with a favorable prognosis in patients with adenocarcinoma of the lung. *Ann Surg Oncol*. 18: 3377-83.
- Sakakura C, Hagiwara A, Fukuda K, Shimomura K, Takagi T, Kin S, Nakase Y, Fujiyama J, Mikoshiba K, Okazaki Y, Yamagishi H** (2003). Possible involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 (IP₃R₃) in the peritoneal dissemination of gastric cancers. *Anticancer Res*. 23: 3691-7.
- Saliba Y, Keck M, Marchand A, Atassi F, Ouille A, Cazorla O, Trebak M, Pavoine C, Lacampagne A, Hulot J, Fares N, Fauconnier J, Lompre A** (2014). Emergence of Orai3 activity during cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*.
- Salido GM, Sage SO, Rosado JA** (2009). TRPC channels and store-operated Ca²⁺ entry. *Biochim Biophys Acta*. 1793: 223-30.
- Saul S, Stanisiz H, Backes CS, Schwarz EC, Hoth M** (2014). How ORAI and TRP channels interfere with each other: interaction models and examples from the immune system and the skin. *Eur J Pharmacol*. 739: 49-59.
- Scaduto RC, Jr., Grotyohann LW** (1999). Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J*. 76: 469-77.
- Schindl R, Frischauf I, Bergsmann J, Muik M, Derler I, Lackner B, Groschner K, Romanin C** (2009). Plasticity in Ca²⁺ selectivity of Orai1/Orai3 heteromeric channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106: 19623-8.

- Schmidt U, Fuessel S, Koch R, Baretton GB, Lohse A, Tomasetti S, Unversucht S, Froehner M, Wirth MP, Meye A (2006). Quantitative multi-gene expression profiling of primary prostate cancer. *Prostate*. 66: 1521-34.
- Schnetkamp PP (2013). The SLC24 gene family of Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchangers: from sight and smell to memory consolidation and skin pigmentation. *Mol Aspects Med*. 34: 455-64.
- Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science*. 300: 135-9.
- Scrideli CA, Carlotti CG, Jr., Okamoto OK, Andrade VS, Cortez MA, Motta FJ, Lucio-Eterovic AK, Neder L, Rosemberg S, Oba-Shinjo SM, Marie SK, Tone LG (2008). Gene expression profile analysis of primary glioblastomas and non-neoplastic brain tissue: identification of potential target genes by oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. *J Neurooncol*. 88: 281-91.
- Sei Y, Gallagher KL, Basile AS (1999). Skeletal muscle type ryanodine receptor is involved in calcium signaling in human B lymphocytes. *J Biol Chem*. 274: 5995-6002.
- Shen WW, Frieden M, Demaurex N (2011). Local cytosolic Ca²⁺ elevations are required for stromal interaction molecule 1 (STIM1) de-oligomerization and termination of store-operated Ca²⁺ entry. *J Biol Chem*. 286: 36448-59.
- Shi Y, Ding X, He ZH, Zhou KC, Wang Q, Wang YZ (2009). Critical role of TRPC6 channels in G2 phase transition and the development of human oesophageal cancer. *Gut*. 58: 1443-50.
- Shi ZX, Rao W, Wang H, Wang ND, Si JW, Zhao J, Li JC, Wang ZR (2015). Modeled microgravity suppressed invasion and migration of human glioblastoma U87 cells through downregulating store-operated calcium entry. *Biochem Biophys Res Commun*. 457: 378-84.
- Shibao K, Fiedler MJ, Nagata J, Minagawa N, Hirata K, Nakayama Y, Iwakiri Y, Nathanson MH, Yamaguchi K (2010). The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is associated with aggressiveness of colorectal carcinoma. *Cell Calcium*. 48: 315-23.
- Shim AH, Tirado-Lee L, Prakriya M (2015). Structural and functional mechanisms of CRAC channel regulation. *J Mol Biol*. 427: 77-93.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*. 59: 223-39.
- Shimomura O, Kishi Y, Inouye S (1993). The relative rate of aequorin regeneration from apoaequorin and coelenterazine analogues. *Biochem J*. 296 (Pt 3): 549-51.
- Shimomura O (1995). Luminescence of aequorin is triggered by the binding of two calcium ions. *Biochem Biophys Res Commun*. 211: 359-63.
- Shuttleworth TJ (2009). Arachidonic acid, ARC channels, and Orai proteins. *Cell Calcium*. 45: 602-10.
- Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedewa S, Lin C, Leach C, Cannady RS, Cho H, Scoppa S, Hachey M, Kirch R, Jemal A, Ward E (2012). Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 62: 220-41.
- Singaravelu K, Nelson C, Bakowski D, de Brito OM, Ng SW, Di Capite J, Powell T, Scorrano L, Parekh AB (2011). Mitofusin 2 regulates STIM1 migration from the Ca²⁺ store to the plasma membrane in cells with depolarized mitochondria. *J Biol Chem*. 286: 12189-201.

VII. REFERENCIAS

- Siwek M, Henseler C, Broich K, Papazoglou A, Weiergraber M** (2012). Voltage-gated Ca²⁺ channel mediated Ca²⁺ influx in epileptogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 740: 1219-47.
- Skopin A, Shalygin A, Vigont V, Zimina O, Glushankova L, Mozhayeva GN, Kaznacheyeva E** (2013). TRPC1 protein forms only one type of native store-operated channels in HEK293 cells. *Biochimie.* 95: 347-53.
- Smaili SS, Pereira GJ, Costa MM, Rocha KK, Rodrigues L, do Carmo LG, Hirata H, Hsu YT** (2013). The role of calcium stores in apoptosis and autophagy. *Curr Mol Med.* 13: 252-65.
- Smith KA, Voiriot G, Tang H, Fraidenburg DR, Song S, Yamamura H, Yamamura A, Guo Q, Wan J, Pohl NM, Tauseef M, Bodmer R, Ocorr K, Thistlethwaite PA, Haddad GG, Powell FL, Makino A, Mehta D, Yuan JX** (2015). Notch Activation of Ca Signaling Mediates Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction and Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol.*
- Soboloff J, Spassova MA, Hewavitharana T, He LP, Xu W, Johnstone LS, Dziadek MA, Gill DL** (2006). STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca²⁺ Entry. *Curr Biol.* 16: 1465-70.
- Soboloff J, Rothberg BS, Madesh M, Gill DL** (2012). STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13: 549-65.
- Song J, Wang Y, Li X, Shen Y, Yin M, Guo Y, Diao L, Liu Y, Yue D** (2013). Critical role of TRPC6 channels in the development of human renal cell carcinoma. *Mol Biol Rep.* 40: 5115-22.
- Sorrentino V, Volpe P** (1993). Ryanodine receptors: how many, where and why? *Trends Pharmacol Sci.* 14: 98-103.
- Sorrentino V** (1995). The ryanodine receptor family of intracellular calcium release channels. *Adv Pharmacol.* 33: 67-90.
- Sorrentino V** (2004). Molecular determinants of the structural and functional organization of the sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta.* 1742: 113-8.
- Spinelli AM, Gonzalez-Cobos JC, Zhang X, Motiani RK, Rowan S, Zhang W, Garrett J, Vincent PA, Matrougui K, Singer HA, Trebak M** (2012). Airway smooth muscle STIM1 and Orai1 are upregulated in asthmatic mice and mediate PDGF-activated SOCE, CRAC currents, proliferation, and migration. *Pflugers Arch.* 464: 481-92.
- Stanisz H, Saul S, Muller CS, Kappl R, Niemeyer BA, Vogt T, Hoth M, Roesch A, Bogeski I** (2014). Inverse regulation of melanoma growth and migration by Orai1/STIM2-dependent calcium entry. *Pigment Cell Melanoma Res.* 27: 442-53.
- Stathopoulos PB, Ikura M** (2013). Structural aspects of calcium-release activated calcium channel function. *Channels (Austin).* 7: 344-53.
- Stauffer JS, Manzano LA, Balch GC, Merriman RL, Tanzer LR, Moyer MP** (1995). Development and characterization of normal colonic epithelial cell lines derived from normal mucosa of patients with colon cancer. *Am J Surg.* 169: 190-5; discussion 195-6.
- Steinbeck JA, Henke N, Opatz J, Gruszczynska-Biegala J, Schneider L, Theiss S, Hamacher N, Steinfarz B, Golz S, Brustle O, Kuznicki J, Methner A** (2011). Store-operated calcium entry modulates neuronal network activity in a model of chronic epilepsy. *Exp Neurol.* 232: 185-94.
- Steinlein OK, Bertrand D** (2008). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: from the genetic analysis to neurological diseases. *Biochem Pharmacol.* 76: 1175-83.

