



Universidad de Valladolid

El bloqueo de la entrada capacitativa de calcio inhibe la proliferación de células de adenocarcinoma de páncreas

AUTOR: Juan Antonio Piñeyroa Gigoso

COAUTOR: Jesús Peña López

TUTORES: Carlos Villalobos y Lucía Núñez Llorente

Trabajo Fin de Grado de Medicina

CURSO 2017-2018

AGRADECIMIENTOS

A nuestros tutores y su grupo de investigación en fisiopatología del calcio intracelular del laboratorio D4 del IBGM. En especial a Lucía G. Gutiérrez que nos ha ayudado siempre desde que comenzamos a realizar este trabajo hace ya tres años.

A la Academia de Alumnos Internos que permite a los estudiantes de medicina desarrollar actividades extracurriculares relacionadas con la práctica preclínica. Este trabajo probablemente no se hubiera desarrollado si no existiera esta asociación.

RESUMEN

La regulación de la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) participa en la fisiopatología del cáncer. Particularmente, la entrada capacitativa de calcio (SOCE), cuya vía de entrada de Ca^{2+} es la más frecuente en células no excitables, se ha relacionado con la proliferación, migración y apoptosis de diferentes estirpes tumorales.

El adenocarcinoma de páncreas, séptimo cáncer más incidente en España, presenta una mediana de supervivencia de 11 meses, debido a su quimiorresistencia y a sus bajas tasas de reseccabilidad (único tratamiento curativo). En el carcinoma de páncreas se han hallado aumentos en la expresión de ORAI1 y STIM1, canales implicados en SOCE, así mismo, la disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se relacionó con una menor migración celular y con una mayor apoptosis ante el tratamiento quimioterápico actual con 5-FU y Gemcitabina.

En el presente estudio se han realizado ensayos de proliferación con la línea celular de carcinoma de páncreas, PANC-1, usando los inhibidores selectivos de SOCE: BTP2 y 2APB. Seguidamente se ha estudiado el efecto inhibitorio de estos fármacos sobre SOCE a través de la medida de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ con imagen de fluorescencia usando la sonda Fura-2.

Los resultados demuestran que existe una inhibición significativa de la proliferación celular y de SOCE en células PANC-1 con el uso de 2APB y BTP2. Además, BTP2 actúa a menor concentración y se ha demostrado una acción dosis dependiente.

Estos experimentos demuestran la importancia de SOCE en la proliferación celular en el cáncer de páncreas, hecho que concuerda con las pruebas acumuladas en otros cánceres. Por otro lado, ahonda en la necesidad de seguir estudiando esta vía de señalización con la intención de trasladar a la práctica clínica nuevos fármacos que mejoren el pronóstico de esta neoplasia.

Palabras clave

BTP2, 2APB, SOCE, carcinoma de páncreas

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	1
INTRODUCCIÓN	4
ENTRADA CAPACITATIVA DEL CALCIO (SOCE)	4
SOCE Y CÁNCER	6
ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS	6
ADENOCARCINOMA DE PANCREAS Y SOCE	7
OBJETIVOS	7
MATERIAL Y MÉTODOS	8
LINEA CELULAR PANC-1	8
FÁRMACOS	8
PROLIFERACIÓN CELULAR	9
REGISTRO DE SOCE POR IMAGEN DE FLUORESCENCIA	9
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	11
RESULTADOS	11
2APB Y BTP2 INHIBEN LA ENTRADA CAPACITATIVA DE Ca ²⁺ EN PANC1	11
2APB Y BTP2 INHIBEN LA PROLIFERACIÓN DE PANC-1	14
DISCUSIÓN	16
CONCLUSIÓN	18
CONFLICTOS DE INTERÉS Y FINANCIACIÓN	18
BIBLIOGRAFÍA	19
ANEXOS	22
PRESENTACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO: POSTER	22
RECURSOS AUDIOVISUALES	23

INTRODUCCIÓN

ENTRADA CAPACITATIVA DEL CALCIO (SOCE)

El calcio es un ion que ejerce como segundo mensajero involucrándose en el control de diferentes procesos fisiológicos⁽¹⁾. A diferencia de otros segundos mensajeros, no se sintetiza o metaboliza en el interior de las células, sino que se regula mediante el transporte a través de canales específicos o bombas situados en la membrana plasmática o endomembranas de orgánulos como el retículo endoplasmático (RE) o la mitocondria. La concentración citoplasmática de calcio ($[Ca^{2+}]_c$) es muy baja ($10^{-7}M$) de manera que pequeños cambios en la conductancia de canales de Ca^{2+} produce rápidos cambios. Esta baja concentración se consigue gracias a la acción de bombas que, mediante el consumo de ATP, expulsan Ca^{2+} al lumen del RE (SERCA, *sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*) o al espacio extracelular (PMCA, *plasma membrane Ca²⁺-ATPase*) donde en ambos casos las concentraciones son muy superiores en el entorno mM⁽²⁾.

Existen diversas vías de entrada de Ca^{2+} al citosol, canales operados por voltaje, operados por receptor, acoplados a proteínas G, sensibles a estímulos mecánicos... pero la entrada capacitativa del calcio, ilustrada en la *figura 1*, supone la mayor vía de entrada de calcio en células no excitables. También se denomina “*store operated calcium entry*” (SOCE) porque se activa con el vaciado de los depósitos intracelulares de calcio (principalmente el RE)⁽³⁾. Este proceso puede ocurrir por la llegada de un estímulo a la célula, por ejemplo una hormona, que inicia una cascada de transducción de señales.

Recientemente se han descrito las principales proteínas implicadas en la activación de SOCE. Son las familias proteicas STIM y ORAI. STIM1 es una proteína transmembrana situada en el RE que detecta la disminución de los niveles luminales de Ca^{2+} (a través de un dominio mano EF) sufriendo un cambio de conformación que induce su oligomerización⁽⁴⁾. Los oligómeros de STIM interactúan con el canal de Ca^{2+} de la membrana plasmática ORAI1 produciendo su apertura y, por tanto, la entrada de Ca^{2+} desde el espacio

extracelular al citoplasma. Esta corriente que puede ser detectada mediante técnicas electrofisiológicas se denomina $I_{CRAC}^{(5)}$.

En condiciones normales existe un mecanismo de control de SOCE de manera que el exceso de la $[Ca^{2+}]_c$ inactiva el canal ORAI1. Sin embargo, estos incrementos locales de la $[Ca^{2+}]_c$ pueden activar el uniportador mitocondrial de Ca^{2+} (MCU) en mitocondrias próximas provocando la entrada de Ca^{2+} citosólico al interior mitocondrial y, por tanto, tamponando dicho exceso, manteniendo abierto ORAI1 durante más tiempo.

