



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM-CSIC)

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología

Estudio de la Señal del Calcio en Tumores Cerebrales Humanos

Memoria de trabajo de investigación para optar al Título de Máster en
Investigación Biomédica presentada por:

M^a Elena Hernando Pérez

Directores

Dra. Lucía Núñez Llorente

Dr. Carlos Villalobos Jorge

Valladolid, julio 2018

ÍNDICE

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | ABREVIATURAS..... | I |
| 2 | RESUMEN | II |
| 3 | INTRODUCCIÓN | 1 |
| 3.1 | Homeostasis del Ca^{2+} Intracelular | 1 |
| 3.1.1 | Mecanismos de Regulación de la Homeostasis del Ca^{2+} Intracelular..... | 2 |
| 3.1.2 | Canales de Ca^{2+} Operados por Segundos Mensajeros (SMOCCs) | 2 |
| 3.1.3 | Canales de Ca^{2+} Operados por depósitos (SOCCs) | 2 |
| 3.1.4 | Sistemas de Extrusión de Ca^{2+} de la Membrana Plasmática. | 4 |
| 3.1.5 | Homeostasis del Ca^{2+} Intracelular en el Retículo Endoplasmático..... | 4 |
| 3.1.6 | Homeostasis del Ca^{2+} Intracelular en la Mitocondria..... | 4 |
| 3.2 | Aspectos Generales de los Tumores del Sistema Nervioso Central..... | 4 |
| 3.2.1 | Tumores Cerebrales Primarios | 5 |
| 3.2.2 | Metástasis Cerebrales | 6 |
| 3.3 | Papel del Ca^{2+} en el Cáncer..... | 6 |
| 3.4 | Hipótesis, Objetivo Principal y Objetivos Específicos..... | 7 |
| 4 | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 8 |
| 4.1 | BUFFERS Y SOLUCIONES..... | 8 |
| 4.2 | MÉTODOS EXPERIMENTALES | 9 |
| 4.2.1 | Cultivo Primario de Células Tumorales | 9 |
| 4.2.2 | Inmunocitoquímica | 10 |
| 4.2.3 | Medida de la Concentración de Calcio Citosólico mediante Imagen de Fluorescencia..... | 10 |
| 4.3 | Análisis de Datos | 11 |
| 5 | RESULTADOS | 13 |
| 5.1 | Cultivos primarios de tumores cerebrales | 13 |
| 5.2 | Caracterización Funcional de Cultivos Primarios de Tumores Cerebrales | 14 |
| 5.3 | Comparación de la Entrada Capacitativa de Ca^{2+} en Tumores Cerebrales | 24 |
| 6 | DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS | 25 |
| 7 | CONCLUSIONES | 26 |
| 8 | AGRADECIMIENTOS..... | 27 |
| 9 | BIBLIOGRAFÍA..... | 27 |

1 ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_{cit}, Concentración de Calcio libre Citosólica
Ach, Acetilcolina
BSA, Albúmina de Suero Bovina
DIV, Días *In vitro*
DMEM, Medio de Eagle modificado por Dulbecco
FBS, Suero Bovino Fetal
GFAP, Proteína Fibrilar Ácida de la Glía
GMPc, Guanosiín Monofosfato Cíclico
GPCRs, Receptores Acoplados a Proteínas G
HBSS, Solución salina balanceada de Hank
IC, Inmunocitoquímica
IP₃, Inositol 1,4,5-trifosfato
IP₃R, Receptor de Inositol-trifosfato
MEC, Medio Estándar Externo
NCX, Intercambiador Na⁺/Ca²⁺
NMDA, N-Metil-D-Aspartato
OMS Organización Mundial de la Salud
P2X₇, Receptor Purinérgico 7
PBS, Solución tamponada de Fosfato
PDGF, Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PFA, Paraformaldehído
PKC Proteína quinasa C
PLC, Fosfolipasa C
RE, Retículo Endoplasmático
ROCCs, Canales de Ca²⁺ Operados por Receptor
RyR, Receptor de Rianodina
Se, Desviación Estándar
SERCA, Bomba de Ca²⁺ del Retículo Endoplasmático
SMOCCs. Canales de Ca²⁺ Operados por Segundos Mensajeros
SNC, Sistema Nervioso Central
SOCE, Entrada de Ca²⁺ Operada por Depósitos
Shocks, Canales de Ca²⁺ Operados por Depósitos
STIM, Molécula de Interacción del Estroma
Tg, Tapsigargina
TKR, Receptor tirosina quinasa
TRP, Canales tipo Potencial de Receptor Transitorio.
VOCCs, Canales de Ca²⁺ Operados por Voltaje.