- Stiber J, Hawkins A, Zhang ZS, Wang S, Burch J, Graham V, Ward CC, Seth M, Finch E, Malouf N, Williams RS, Eu JP, Rosenberg P** (2008). STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat Cell Biol.* 10: 688-97.
- Strehler EE, Zacharias DA** (2001). Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev.* 81: 21-50.
- Strehler EE, Filoteo AG, Penniston JT, Caride AJ** (2007). Plasma-membrane Ca²⁺ pumps: structural diversity as the basis for functional versatility. *Biochem Soc Trans.* 35: 919-22.
- Sugioka M, Yamashita M** (2003). Calcium signaling to nucleus via store-operated system during cell cycle in retinal neuroepithelium. *Neurosci Res.* 45: 447-58.
- Sun S, Li W, Zhang H, Zha L, Xue Y, Wu X, Zou F** (2012). Requirement for store-operated calcium entry in sodium butyrate-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Biosci Rep.* 32: 83-90.
- Sun J, Lu F, He H, Shen J, Messina J, Mathew R, Wang D, Sarnaik AA, Chang WC, Kim M, Cheng H, Yang S** (2014). STIM1- and Orai1-mediated Ca²⁺ oscillation orchestrates invadopodium formation and melanoma invasion. *J Cell Biol.* 207: 535-48.
- Sundivakkam PC, Freichel M, Singh V, Yuan JP, Vogel SM, Flockerzi V, Malik AB, Tiruppathi C** (2012). The Ca²⁺ sensor stromal interaction molecule 1 (STIM1) is necessary and sufficient for the store-operated Ca²⁺ entry function of transient receptor potential canonical (TRPC) 1 and 4 channels in endothelial cells. *Mol Pharmacol.* 81: 510-26.
- Sung JY, Engmann O, Teylan MA, Nairn AC, Greengard P, Kim Y** (2008). WAVE1 controls neuronal activity-induced mitochondrial distribution in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 3112-6.
- Sweeney M, McDaniel SS, Platoshyn O, Zhang S, Yu Y, Lapp BR, Zhao Y, Thistlethwaite PA, Yuan JX** (2002). Role of capacitative Ca²⁺ entry in bronchial contraction and remodeling. *J Appl Physiol (1985).* 92: 1594-602.
- Szatkowski C, Parys JB, Ouadid-Ahidouch H, Matifat F** (2010). Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ signalling is involved in estradiol-induced breast cancer epithelial cell growth. *Mol Cancer.* 9: 156.
- Szlufcik K, Missiaen L, Parys JB, Callewaert G, De Smedt H** (2006). Uncoupled IP3 receptor can function as a Ca²⁺-leak channel: cell biological and pathological consequences. *Biol Cell.* 98: 1-14.
- Tajeddine N, Gailly P** (2012). TRPC1 protein channel is major regulator of epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem.* 287: 16146-57.
- Takahashi Y, Murakami M, Watanabe H, Hasegawa H, Ohba T, Munehisa Y, Nobori K, Ono K, Iijima T, Ito H** (2007a). Essential role of the N-terminus of murine Orai1 in store-operated Ca²⁺ entry. *Biochem Biophys Res Commun.* 356: 45-52.
- Takahashi Y, Watanabe H, Murakami M, Ono K, Munehisa Y, Koyama T, Nobori K, Iijima T, Ito H** (2007b). Functional role of stromal interaction molecule 1 (STIM1) in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 361: 934-40.
- Takemura H, Hughes AR, Thastrup O, Putney JW, Jr.** (1989). Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J Biol Chem.* 264: 12266-71.

VII. REFERENCIAS

- Taketo MM** (2012). Roles of stromal microenvironment in colon cancer progression. *J Biochem.* 151: 477-81.
- Tang S, Wang X, Shen Q, Yang X, Yu C, Cai C, Cai G, Meng X, Zou F** (2015). Mitochondrial Ca uniporter is critical for store-operated Ca entry-dependent breast cancer cell migration. *Biochem Biophys Res Commun.*
- Tao X, Zhao N, Jin H, Zhang Z, Liu Y, Wu J, Bast RC, Jr., Yu Y, Feng Y** (2013). FSH enhances the proliferation of ovarian cancer cells by activating transient receptor potential channel C3. *Endocr Relat Cancer.* 20: 415-29.
- Taylor CW, Traynor D** (1995). Calcium and inositol trisphosphate receptors. *J Membr Biol.* 145: 109-18.