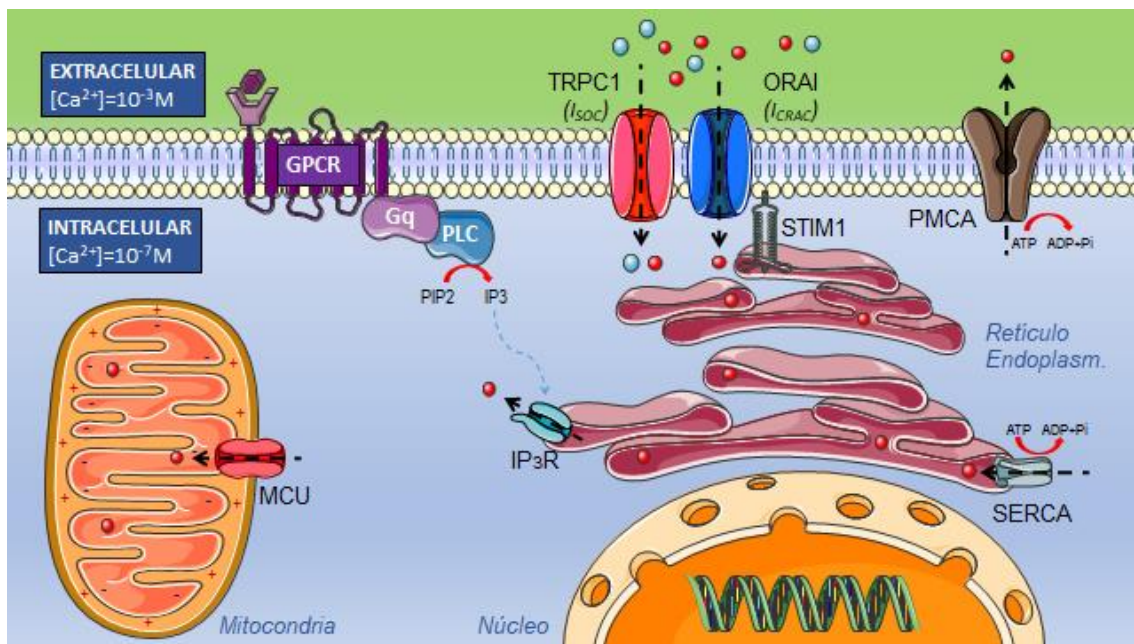


Figura 1. Entrada capacitativa de calcio (SOCE) El vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} del RE al citoplasma por activación de IP₃R genera un cambio conformacional en STIM1 que interactúa con ORAI permitiendo el paso de Ca^{2+} al citoplasma a favor de gradiente electroquímico.

Además de los canales ORAI, se ha descrito otra familia de proteínas que también forman canales en la membrana y participan, en diferentes células, en la entrada capacitativa de calcio. Son la familia de canales catiónicos denominados TRPCs. Habitualmente estos canales permiten el paso de Na^+ al interior del citoplasma. Sin embargo, también presentan paso del catión Ca^{2+} cuya corriente se la conoce como I_{SOc} . Se trata por tanto de canales inespecíficos de Ca^{2+} aún en estudio, que podrían interactuar con SOCE. La bibliografía acumulada sugiere que TRPC1 es un canal operado por depósitos en estrecha relación con ORAI1 y STIM1. De modo que la inhibición de este canal o su sobreexpresión, reduce o aumenta SOCE respectivamente.

Planteando la hipótesis de que las tres proteínas puedan conformar un complejo ternario⁽⁶⁾.

SOCE Y CÁNCER

El aumento de la $[Ca^{2+}]_c$ promueve actividades celulares como su proliferación o migración siendo este mecanismo estudiado en primer lugar en el proceso de activación de los linfocitos T.⁽⁷⁾ Este hecho hace que, cambios en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular mediados por SOCE puedan contribuir a la fisiopatología del cáncer. Ya que afectaría a parte de las características distintivas del cáncer (hallmarks of cáncer)⁽⁸⁾: Mantenimiento de la señal proliferativa, la inmortalidad replicativa, la migración, la metástasis, la inducción de la angiogénesis, la evasión de la apoptosis y de los supresores del crecimiento⁽⁹⁾. Por ejemplo, existe sobreexpresión de ORAI1 en el carcinoma microcítico de pulmón⁽¹⁰⁾, carcinoma de colon⁽¹¹⁾ y en el carcinoma escamoso esofágico⁽¹²⁾. La inhibición de ORAI1 y STIM1 reduce la proliferación y la migración del carcinoma renal⁽¹³⁾, melanoma⁽¹⁴⁾, rabdomiosarcoma⁽¹⁵⁾, adenocarcinoma de próstata⁽¹⁶⁾, carcinoma gástrico⁽¹⁷⁾, carcinoma colon, células Jurkat⁽¹⁸⁾ y la proliferación y la apoptosis de células de glioblastoma⁽¹⁹⁾.

ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS

El cáncer de páncreas es la cuarta causa de muerte por cáncer en Europa⁽²⁰⁾. Se estima una incidencia anual de 6,5 casos por cada 100.000 y la esperanza de vida a los 5 años ronda el 5%⁽²¹⁾. En España las cifras son similares siendo el séptimo cáncer en incidencia, pero el tercero en mortalidad⁽²²⁾. Los principales factores de riesgo para desarrollar cáncer de páncreas son el tabaco (RR~2) y la edad (la incidencia se incrementa a partir de los 65 años). También se ha relacionado con la obesidad, la pancreatitis crónica o la diabetes mellitus. Menos del 10% se deben a mutaciones en la línea germinal heredadas, siendo BRCA2 probablemente el gen más frecuentemente alterados en casos de cáncer pancreático familiar⁽²⁰⁾.

El adenocarcinoma ductal de páncreas constituye la neoplasia pancreática más frecuente (~80%). Se caracteriza por producir una intensa reacción estromal que se piensa, pueda actuar como barrera contra la quimioterapia⁽²⁰⁾. La clínica suele ser tardía e inespecífica. Lo más habitual es pérdida de peso, ictericia y

abdominalgia. Los tumores localizados en la cabeza del páncreas (~60%) pueden producir clínica precoz por efecto masa⁽²⁰⁾.

La resección quirúrgica es el único tratamiento curativo para esta enfermedad. Sin embargo, solo el 15-20% de los pacientes son candidatos a pancreatectomía debido a que esta enfermedad suele detectarse en estadios avanzados que contraindican la cirugía (presencia de metástasis, invasión de vasos). La alternativa en esos casos es la quimioterapia con 5-FU, Leucovorina, Oxaliplatino e Irinotecan (FOLFIRINOX) con una mediana de supervivencia global de 11 meses (frente a los 6 meses del antiguo tratamiento con Gemcitabina)⁽²⁰⁾.

Por todo ello, la comunidad médica ha puesto su foco en este proceso tumoral con la necesidad de encontrar nuevas vías de actuación quimioterápica.

ADENOCARCINOMA DE PANCREAS Y SOCE

El carcinoma de páncreas presenta las características distintivas del cáncer. Por lo que cabe preguntarse si SOCE también se encuentran aumentada en esta neoplasia y si la inhibición de esta vía, inhibe la proliferación, migración o apoptosis.

Kondratska et al. demostraron mediante técnica de western blot que la expresión de ORAI1 y STIM1 se encuentra aumentada en líneas celulares de carcinoma de páncreas, especialmente PANC-1. Y que su inhibición mediante transfección aumentaba la apoptosis de estas células al tratamiento quimioterápico con Gemcitabina y 5-FU⁽²³⁾. Por otro lado, Okeke et al, comprobaron mediante inmunofluorescencia el aumento de expresión de IP₃R y STIM1 en las células de PNAC1 en migración. Y que su migración se reducía al incubar éstas con los fármacos xestospongina-B, inhibidor competitivo de IP₃R y GSK-7975A, inhibidor de ORAI1⁽²⁴⁾. Respecto a TRPC1, se demostró su implicación en el aumento de la [Ca²⁺]_i como respuesta al factor de crecimiento TGFβ y su relación con la invasión del cáncer de páncreas.⁽²⁵⁾

Sin embargo, hasta el momento actual, nunca se ha comprobado si SOCE está implicado en la proliferación celular del adenocarcinoma de páncreas.

OBJETIVOS

Cuantificar el grado de inhibición farmacológica de SOCE por BTP2 y 2APB en células de adenocarcinoma de páncreas.

Demostrar in vitro la inhibición de la proliferación celular del adenocarcinoma de páncreas mediante la inhibición farmacológica directa de SOCE. Y verificar y calcular su dosis dependencia con el fármaco BTP2.

MATERIAL Y MÉTODOS

LINEA CELULAR PANC-1

Línea celular establecida a partir del adenocarcinoma ductal de un hombre caucásico de 56 años. Su cariotipo es hipertriploide y es ampliamente usado como modelo in vitro para el estudio de la carcinogénesis⁽²⁶⁾. PANC-1 fueron cedidas por la Dra. Maite Iglesias Badiola de la Universidad Francisco de Vitoria.

Se cultivaron en frascos de cultivo NUNC en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) con glucosa 1 g/L, suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), L-glutamina al 1%, estreptomina 100 µg/mL y penicilina 100 U/mL y se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 10%. Las células PANC-1 se subcultivaron una vez por semana lavando con PBS (phosphate buffered saline), incubando 4 min con tripsina-EDTA, centrifugando a 1200g durante 4 min y resuspendiendo en medio de proliferación. La proliferación celular fue controlada en cada subcultivo mediante conteo celular en una cámara de Neubauer al microscopio Nikon Eclipse TS100.