- Taylor CW, da Fonseca PC, Morris EP** (2004). IP₃ receptors: the search for structure. *Trends Biochem Sci.* 29: 210-9.
- Taylor JT, Zeng XB, Pottle JE, Lee K, Wang AR, Yi SG, Scruggs JA, Sikka SS, Li M** (2008). Calcium signaling and T-type calcium channels in cancer cell cycling. *World J Gastroenterol.* 14: 4984-91.
- Teranishi K, Shimomura O** (1997). Coelenterazine analogs as chemiluminescent probe for superoxide anion. *Anal Biochem.* 249: 37-43.
- Thebault S, Lemonnier L, Bidaux G, Flourakis M, Bavencoffe A, Gordienko D, Roudbaraki M, Delcourt P, Panchin Y, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N** (2005). Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem.* 280: 39423-35.
- Thebault S, Flourakis M, Vanoverberghe K, Vandermoere F, Roudbaraki M, Lehen'kyi V, Slomianny C, Beck B, Mariot P, Bonnal JL, Mauroy B, Shuba Y, Capiod T, Skryma R, Prevarskaya N** (2006). Differential role of transient receptor potential channels in Ca²⁺ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res.* 66: 2038-47.
- Thiel M, Lis A, Penner R** (2013). STIM2 drives Ca²⁺ oscillations through store-operated Ca²⁺ entry caused by mild store depletion. *J Physiol.* 591: 1433-45.
- Tinel H, Cancela JM, Mogami H, Gerasimenko JV, Gerasimenko OV, Tepikin AV, Petersen OH** (1999). Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local cytosolic Ca²⁺ signals. *EMBO J.* 18: 4999-5008.
- Tiruppathi C, Ahmmed GU, Vogel SM, Malik AB** (2006). Ca²⁺ signaling, TRP channels, and endothelial permeability. *Microcirculation.* 13: 693-708.
- Tosun M, Paul RJ, Rapoport RM** (1998). Coupling of store-operated Ca⁺⁺ entry to contraction in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 285: 759-66.
- Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H** (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature.* 405: 647-55.
- Toyoshima C** (2009). How Ca²⁺-ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1793: 941-6.
- Toyota M, Ho C, Ohe-Toyota M, Baylin SB, Issa JP** (1999). Inactivation of CACNA1G, a T-type calcium channel gene, by aberrant methylation of its 5' CpG island in human tumors. *Cancer Res.* 59: 4535-41.

- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev.* 62: 405-96.
- Trepakova ES, Gericke M, Hirakawa Y, Weisbrod RM, Cohen RA, Bolotina VM (2001). Properties of a native cation channel activated by Ca^{2+} store depletion in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 276: 7782-90.
- Trepakova ES, Csutora P, Hunton DL, Marchase RB, Cohen RA, Bolotina VM (2000). Calcium influx factor directly activates store-operated cation channels in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 275: 26158-63.
- Triggle DJ (1990). Calcium, calcium channels, and calcium channel antagonists. *Can J Physiol Pharmacol.* 68: 1474-81.
- Tsavalier L, Shapero MH, Morkowski S, Laus R (2001). Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res.* 61: 3760-9.
- Tsien RW (1983). Calcium channels in excitable cell membranes. *Annu Rev Physiol.* 45: 341-58.
- Tsunoda T, Koga H, Yokomizo A, Tatsugami K, Eto M, Inokuchi J, Hirata A, Masuda K, Okumura K, Naito S (2005). Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor type1 (IP3R1) modulates the acquisition of cisplatin resistance in bladder cancer cell lines. *Oncogene.* 24: 1396-402.
- Umemura M, Baljinnyam E, Feske S, De Lorenzo MS, Xie LH, Feng X, Oda K, Makino A, Fujita T, Yokoyama U, Iwatsubo M, Chen S, Goydos JS, Ishikawa Y, Iwatsubo K (2014). Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) regulates melanoma proliferation and cell migration. *PLoS One.* 9: e89292.
- Vaca L, Kunze DL (1994). Depletion of intracellular Ca^{2+} stores activates a Ca^{2+} -selective channel in vascular endothelium. *Am J Physiol.* 267: C920-5.
- Valero RA, Senovilla L, Nunez L, Villalobos C (2008). The role of mitochondrial potential in control of calcium signals involved in cell proliferation. *Cell Calcium.* 44: 259-69.
- Valero ML, Mello de Queiroz F, Stuhmer W, Viana F, Pardo LA (2012). TRPM8 ion channels differentially modulate proliferation and cell cycle distribution of normal and cancer prostate cells. *PLoS One.* 7: e51825.
- Van Baelen K, Vanoevelen J, Missiaen L, Raeymaekers L, Wuytack F (2001). The Golgi PMR1 P-type ATPase of *Caenorhabditis elegans*. Identification of the gene and demonstration of calcium and manganese transport. *J Biol Chem.* 276: 10683-91.
- Van Baelen K, Dode L, Vanoevelen J, Callewaert G, De Smedt H, Missiaen L, Parys JB, Raeymaekers L, Wuytack F (2004). The Ca^{2+}/Mn^{2+} pumps in the Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta.* 1742: 103-12.
- van Engeland M, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP (1996). A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry.* 24: 131-9.
- Vandebrouck C, Martin D, Colson-Van Schoor M, Debaix H, Gailly P (2002). Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *J Cell Biol.* 158: 1089-96.
- Vandecaetsbeek I, Vangheluwe P, Raeymaekers L, Wuytack F, Vanoevelen J (2011). The Ca^{2+} pumps of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3.

VII. REFERENCIAS

- Vanden Abeele F, Skryma R, Shuba Y, Van Coppennolle F, Slomianny C, Roudbaraki M, Mauroy B, Wuytack F, Prevarskaya N** (2002). Bcl-2-dependent modulation of Ca²⁺ homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell*. 1: 169-79.
- Vanden Abeele F, Roudbaraki M, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N** (2003). Store-operated Ca²⁺ current in prostate cancer epithelial cells. Role of endogenous Ca²⁺ transporter type 1. *J Biol Chem*. 278: 15381-9.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB** (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 324: 1029-33.
- Vangheluwe P, Sepulveda MR, Missiaen L, Raeymaekers L, Wuytack F, Vanoevelen J** (2009). Intracellular Ca²⁺- and Mn²⁺-transport ATPases. *Chem Rev*. 109: 4733-59.
- VanHouten J, Sullivan C, Bazinet C, Ryoo T, Camp R, Rimm DL, Chung G, Wysolmerski J** (2010). PMCA2 regulates apoptosis during mammary gland involution and predicts outcome in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107: 11405-10.
- Vanoevelen J, Dode L, Van Baelen K, Fairclough RJ, Missiaen L, Raeymaekers L, Wuytack F** (2005). The secretory pathway Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase 2 is a Golgi-localized pump with high affinity for Ca²⁺ ions. *J Biol Chem*. 280: 22800-8.
- Varga K, Paszty K, Padanyi R, Hegedus L, Brouland JP, Papp B, Enyedi A** (2014). Histone deacetylase inhibitor- and PMA-induced upregulation of PMCA4b enhances Ca²⁺ clearance from MCF-7 breast cancer cells. *Cell Calcium*. 55: 78-92.
- Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B** (2009). Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost*. 7: 1057-66.
- Vasington FD, Murphy JV** (1962). Ca ion uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. *J Biol Chem*. 237: 2670-7.
- Veliceasa D, Ivanovic M, Hoepfner FT, Thumbikat P, Volpert OV, Smith ND** (2007). Transient potential receptor channel 4 controls thrombospondin-1 secretion and angiogenesis in renal cell carcinoma. *FEBS J*. 274: 6365-77.
- Venetucci L, Denegri M, Napolitano C, Priori SG** (2012). Inherited calcium channelopathies in the pathophysiology of arrhythmias. *Nat Rev Cardiol*. 9: 561-75.
- Venkatachalam K, van Rossum DB, Patterson RL, Ma HT, Gill DL** (2002). The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nat Cell Biol*. 4: E263-72.
- Venkatachalam K, Luo J, Montell C** (2014). Evolutionarily conserved, multitasking TRP channels: lessons from worms and flies. *Handb Exp Pharmacol*. 223: 937-62.
- Vermassen E, Parys JB, Mauger JP** (2004). Subcellular distribution of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: functional relevance and molecular determinants. *Biol Cell*. 96: 3-17.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C** (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 184: 39-51.
- Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R, Kinet JP** (2006). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science*. 312: 1220-3.
- Villalobos C, Garcia-Sancho J** (1995). Capacitative Ca²⁺ entry contributes to the Ca²⁺ influx induced by thyrotropin-releasing hormone (TRH) in GH3 pituitary cells. *Pflugers Arch*. 430: 923-35.