FÁRMACOS

2APB: Molécula 2-Aminoethoxydiphenylborane. Inhibidor inespecífico a dosis altas de SOCE. Puede actuar como antagonista de IP₃R y bloquear TRPC1 entre otros canales.⁽²⁷⁾

BTP2: Molécula N-{4-[3,5-bis(Trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]phenyl}-4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide. También llamada YM-58483. Caracterizada en linfocitos T, es un inhibidor específico de I_{CRAC} que no interactúa con las bombas de Ca²⁺, la señalización mitocondrial de Ca²⁺, la liberación de Ca²⁺ del RE ni las bombas de K⁺.^(28,29)

PROLIFERACIÓN CELULAR

Para estimar la proliferación celular, las células PANC-1 fueron sembradas en placas de 6 pocillos en medio DMEM+10%FBS en 2mL a una densidad aproximada de 14×10^4 células/pocillo. Por cada experimento se cultivaron tres replicados en ausencia (control) o presencia de los siguientes fármacos: 2APB 100 μ M y BTP-2 a 10 μ M, 5 μ M y 2.5 μ M.

Al inicio del experimento se tomó una muestra de 50 μ l de cada pocillo para su recuento con cámara de Neubauer. Las células se incubaron durante 120h en atmósfera al 10% CO₂. Transcurrido ese periodo, se levantaron de cada pocillo con tripsina-EDTA 37°C, 4 min y se contaron de nuevo con cámara de Neubauer. Para medir la proliferación se determinó la tasa de proliferación:

$$TASA DE PROLIFERACIÓN = \frac{[n^{\circ} \text{ de céls}(t = 120h) - n^{\circ} \text{ de céls}(t = 0h)]}{120h}$$

REGISTRO DE SOCE POR IMAGEN DE FLUORESCENCIA

La monitorización de la $[Ca^{2+}]_c$ a tiempo real en células vivas, se realizó por medio de imagen de fluorescencia usando la sonda fluorescente fura-2/AM. Esta molécula es un derivado del quelante de Ca^{2+} fluorescente fura-2 más un grupo penta-acetoximetil ester. Este grupo es hidrófobo, confiriendo a la molécula la capacidad de atravesar la membrana plasmática al ser incubada. En el citosol fura-2/AM es de-esterificado por enzimas liberando fura-2 ácido. Dicha molécula está cargada negativamente, por lo que no puede atravesar la membrana plasmática y salir del citosol. Fura-2 tiene alta afinidad por el Ca^{2+} y su unión aumenta la emisión de fluorescencia al ser excitado a longitudes de onda de 340 nm y disminuye al ser excitado a 380 nm como se ilustra en la *figura 2*. Por lo que se puede medir el cociente ratiométrico 340/380, que aumentará cuanto mayor sea la $[Ca^{2+}]_c^{(30)}$.

Para las medidas de SOCE, las células fueron sembradas en cubreobjetos de 12 mm de diámetro tratados con poli-L-lisina (0,01 mg/ml) a una densidad de 20×10^3 células/ml en gota y cultivadas en medio DMEN enriquecido en placas de 4 pocillos. Pasadas 24 horas, se retira el cubreobjetos del medio y se lava en medio externo completo con calcio (MEC Ca1: NaCl 145mM, KCl 5mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 1mM, glucosa 10mM, 10 HEPES/NaOH pH 7.42) y se incuban las células en MEC Ca1 con fura-2/AM 4 μ M durante 1h en oscuridad

(para evitar que se produzca el foto-apagamiento) y a temperatura ambiente. A continuación, se lava de nuevo el cubreobjetos en MEC sin calcio (MEC Ca0, elaborado a partir de MEC al que se omite el calcio y se añade EGTA 0,5M en TRIS-HCL) y se trata las células en MEC Ca0 con tapsigargina 1 μ M (Inhibidor suicida de la bomba SERCA) durante 10min, en oscuridad y a temperatura ambiente. De este modo se logra vaciar pasivamente los depósitos de Ca²⁺ del RE y activar SOCE.

A continuación, los cubreobjetos se vuelven a lavar en MEC Ca0 y se dejan incubar otros 10 min en MEC Ca0 sin (control) o con los siguientes fármacos: 2APB 100 μ M y BTP2 a 10 μ M, 5 μ M, 2.5 μ M, 0.5 μ M y 0.1 μ M.

Por último, los cubreobjetos con las células tratadas se montan en la platina termostatizada a 37°C de un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss S100TV), con un sistema de perfusión continuado (Warner Instruments, Hamden, CT) que contiene MEC Ca0 con o sin los fármacos. Por el sistema de perfusión se hace pasar MEC Ca1 a 1mM durante 1min y posteriormente se reperfunde MEC Ca0 sin fármaco durante 6 min.

Tiempo	Control	Fármaco
Incubación 10 min	MEC Ca0	MEC Ca0 + fármaco
0´ perfusión	MEC Ca0	MEC Ca0 + fármaco
1´ perfusión	MEC Ca1	MEC Ca1 + fármaco
2´ perfusión	MEC Ca0	MEC Ca0
7´ perfusión	Fin	Fin

Una lámpara de xenón (Zeiss X-Cite Series 120) ilumina las células con luces monocromáticas a 340 y 380 nm alternativamente gracias a una rueda de filtros de excitación sincronizada (Sutter Instruments, Novato, CA). Las imágenes de fluorescencia emitidas se visualizan a través de un objetivo de inmersión en aceite 40x, atraviesan un espejo dicróico que refleja luz de longitud mayor a 520 nm y un filtro de emisión a 520 nm. Para finalmente ser capturadas por una cámara Orca-ER de Hamamatsu Photonics (Hamamatsu, Japón). *Figura 2.*

Las imágenes se analizaron utilizando el software Aquacosmos 2.6 (Hamamatsu Photonics).

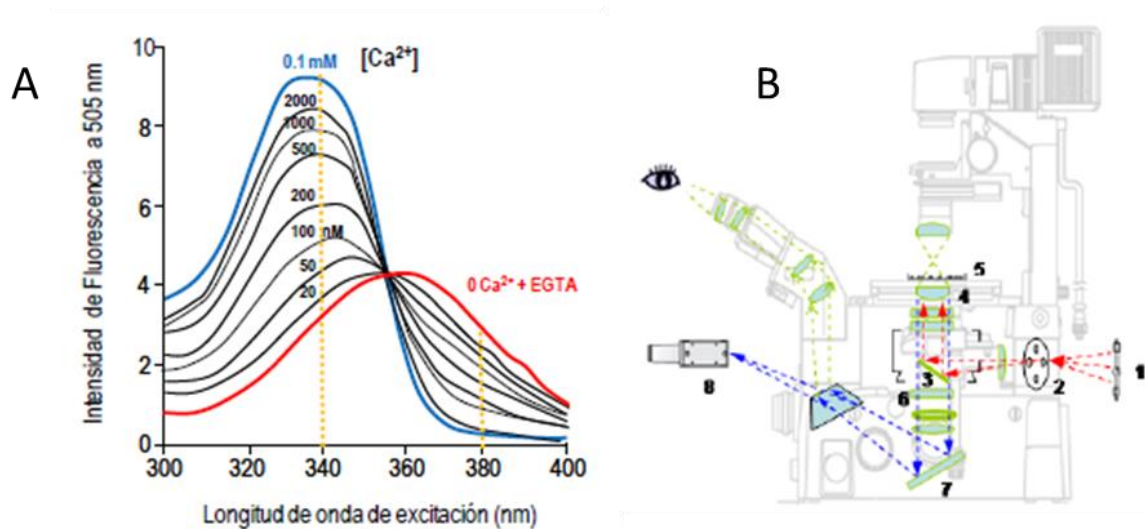


Figura 2. Imagen A; Espectro de excitación del fura-2, el aumento de Ca²⁺ produce un aumento de la fluorescencia excitada a 340nm y disminuye la excitada a 380nm. Imagen B; Representación del equipo de imagen de fluorescencia, (1) lámpara de fluorescencia, (2) rueda de filtros monocromados de excitación ($\lambda=340$ y 380 nm), (3) espejo dicroico inclinado 45°, (4) objetivo de inmersión 40x, (5) cámara termostatzada con células, (6) espejo dicroico, (7) filtro de emisión ($\lambda=520$ nm), (8) cámara Orca-ER.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico y las representaciones gráficas se han usado los programas Microsoft Excel 2016 y Origin 7. Los resultados se muestran como la media \pm error estándar de la media. Cuando se han comparado dos medias se ha utilizado la t de Student para muestras pareadas o no pareadas, según correspondiese. Para la comparación de datos incluidos en dos o más grupos se ha empleado el análisis de la varianza ANOVA de dos vías. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