- Villalobos C, Nunez L, Montero M, Garcia AG, Alonso MT, Chamero P, Alvarez J, Garcia-Sancho J (2002). Redistribution of Ca²⁺ among cytosol and organella during stimulation of bovine chromaffin cells. *FASEB J*. 16: 343-53.
- Voets T, Prenen J, Fleig A, Vennekens R, Watanabe H, Hoenderop JG, Bindels RJ, Droogmans G, Penner R, Nilius B (2001). CaT1 and the calcium release-activated calcium channel manifest distinct pore properties. *J Biol Chem*. 276: 47767-70.
- Voets T, Janssens A, Droogmans G, Nilius B (2004). Outer pore architecture of a Ca²⁺-selective TRP channel. *J Biol Chem*. 279: 15223-30.
- Voets T, Owsianik G, Nilius B (2007). TRPM8. *Handb Exp Pharmacol*. 329-44.
- von Tscharner V, Prod'hom B, Baggiolini M, Reuter H (1986). Ion channels in human neutrophils activated by a rise in free cytosolic calcium concentration. *Nature*. 324: 369-72.
- Wang XT, Nagaba Y, Cross HS, Wrba F, Zhang L, Guggino SE (2000). The mRNA of L-type calcium channel elevated in colon cancer: protein distribution in normal and cancerous colon. *Am J Pathol*. 157: 1549-62.
- Wang X, Pluznick JL, Wei P, Padanilam BJ, Sansom SC (2004). TRPC4 forms store-operated Ca²⁺ channels in mouse mesangial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 287: C357-64.
- Wang Y, Deng X, Mancarella S, Hendron E, Eguchi S, Soboloff J, Tang XD, Gill DL (2010). The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels. *Science*. 330: 105-9.
- Wang JY, Chen BK, Wang YS, Tsai YT, Chen WC, Chang WC, Hou MF, Wu YC, Chang WC (2012a). Involvement of store-operated calcium signaling in EGF-mediated COX-2 gene activation in cancer cells. *Cell Signal*. 24: 162-9.
- Wang Y, Wang X, Yang Z, Zhu G, Chen D, Meng Z (2012b). Menthol inhibits the proliferation and motility of prostate cancer DU145 cells. *Pathol Oncol Res*. 18: 903-10.
- Wang D, Li X, Liu J, Li J, Li LJ, Qiu MX (2014a). Effects of TRPC6 on invasibility of low-differentiated prostate cancer cells. *Asian Pac J Trop Med*. 7: 44-7.
- Wang JY, Sun J, Huang MY, Wang YS, Hou MF, Sun Y, He H, Krishna N, Chiu SJ, Lin S, Yang S, Chang WC (2014b). STIM1 overexpression promotes colorectal cancer progression, cell motility and COX-2 expression. *Oncogene*.
- Wang CA, Liu Q, Chen Y, Liu S, Xu J, Cui X, Zhang Y, Piao L (2015a). Clinical implication of leucine zipper/EF hand-containing transmembrane-1 overexpression in the prognosis of triple-negative breast cancer. *Exp Mol Pathol*. 98: 254-9.
- Wang T, Chen Z, Zhu Y, Pan Q, Liu Y, Qi X, Jin L, Jin J, Ma X, Hua D (2015b). Inhibition of transient receptor potential channel 5 reverses 5-Fluorouracil resistance in human colorectal cancer cells. *J Biol Chem*. 290: 448-56.
- Warnat J, Philipp S, Zimmer S, Flockerzi V, Cavalie A (1999). Phenotype of a recombinant store-operated channel: highly selective permeation of Ca²⁺. *J Physiol*. 518 (Pt 3): 631-8.
- Wasniewska M, Duszynski J (2000). The role of mitochondrial dysfunction in regulation of store-operated calcium channels in glioma C6 and human fibroblast cells. *FEBS Lett*. 478: 237-40.
- Watson R, Parekh AB (2012). Mitochondrial regulation of CRAC channel-driven cellular responses. *Cell Calcium*. 52: 52-6.

- Wei Y, Chen J, Rosas G, Tompkins DA, Holt PA, Rao R** (2000). Phenotypic screening of mutations in Pmr1, the yeast secretory pathway $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase, reveals residues critical for ion selectivity and transport. *J Biol Chem.* 275: 23927-32.
- White C, Li C, Yang J, Petrenko NB, Madesh M, Thompson CB, Foskett JK** (2005). The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-X(L) modulation of the InsP3R. *Nat Cell Biol.* 7: 1021-8.
- Williams RT, Manji SS, Parker NJ, Hancock MS, Van Stekelenburg L, Eid JP, Senior PV, Kazenwadel JS, Shandala T, Saint R, Smith PJ, Dziadek MA** (2001). Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochem J.* 357: 673-85.
- Wissenbach U, Niemeyer BA, Fixemer T, Schneidewind A, Trost C, Cavalie A, Reus K, Meese E, Bonkhoff H, Flockerzi V** (2001). Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J Biol Chem.* 276: 19461-8.
- Wong CK, So WY, Law SK, Leung FP, Yau KL, Yao X, Huang Y, Li X, Tsang SY** (2012). Estrogen controls embryonic stem cell proliferation via store-operated calcium entry and the nuclear factor of activated T-cells (NFAT). *J Cell Physiol.* 227: 2519-30.
- Wu SN, Jan CR, Li HF** (1999). Ruthenium red-mediated inhibition of large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in rat pituitary GH3 cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 290: 998-1005.
- Wu X, Zagranichnaya TK, Gurda GT, Eves EM, Villereal ML** (2004). A TRPC1/TRPC3-mediated increase in store-operated calcium entry is required for differentiation of H19-7 hippocampal neuronal cells. *J Biol Chem.* 279: 43392-402.
- Wu Z, Qing J, Xia Y, Wang K, Zhang F** (2015). Suppression of stromal interaction molecule 1 inhibits SMMC7721 hepatocellular carcinoma cell proliferation by inducing cell cycle arrest. *Biotechnol Appl Biochem.* 62: 107-11.
- Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L** (2002). Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium.* 32: 279-305.
- Yagami T, Kohma H, Yamamoto Y** (2012). L-type voltage-dependent calcium channels as therapeutic targets for neurodegenerative diseases. *Curr Med Chem.* 19: 4816-27.
- Yanamandra N, Buzzeo RW, Gabriel M, Hazlehurst LA, Mari Y, Beaupre DM, Cuevas J** (2011). Tipifarnib-induced apoptosis in acute myeloid leukemia and multiple myeloma cells depends on Ca^{2+} influx through plasma membrane Ca^{2+} channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 337: 636-43.
- Yang S, Zhang JJ, Huang XY** (2009a). Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell.* 15: 124-34.
- Yang SL, Cao Q, Zhou KC, Feng YJ, Wang YZ** (2009b). Transient receptor potential channel C3 contributes to the progression of human ovarian cancer. *Oncogene.* 28: 1320-8.
- Yang ZH, Wang XH, Wang HP, Hu LQ** (2009c). Effects of TRPM8 on the proliferation and motility of prostate cancer PC-3 cells. *Asian J Androl.* 11: 157-65.
- Yang C, Mo X, Lv J, Liu X, Yuan M, Dong M, Li L, Luo X, Fan X, Jin Z, Liu Z, Liu J** (2012). Lipopolysaccharide enhances FcepsilonRI-mediated mast cell degranulation by increasing Ca^{2+} entry through store-operated Ca^{2+} channels: implications for lipopolysaccharide exacerbating allergic asthma. *Exp Physiol.* 97: 1315-27.
- Yang N, Tang Y, Wang F, Zhang H, Xu D, Shen Y, Sun S, Yang G** (2013). Blockade of store-operated Ca^{2+} entry inhibits hepatocarcinoma cell migration and invasion by regulating focal adhesion turnover. *Cancer Lett.* 330: 163-9.

- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL** (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13: 134.
- Yee NS, Zhou W, Lee M** (2010). Transient receptor potential channel TRPM8 is over-expressed and required for cellular proliferation in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Lett*. 297: 49-55.
- Yee NS, Li Q, Kazi AA, Yang Z, Berg A, Yee RK** (2014). Aberrantly Over-Expressed TRPM8 Channels in Pancreatic Adenocarcinoma: Correlation with Tumor Size/Stage and Requirement for Cancer Cells Invasion. *Cells*. 3: 500-16.
- Yeromin AV, Zhang SL, Jiang W, Yu Y, Safrina O, Cahalan MD** (2006). Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature*. 443: 226-9.