2APB Y BTP2 INHIBEN LA ENTRADA CAPACITATIVA DE Ca²⁺ EN PANC-1

BTP2 es un inhibidor selectivo de la corriente I_{CRAC} que no interactúa con las bombas de Ca²⁺, la señalización mitocondrial de Ca²⁺, la liberación de Ca²⁺ del RE ni las bombas de K⁺, caracterizado en linfocitos T. ^(28,29) Por estas características está ampliamente extendido su uso en el estudio de SOCE^(15,18). Por otro lado 2APB a dosis altas es un inhibidor de SOCE menos específico que también se ha estudiado como antagonista de IP₃R y bloqueador del

TRPC1, entre otros canales⁽²⁷⁾. A pesar de estas consideraciones previas, resulta necesario demostrar esta inhibición en células de cáncer de páncreas, para lo cual se estimó la $[Ca^{2+}]_c$ mediante imagen de fluorescencia con la sonda fura-2, cuyos resultados se expresan en las gráficas de la *figura 3*.

Para activar SOCE y de este modo poder valorar el grado de inhibición con los diferentes fármacos durante los experimentos de imagen, se vaciaron los depósitos de Ca^{2+} del RE mediante el uso de tapsigargina. La incubación celular con tapsigargina inhibe de forma irreversible la bomba SERCA, de modo que las pequeñas pérdidas constantes de Ca^{2+} desde el lumen del RE al citoplasma no se reponen, vaciando los depósitos de Ca^{2+} de forma pasiva y activando por consiguiente SOCE.⁽³¹⁾ Para poder comparar estadísticamente el grado de inhibición de SOCE se realizaron experimentos en ausencia (Control) o presencia de 2APB 100 μ M y BTP2 10 μ M, 5 μ M, 2,5 μ M, 0,5 μ M y 0,1 μ M. Se midieron los picos máximos del valor del ratio F340/F380 desde la línea basal y se expresaron como porcentaje de inhibición asumiendo que los valores del control son el 100%⁽³²⁾ *figura 3, C*.

2APB inhibe claramente SOCE a dosis 100 μ M, como se expresa en la *figura 3, A*, en la que aparece un experimento representativo cuyo trazo representa la media del ratio F340/380 de 22 (control) y 29 (2APB) células. Esta inhibición es estadísticamente significativa ($p < 0,05$) como se puede observar en el gráfico de la *figura 3, C*, donde se compara la $\bar{X} \pm EEM$ del porcentaje de inhibición de tres experimentos independientes.

Además, se corrobora que el inhibidor de I_{CRAC} , BTP2, inhibe SOCE en células de carcinoma de páncreas a dosis crecientes como aparece en la *figura 3, B*, donde se muestran gráficas de experimentos representativos de cada concentración de fármaco expresados como la $\bar{X} \pm EEM$ del ratio F340/380 de entre 30 a 50 células. Esta inhibición es prácticamente del 100% a concentraciones superiores a 2,5 μ M y de entorno al 50% a 0,5 μ M, como se aprecia en la *figura 3, C*, donde se compara la $\bar{X} \pm EEM$ del porcentaje de inhibición a dosis crecientes de fármaco. Estos experimentos demuestran que los fármacos BTP2 y 2APB inhiben la entrada capacitativa de calcio en células de adenocarcinoma de páncreas.

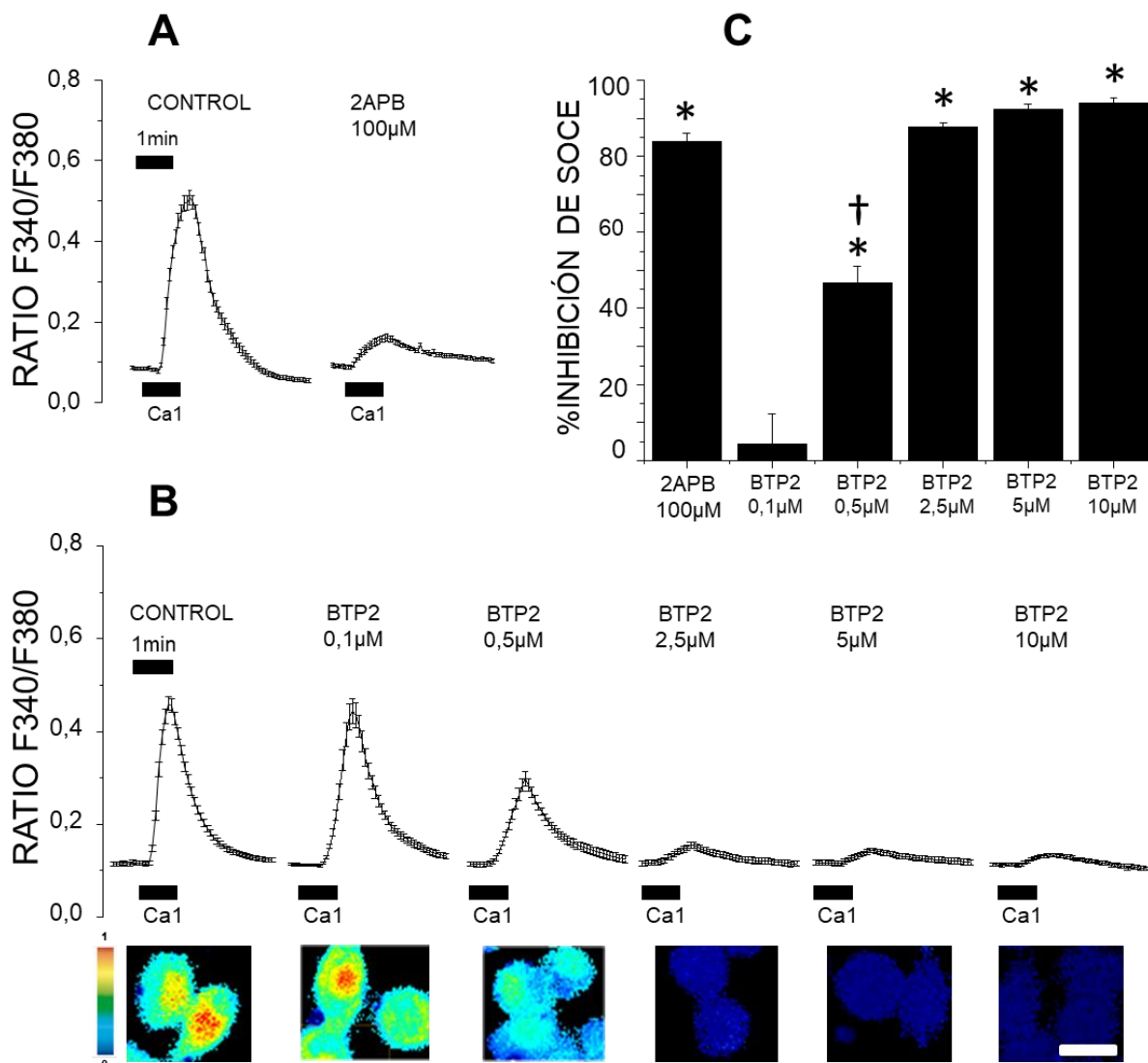


Figura 3. Efectos 2APB y BTP2 sobre SOCE de células PANC-1

Los trazos de las gráficas representan el ratio F340/F380 que es directamente proporcional a la $[Ca^{2+}]_c$ con el tiempo. Son un experimento representativo de tres. En los gráficos se especifica el minuto en el que se expone a las células a medio con Ca^{2+} . **A**, Se compara SOCE control y 100µM 2APB. El trazo expresa la $\bar{X} \pm$ EEM de $n=22$ y $n=29$ células. **B**, compara SOCE control y BTP2 a concentraciones crecientes. El trazo expresa la $\bar{X} \pm$ EEM de $n=28$, $n=18$, $n=28$, $n=24$, $n=36$, $n=43$ células respectivamente. Abajo, imágenes representativas del pico máximo de ratio F340/F380 según la concentración de BTP2. La escala de pseudocolor muestra valores del ratio de 0 a 1. La barra de calibración representa 20µm. **C**, Representa los porcentajes de inhibición en tanto por cien respecto al control, $\bar{X} \pm$ EEM ($n=3$). 2APB 100µM inhibe de forma estadísticamente significativa SOCE ($p<0,05$)*. Por otro lado BTP2 presenta una inhibición dosis dependiente de SOCE. Todas las concentraciones salvo 0,1µM muestran significación estadística respecto al control ($p<0,05$)*. Además 0,5µM lo es también para el resto de concentraciones ($p<0,05$)†. El IC_{50} calculado mediante regresión lineal es de 5,3µM.

2APB Y BTP2 INHIBEN LA PROLIFERACIÓN DE PANC-1

Para estudiar el posible efecto anti-proliferativo de los inhibidores de SOCE (BTP2 y 2APB) se cultivaron las células Panc-1 en presencia y ausencia (control) de estos fármacos durante 120h. Se trata de un modelo in vitro de tratamiento crónico. Empleamos 100 μ M de 2APB, misma concentración que habíamos usado en el experimento de calcio. Y 10 μ M, 5 μ M y 2,5 μ M de BTP2, concentraciones semejantes a las usadas en otros cánceres para inhibir su proliferación^(11,15,19). Además se pudo valorar la dosis respuesta del fármaco y calcular el IC₅₀ (Concentración de fármaco a la que se inhibe el 50% de la proliferación). Los resultados mostrados en la *figura 4* demuestran que tanto 2APB como BTP2 inhiben la proliferación de células de cáncer de páncreas. Y al igual que ocurría en los experimentos de imagen BTP2 obtiene mismas tasas de inhibición de la proliferación que 2APB pero a menor concentración.

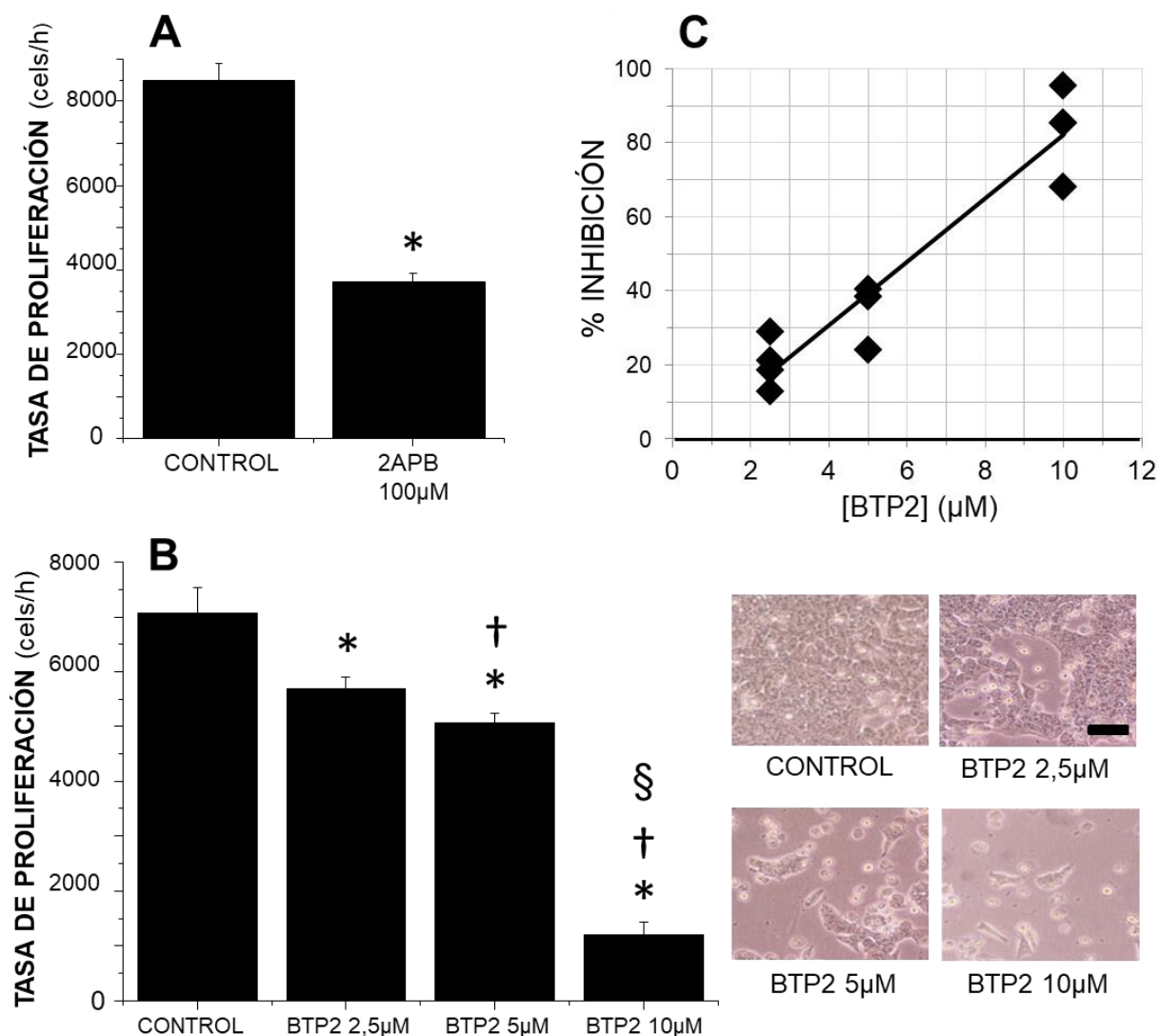


Figura 4. Efectos de BTP2 y 2APB en la proliferación de las células Panc-1.

Efectos de diferentes concentraciones de BTP2 y 2APB sobre la tasa de proliferación medida en células por hora. Las barras expresan la tasa de proliferación expresada como $\bar{X} \pm \text{EEM}$, obtenida de 4 experimentos independientes ($n=4$), salvo BTP2 5µM ($n=3$). **A**, La tasa de proliferación de 2APB 100µM fue significativamente menor respecto al control ($p<0,05$)*. **B**, La tasa de proliferación muestra diferencias significativas ($p<0,05$)* entre todas las concentraciones usadas de BTP2: 2,5µM, 5µM y 10µM frente a control. BTP2 5µM y 10µM son estadísticamente significativos ($p<0,05$)† frente 2,5µM. Y BTP2 10µM presenta diferencias significativas ($p<0,05$)§ frente a 5µM. A la derecha, imágenes representativas del efecto de BTP2, obtenidas por microscopio invertido. La barra de calibración representa 100µm. **C**, Se representa mediante regresión lineal la relación entre el tanto por cien de inhibición respecto al control (siendo el control el 100% de crecimiento) frente a la concentración de BTP2, obteniendo un IC_{50} de $6,2 \pm 1,3 \mu\text{M}$.