- Yoshida J, Iwabuchi K, Matsui T, Ishibashi T, Masuoka T, Nishio M** (2012). Knockdown of stromal interaction molecule 1 (STIM1) suppresses store-operated calcium entry, cell proliferation and tumorigenicity in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biochem Pharmacol*. 84: 1592-603.
- Yu Y, Sweeney M, Zhang S, Platoshyn O, Landsberg J, Rothman A, Yuan JX** (2003). PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *Am J Physiol Cell Physiol*. 284: C316-30.
- Yuan JP, Zeng W, Huang GN, Worley PF, Muallem S** (2007). STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol*. 9: 636-45.
- Yue L, Peng JB, Hediger MA, Clapham DE** (2001). CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature*. 410: 705-9.
- Zador E, Vangheluwe P, Wuytack F** (2007). The expression of the neonatal sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump (SERCA1b) hints to a role in muscle growth and development. *Cell Calcium*. 41: 379-88.
- Zagranichnaya TK, Wu X, Villereal ML** (2005). Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 proteins combine to form native store-operated channels in HEK-293 cells. *J Biol Chem*. 280: 29559-69.
- Zeng B, Yuan C, Yang X, Atkin SL, Xu SZ** (2013). TRPC channels and their splice variants are essential for promoting human ovarian cancer cell proliferation and tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets*. 13: 103-16.
- Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW** (1997). Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science*. 276: 1268-72.
- Zhang L, Barritt GJ** (2004). Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca²⁺ channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Res*. 64: 8365-73.
- Zhang SS, Wen J, Yang F, Cai XL, Yang H, Luo KJ, Liu QW, Hu RG, Xie X, Huang QY, Chen JY, Fu JH, Hu Y** (2013). High expression of transient potential receptor C6 correlated with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Med Oncol*. 30: 607.
- Zhang X, Trebak M** (2014). Transient receptor potential canonical 7: a diacylglycerol-activated non-selective cation channel. *Handb Exp Pharmacol*. 222: 189-204.
- Zhao XZ, Guo HQ, Liu GX, Ji CW, Zhang SW, Liu TS, Gan WD, Li XG** (2010). [Inhibitory effect of TRPV6 silencing on prostate cancer cell line LNCaP in vitro]. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 16: 423-7.

VII. REFERENCIAS

- Zhivotovsky B, Orrenius S** (2011). Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community. *Cell Calcium*. 50: 211-21.
- Zhong F, Harr MW, Bultynck G, Monaco G, Parys JB, De Smedt H, Rong YP, Molitoris JK, Lam M, Ryder C, Matsuyama S, Distelhorst CW** (2011). Induction of Ca²⁺-driven apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells by peptide-mediated disruption of Bcl-2-IP3 receptor interaction. *Blood*. 117: 2924-34.
- Zhou Y, Mancarella S, Wang Y, Yue C, Ritchie M, Gill DL, Soboloff J** (2009). The short N-terminal domains of STIM1 and STIM2 control the activation kinetics of Orai1 channels. *J Biol Chem*. 284: 19164-8.
- Zhu G, Wang X, Yang Z, Cao H, Meng Z, Wang Y, Chen D** (2011). Effects of TRPM8 on the proliferation and angiogenesis of prostate cancer PC-3 cells in vivo. *Oncol Lett*. 2: 1213-1217.
- Zhu H, Zhang H, Jin F, Fang M, Huang M, Yang CS, Chen T, Fu L, Pan Z** (2014a). Elevated Orai1 expression mediates tumor-promoting intracellular Ca²⁺ oscillations in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 5: 3455-71.
- Zhu M, Chen L, Zhao P, Zhou H, Zhang C, Yu S, Lin Y, Yang X** (2014b). Store-operated Ca²⁺ entry regulates glioma cell migration and invasion via modulation of Pyk2 phosphorylation. *J Exp Clin Cancer Res*. 33: 98.
- Zhuang L, Peng JB, Tou L, Takanaga H, Adam RM, Hediger MA, Freeman MR** (2002). Calcium-selective ion channel, CaT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Lab Invest*. 82: 1755-64.
- Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J, Thompson CB** (2003). Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol*. 162: 59-69.
- Zweifach A, Lewis RS** (1993). Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90: 6295-9.
- Zweifach A, Lewis RS** (1995a). Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current. Store-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*. 270: 14445-51.
- Zweifach A, Lewis RS** (1995b). Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (ICRAC) due to local calcium feedback. *J Gen Physiol*. 105: 209-26.