DISCUSIÓN

Los estudios por imagen de calcio han permitido comprobar que BTP2 y 2APB inhiben la entrada capacitativa de calcio en las células de carcinoma de páncreas PANC-1. BTP2 inhibe esta entrada de Ca^{2+} de igual manera pero a una concentración hasta 40 veces menor que 2APB. Esto podría explicarse porque BTP2 actúa más específicamente sobre ORAI y STIM1, inhibiendo $I_{\text{CRAC}}^{(28)}$, mientras que 2APB se cree que actúa bloqueando TRPC1 u otros canales de menor especificidad⁽²⁷⁾. También se comprueba que a concentraciones superiores a $2,5\mu\text{M}$, BTP2 inhibe SOCE totalmente, hecho que concuerda con el único experimento encontrado en la literatura en el que se ha estudiado la inhibición con BTP2 de SOCE en carcinoma de páncreas⁽²³⁾. Sin embargo, a diferencia del estudio citado, en nuestro trabajo se ha demostrado la dosis dependencia de esta inhibición, al usarse concentraciones menores de este fármaco, estimándose que la concentración de BTP2 a la que se inhibe el 50% de la entrada capacitativa de calcio corresponde a $C_{50} = 5,3\mu\text{M}$.

Al igual que se ha evidenciado en estudios de proliferación en otros tipos de cánceres^(13-15,18,19,33,34), la reducción de SOCE provoca una menor tasa de proliferación en el adenocarcinoma de páncreas. En nuestro trabajo, BTP2 inhibe esta proliferación igual que 2APB pero a concentraciones 15 veces menores. Además se comprobó que la inhibición de la proliferación celular es dosis dependiente para BTP2 al igual que lo es respecto a SOCE, hallazgo que refuerza la idea sobre que esta vía de Ca^{2+} es clave en la proliferación celular del cáncer de páncreas. Calculando su IC_{50} en $6,2 \pm 1,3\mu\text{M}$. Sin embargo, debemos destacar también que 2APB $100\mu\text{M}$ inhibe SOCE en un $85,6 \pm 2,6\%$ ($\text{IC}_{95\%}$) mientras que a la misma concentración inhibe la proliferación celular solo en $56,2 \pm 4,9\%$ ($\text{IC}_{95\%}$). Por otro lado $5\mu\text{M}$ BTP2 inhibe SOCE en un $92,4 \pm 2,9\%$ ($\text{IC}_{95\%}$) pero a igual concentración inhibe la tasa de proliferación celular solamente en $34,2 \pm 5,9\%$ ($\text{IC}_{95\%}$). La explicación a por qué se inhibe más SOCE que su proliferación en las células PANC-1 nos induce a pensar que aunque esta vía de señalización es clave en la proliferación celular de este cáncer, no es la única vía. Y por tanto hay que seguir investigando. También se podría explicar por las posibles diferencias a nivel agudo (SOCE) y crónico (proliferación) del tratamiento con el fármaco.

Otros autores han utilizado xestospongina-B y GSK-7975A como bloqueadores de SOCE en el estudio de la migración de células de cáncer de páncreas⁽²⁴⁾. En nuestro trabajo hemos usado 2APB y BTP2 por varios motivos. En primer lugar, xestospongina-B es un inhibidor competitivo de IP₃R, en principio selectivo⁽³⁵⁾. El receptor IP₃R se encuentra en el RE y se activa al unirse al inositoltrifosfato. Esta unión vacía los depósitos de calcio del RE activando SOCE. *Figura 1*. Sin embargo, en los experimentos de imagen que usan taspigargina, como el del presente trabajo, no puede apreciarse esta inhibición de SOCE, ya que los depósitos de Ca²⁺ están ya deplecionados por acción de la inhibición de la bomba SERCA con taspigargina. En sustitución, se prefirió usar 2APB que inhibe este receptor pero también actúa sobre TRPC1⁽²⁷⁾, el cual sí es valorable por medio de experimentos con taspigargina. Por otro lado GSK-7975A, considerado un inhibidor selectivo de la corriente I_{CRAC} por el bloqueo de ORAI1⁽³⁶⁾, es un fármaco con el que no se tiene mucha experiencia de uso y aunque también se ha utilizado en el estudio de células acinares de páncreas⁽³⁷⁾, se prefirió usar BTP2, también inhibidor selectivo de I_{CRAC} y ampliamente testado en SOCE, cáncer y proliferación.

El carcinoma de páncreas tiene uno de los más funestos pronósticos al diagnóstico. Este hecho se relaciona con las bajas tasas de resecabilidad y la falta de respuesta efectiva al tratamiento quimioterápico. Nuestro trabajo relaciona SOCE con la proliferación celular del tumor. Este hecho sumado a la creciente bibliografía hasta el momento actual en el que se ha relacionado SOCE con la resistencia al tratamiento quimioterápico⁽²³⁾ y con la invasión^(24,25) plantea importantes cuestiones a estudio. La profundización en el conocimiento de esta vía podría dilucidar cuestiones sobre la fisiopatología del cáncer de páncreas, convirtiéndose en una posible nueva diana terapéutica. El uso de los inhibidores de SOCE, BTP2 y 2APB2 podría plantearse en un futuro como posibles tratamientos quimioterápicos. De hecho un estudio en ratones ha demostrado que BTP2 podía administrarse de forma sistémica hasta concentraciones 30mg/kg sin cambios aparentes en su estado de salud⁽³⁸⁾.

En cualquier caso resulta imprescindible realizar más estudios en esta línea con la intención de trasladar a la práctica clínica nuevas terapias que mejoren el pronóstico de esta neoplasia.

CONCLUSIÓN

2APB y BTP2 inhiben la entrada capacitativa de calcio en el adenocarcinoma de páncreas.

La reducción de la entrada capacitativa de calcio, mediante el uso de 2APB y BTP2 inhibe la proliferación celular de adenocarcinoma de páncreas.

CONFLICTOS DE INTERÉS Y FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido financiado con el proyecto BFU2015-70131R del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO).

Los autores del presente trabajo han recibido una Beca de Colaboración 2017-2018 en departamentos universitarios del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

BIBLIOGRAFÍA

1. Petersen OH, Michalak M, Verkhratsky A. Calcium signalling: past, present and future. *Cell Calcium*. octubre de 2005;38(3-4):161-9.
2. de la Fuente S, Fonteriz RI, Montero M, Alvarez J. Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum measured with a new low-Ca²⁺-affinity targeted aequorin. *Cell Calcium*. julio de 2013;54(1):37-45.
3. Parekh AB, Putney JW. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*. abril de 2005;85(2):757-810.
4. Soboloff J, Rothberg BS, Madesh M, Gill DL. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 23 de agosto de 2012;13(9):549-65.
5. Villalobos C, Sobradillo D, Hernández-Morales M, Núñez L. Calcium remodeling in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1864(6):843-9.
6. Chen KT, Ong HL, Liu X, Ambudkar IS. Contribution of TRPC1 and Orai1 to Ca²⁺ entry activated by store depletion. *Adv Exp Med Biol [Internet]*. 2011 [citado 15 de mayo de 2018];704. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3824974/>
7. Lewis RS. Calcium Signaling Mechanisms in T Lymphocytes. *Annual Review of Immunology*. 2001;19(1):497-521.
8. Fiorio Pla A, Kondratska K, Prevarskaya N. STIM and ORAI proteins: crucial roles in hallmarks of cancer. *Am J Physiol, Cell Physiol*. 1 de abril de 2016;310(7):C509-519.
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 4 de marzo de 2011;144(5):646-74.
10. Zhan Z-Y, Zhong L-X, Feng M, Wang J-F, Liu D-B, Xiong J-P. Over-expression of Orai1 mediates cell proliferation and associates with poor prognosis in human non-small cell lung carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(5):5080-8.
11. Hernández-Morales M, Sobradillo D, Valero RA, Muñoz E, Ubierna D, Moyer MP, et al. Mitochondria sustain store-operated currents in colon cancer cells but not in normal colonic cells: reversal by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Oncotarget*. 15 de agosto de 2017;8(33):55332-52.
12. Zhu H, Zhang H, Jin F, Fang M, Huang M, Yang CS, et al. Elevated Orai1 expression mediates tumor-promoting intracellular Ca²⁺ oscillations in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 17 de abril de 2014;5(11):3455-71.
13. Kim J-H, Lkhagvadorj S, Lee M-R, Hwang K-H, Chung HC, Jung JH, et al. Orai1 and STIM1 are critical for cell migration and proliferation of clear cell renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 23 de mayo de 2014;448(1):76-82.

14. Umemura M, Baljinnyam E, Feske S, De Lorenzo MS, Xie L-H, Feng X, et al. Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) regulates melanoma proliferation and cell migration. *PLoS ONE*. 2014;9(2):e89292.
15. Schmid E, Stagno MJ, Yan J, Stournaras C, Lang F, Fuchs J, et al. Store-operated Ca²⁺ entry in rhabdomyosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 12 de 2016;477(1):129-36.
16. Zhou Y, Gu P, Li J, Li F, Zhu J, Gao P, et al. Suppression of STIM1 inhibits the migration and invasion of human prostate cancer cells and is associated with PI3K/Akt signaling inactivation. *Oncol Rep*. noviembre de 2017;38(5):2629-36.
17. Xia J, Wang H, Huang H, Sun L, Dong S, Huang N, et al. Elevated Orai1 and STIM1 expressions upregulate MACC1 expression to promote tumor cell proliferation, metabolism, migration, and invasion in human gastric cancer. *Cancer Letters*. 10 de octubre de 2016;381(1):31-40.
18. Núñez L, Valero RA, Senovilla L, Sanz-Blasco S, García-Sancho J, Villalobos C. Cell proliferation depends on mitochondrial Ca²⁺ uptake: inhibition by salicylate. *J Physiol (Lond)*. 15 de febrero de 2006;571(Pt 1):57-73.
19. Liu H, Hughes JD, Rollins S, Chen B, Perkins E. Calcium entry via ORAI1 regulates glioblastoma cell proliferation and apoptosis. *Exp Mol Pathol*. diciembre de 2011;91(3):753-60.
20. Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C, Hollebecque A, Burtin P, Goéré D, et al. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 1 de septiembre de 2015;26(suppl_5):v56-68.
21. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 28 de noviembre de 2016;22(44):9694-705.
22. *Las_Cifras_del_cancer_en_Espana2018.pdf* [Internet]. [citado 22 de abril de 2018]. Disponible en: https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las_Cifras_del_cancer_en_Espana2018.pdf
23. Kondratska K, Kondratskyi A, Yassine M, Lemonnier L, Lepage G, Morabito A, et al. Orai1 and STIM1 mediate SOCE and contribute to apoptotic resistance of pancreatic adenocarcinoma. *Biochim Biophys Acta*. octubre de 2014;1843(10):2263-9.
24. Okeke E, Parker T, Dingsdale H, Concannon M, Awais M, Voronina S, et al. Epithelial-mesenchymal transition, IP3 receptors and ER-PM junctions: translocation of Ca²⁺ signalling complexes and regulation of migration. *Biochem J*. 15 de marzo de 2016;473(6):757-67.
25. Dong H, Shim K-N, Li JMJ, Estrema C, Ornelas TA, Nguyen F, et al. Molecular mechanisms underlying Ca²⁺-mediated motility of human pancreatic duct cells. *Am J Physiol, Cell Physiol*. diciembre de 2010;299(6):C1493-1503.
26. Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer*. 15 de mayo de 1975;15(5):741-7.

27. Hofer A, Kovacs G, Zappatini A, Leuenberger M, Hediger MA, Lochner M. Design, synthesis and pharmacological characterization of analogs of 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB), a known store-operated calcium channel blocker, for inhibition of TRPV6-mediated calcium transport. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 1 de junio de 2013;21(11):3202-13.
28. Zitt C, Strauss B, Schwarz EC, Spaeth N, Rast G, Hatzelmann A, et al. Potent inhibition of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels and T-lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2. *J Biol Chem*. 26 de marzo de 2004;279(13):12427-37.
29. Steinckwich N, Fripiat J-P, Stasia M-J, Erard M, Boxio R, Tankosic C, et al. Potent inhibition of store-operated Ca²⁺ influx and superoxide production in HL60 cells and polymorphonuclear neutrophils by the pyrazole derivative BTP2. *J Leukoc Biol*. abril de 2007;81(4):1054-64.
30. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 25 de marzo de 1985;260(6):3440-50.
31. Michelangeli F, East JM. A diversity of SERCA Ca²⁺ pump inhibitors. *Biochem Soc Trans*. junio de 2011;39(3):789-97.
32. Bird GS, DeHaven WI, Smyth JT, Putney JW. Methods for studying store-operated calcium entry. *Methods*. 1 de noviembre de 2008;46(3):204-12.
33. Courjaret R, Machaca K. STIM and Orai in cellular proliferation and division. *Front Biosci (Elite Ed)*. 1 de enero de 2012;4:331-41.
34. Hou M-F, Kuo H-C, Li J-H, Wang Y-S, Chang C-C, Chen K-C, et al. 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*. diciembre de 2011;1810(12):1278-84.
35. Jaimovich E, Mattei C, Liberona JL, Cardenas C, Estrada M, Barbier J, et al. Xestospongine B, a competitive inhibitor of IP₃-mediated Ca²⁺ signalling in cultured rat myotubes, isolated myonuclei, and neuroblastoma (NG108-15) cells. *FEBS Lett*. 11 de abril de 2005;579(10):2051-7.
36. Derler I, Schindl R, Fritsch R, Heftberger P, Riedl MC, Begg M, et al. The action of selective CRAC channel blockers is affected by the Orai pore geometry. *Cell Calcium*. febrero de 2013;53(2):139-51.
37. Wen L, Voronina S, Javed MA, Awais M, Szatmary P, Latawiec D, et al. Inhibitors of ORAI1 Prevent Cytosolic Calcium-Associated Injury of Human Pancreatic Acinar Cells and Acute Pancreatitis in 3 Mouse Models. *Gastroenterology*. agosto de 2015;149(2):481-492.e7.
38. Ohga K, Takezawa R, Arakida Y, Shimizu Y, Ishikawa J. Characterization of YM-58483/BTP2, a novel store-operated Ca²⁺ entry blocker, on T cell-mediated immune responses in vivo. *Int Immunopharmacol*. 20 de diciembre de 2008;8(13-14):1787-92.

ANEXOS

PRESENTACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO: POSTER

ENTRADA CAPACITATIVA DE CALCIO Y PROLIFERACIÓN CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS: CONTROL MITOCONDRIAL Y MODULACIÓN FARMACOLÓGICA

Jesús Peña López, Juan Antonio Piñeyroa Gigoso, Lucía Núñez Llorente, Carlos Villalobos

Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) y Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid y CSIC



INTRODUCCIÓN

La regulación de la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) participa en la fisiopatología del cáncer. En especial, la entrada capacitativa de calcio (SOCE, Figura 1) se ha relacionado con la proliferación celular de distintas estirpes tumorales.

El adenocarcinoma de páncreas presenta un pronóstico muy malo por su quimiorresistencia y su baja tasa de reseccabilidad (única terapia curativa). En el cáncer de páncreas, al igual que en otros cánceres, estudios epidemiológicos correlacionan una menor tasa de incidencia con el consumo de AAS y otros AINEs. Esta acción no puede ser explicada únicamente por su efecto antiinflamatorio. Se ha propuesto que estos fármacos podrían inhibir SOCE ya que actúan como desacoplantes mitocondriales impidiendo la capacidad de la mitocondria de aclarar los incrementos de calcio. Además, existen fármacos que actúan bloqueando directamente el canal implicado en SOCE. En este trabajo se ha estudiado la relación entre la entrada capacitativa de calcio (SOCE) y la proliferación de células de adenocarcinoma de páncreas, PANC-1.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se cultivaron células de adenocarcinoma de páncreas humano PANC-1 y se estudiaron los efectos de diversos fármacos sobre la proliferación celular y la entrada capacitativa de calcio. La tasa de proliferación se obtuvo mediante conteo celular en cámara de Neubauer. Para estimar SOCE se monitorizó la $[Ca^{2+}]_i$ a tiempo real mediante imagen de fluorescencia usando la sonda de calcio fura-2/AM y el inhibidor de la bomba SERCA, taspargina.

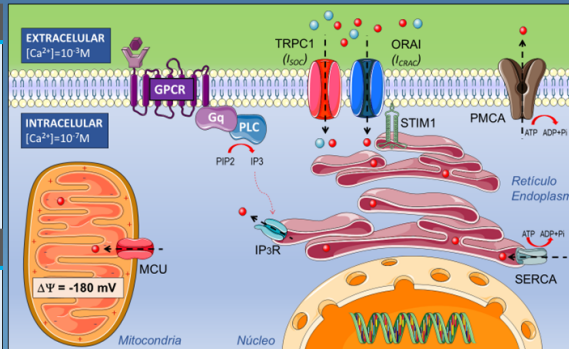


Figura 1. SOCE, Entrada capacitativa de calcio

El vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} del retículo endoplásmico genera un cambio conformacional en STIM1 que favorece su interacción con el canal ORAI. La activación del canal ORAI permite el paso de Ca^{2+} al citoplasma a favor de gradiente electroquímico. En condiciones normales el exceso de la $[Ca^{2+}]_i$ inactiva el canal ORAI. Sin embargo, estos incrementos locales de la $[Ca^{2+}]_i$ pueden activar el uniportador mitocondrial de Ca^{2+} (MCU) provocando la entrada de calcio a la mitocondria y, por tanto, taponando dicho exceso y manteniendo abierto ORAI.

RESULTADOS

2APB Y BTP2 INHIBEN LA ENTRADA CAPACITATIVA DE CALCIO (SOCE)

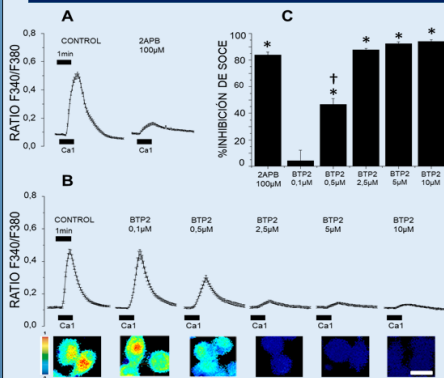


Figura 2. Efectos 2APB y BTP2 sobre SOCE de células PANC-1

Los trazos de las gráficas representan el ratio F340/F380 que es directamente proporcional a la $[Ca^{2+}]_i$ con el tiempo. Son un experimento representativo de tres, expresado como $\bar{x} \pm EEM$ (n=18-43 células). A. Se compara SOCE control y 100 μM 2APB. B. Compara SOCE control y BTP2 a concentraciones crecientes. Abajo, imágenes representativas del pico máximo de ratio F340/F380. La escala de pseudocolor muestra valores del ratio de 0 a 1. La barra de calibración representa 20 μm . C. Representa los porcentajes de inhibición en tanto por cien respecto al control, $\bar{x} \pm EEM$ (n=3). * (p<0,05) vs Control. † (p<0,05) BTP2 0,5 μM vs [BTP2] superiores.

FCCP, SALICILATO Y SULINDAC INHIBEN LA PROLIFERACIÓN CELULAR

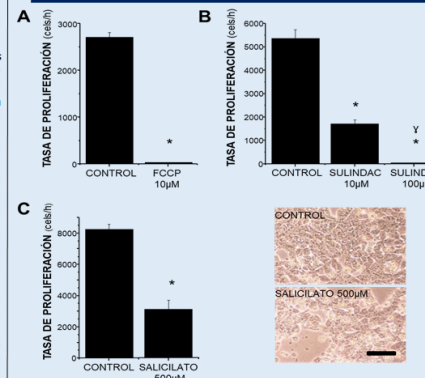


Figura 4. Efectos del FCCP, el sulindac y el salicilato en la proliferación celular de PANC-1

Tasa de proliferación medida en células por hora y expresada como $\bar{x} \pm EEM$ (n=3). A. FCCP 10 μM . B. Salicilato 500 μM . Se acompaña de imágenes obtenidas por microscopio invertido (barra de calibración representa 100 μm). C. Sulindac 10 y 100 μM . * (p<0,05) vs Control, † (p<0,05) sulindac 10 μM vs sulindac 100 μM .

2APB Y BTP2 INHIBEN LA PROLIFERACIÓN CELULAR

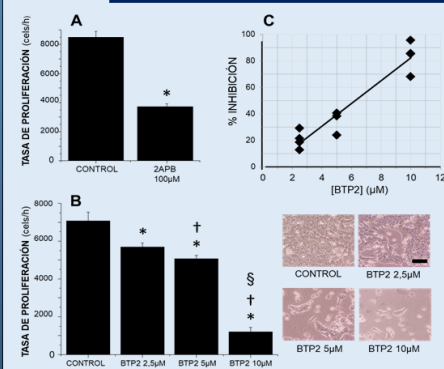


Figura 3. Efectos de BTP2 y 2APB en la proliferación celular de PANC-1

Tasa de proliferación medida en células por hora. Expresada como $\bar{x} \pm EEM$ (n=4). A. 2APB 100 μM . * (p<0,05) vs Control. B. BTP2 2,5 μM , 5 μM y 10 μM . * (p<0,05) vs Control. † (p<0,05) vs BTP2 2,5 μM . § (p<0,05) vs BTP2 5 μM . Se acompaña de imágenes obtenidas por microscopio invertido (barra de calibración representa 100 μm). C. Se representa mediante regresión lineal la relación entre el porcentaje de inhibición respecto al control frente a la concentración de BTP2, obteniendo un $IC_{50} = 6,2 \pm 1,3 \mu M$.

FCCP, SALICILATO Y SULINDAC INHIBEN SOCE

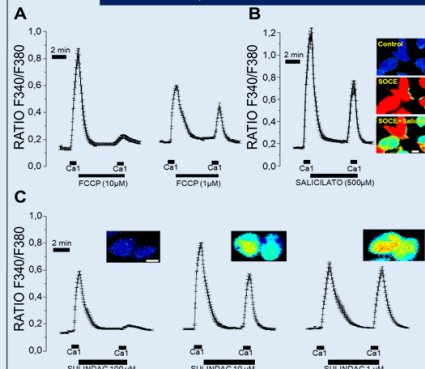


Figura 5. Efectos FCCP, salicilato y sulindac sobre SOCE de células PANC-1

Cada trazo expresa el ratio F340/F380 lo que es directamente proporcional con la $[Ca^{2+}]_i$ en el tiempo. Se refleja en cada caso un experimento representativo (n=3) y se representa como el promedio ($\bar{x} \pm EEM$) de 20-40 células. A. FCCP 1 y 10 μM . B. Salicilato 500 μM . Se acompaña de tres imágenes de pseudocolor. C. Sulindac 1, 10 y 100 μM . Se acompaña de tres imágenes de pseudocolor que representan SOCE a la concentración de sulindac correspondiente. Las imágenes se acompañan de escala de pseudocolor (valores de ratio 0 a 1) y barra blanca de calibración (representa 10 μm).

CONCLUSIONES

- El bloqueo de la entrada capacitativa de calcio por BTP2 y 2APB inhibe la proliferación celular de adenocarcinoma de páncreas.
- La despolarización mitocondrial inducida por aspirina y otros AINEs inactiva la entrada capacitativa de calcio e inhibe la proliferación de células de adenocarcinoma de páncreas.

BIBLIOGRAFÍA

- Villalobos C, Sobradillo D, Hernández-Morales M, Núñez L. Calcium remodeling in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1864(6):843-9.
- Hernández-Morales M, Sobradillo D, Valero RA, Muñoz E, et al. Mitochondria sustain store-operated currents in colon cancer cells but not in normal colonic cells: reversal by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Oncotarget*. 21 de julio de 2017;8(3):5532-52.
- Valero RA, Senovilla L, Núñez L, Villalobos C. The role of mitochondrial potential in control of calcium signals involved in cell proliferation. *Cell Calcium*. 1 de septiembre de 2008;44(3):259-69.



RECURSOS AUDIOVISUALES

La *figura 6* consiste en un código QR que permite al lector acceder a contenido multimedia complementario.



Figura 6. Código QR de acceso a material audiovisual

Permite el acceso a la visualización de contenido multimedia en la plataforma Youtube, con material inédito relativo al presente trabajo.

URL: <https://www.youtube.com/channel/UCYeFjINrCuscVPID8MDqw3Q/videos>