2 RESUMEN

El cáncer ha sido recientemente relacionado con la dishomeostasis o remodelado del Ca^{2+} intracelular. El fenotipo tumoral se caracteriza por el aumento descontrolado de la proliferación y de la migración celulares, y la resistencia a la muerte celular, procesos en los cuales participa directamente el Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, muchos de los estudios se han llevado a cabo en líneas celulares, no habiendo prácticamente datos en tumores primarios y/o metástasis cerebrales. En el presente estudio se ha desarrollado un protocolo original para el cultivo primarios de muestras frescas de tumores cerebrales extraídos en la unidad de neurocirugía del Hospital Universitario del Río Hortega (HURH) para el análisis de la señal de Ca^{2+} en tumores cerebrales. Se han recibido 22 muestras que fueron congeladas inmediatamente. En 14 de las muestras recibidas incluyendo 4 meningiomas, 2 oligodendrogliomas, 2 astrocitomas, 2 glioblastomas y 4 metástasis (dos pulmonares, 1 adenopapilar y otra ductal de mama) se ha podido establecer cultivos primarios de células tumorales. Las células se sembraron sobre cubreobjetos estériles para monitorizar el Ca^{2+} intracelular a nivel de célula única mediante imagen de fluorescencia y el estudio de la expresión de marcadores por inmunofluorescencia. Los experimentos de imagen se llevaron a cabo el mismo día de la obtención de la muestra (0 días in vitro, 0 DIV), el día siguiente (1 DIV) o tras su cultivo a largo plazo. Se ha estudiado la magnitud de la entrada capacitativa de Ca^{2+} y las respuestas a diferentes estímulos incluyendo la despolarización con alto potasio (K^+) que activa canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, glutamato y ATP. En algunos casos se estudiaron también los efectos de agonistas específicos como NMDA, kainato o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Los resultados muestran que las células de tumores de origen glial (oligodendrogliomas, astrocitomas y glioblastomas) expresan GFAP mientras que las células de metástasis cerebrales no lo expresan. Respecto a las respuestas funcionales, encontramos que los oligodendrogliomas responden a despolarización con alto K^+ , kainato y PDGF. Los glioblastomas responden a NMDA, pero no a K^+ , ATP o glutamato. En contraste, los meningiomas y astrocitomas responden a ATP, pero no a K^+ o glutamato. Finalmente, los datos sugieren una correlación negativa entre la malignidad del tumor y la entrada capacitativa de Ca^{2+} . Las metástasis pulmonares y adeno papilar muestran déficit de SOCE y responden, casi exclusivamente, a ATP. Estos resultados siembran las bases para una caracterización del remodelado del Ca^{2+} intracelular en tumores cerebrales y podrían contribuir al mejor diagnóstico, pronóstico y tratamiento de estos tumores.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 Homeostasis del Ca^{2+} Intracelular

La señalización por Ca^{2+} es un proceso universal y versátil. El Ca^{2+} participa en la regulación de un amplio abanico de funciones celulares, desde el control de la contracción del músculo cardíaco hasta la regulación de puntos clave del ciclo celular y los procesos de proliferación y muerte celular (Clapham, 1995) (Berridge, 2003).

La versatilidad del Ca^{2+} como segundo mensajero se debe, principalmente, a la existencia de numerosos enzimas regulados directa o indirectamente por Ca^{2+} y/o la proteína calmodulina. Dada su naturaleza química, el Ca^{2+} , al contrario que otros segundos mensajeros, no se crea ni se destruye, sino que se transporta. La concentración de Ca^{2+} es cuatro órdenes de magnitud mayor en el espacio extracelular respecto del intracelular. Esto, junto con el gradiente eléctrico, favorece la entrada de Ca^{2+} a la célula. Debido a su pequeñísima concentración intracelular, pequeños cambios en los flujos de Ca^{2+} originan cambios en la concentración del ión ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$) que acaban controlando numerosos procesos celulares. Para mantener una adecuada homeostasis o equilibrio del Ca^{2+} existen distintos sistemas de transporte desde canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática y de orgánulos subcelulares, los cuales permiten el flujo de Ca^{2+} hacia el citosol a favor de gradiente, hasta proteínas que unen y tamponan los cambios de Ca^{2+} intracelular; también están los sistemas de extrusión de Ca^{2+} , que transportan el ión fuera del citosol en contra de gradiente electroquímico (Figura 1) (Berridge, 2003) (Rizzuto, 2006).

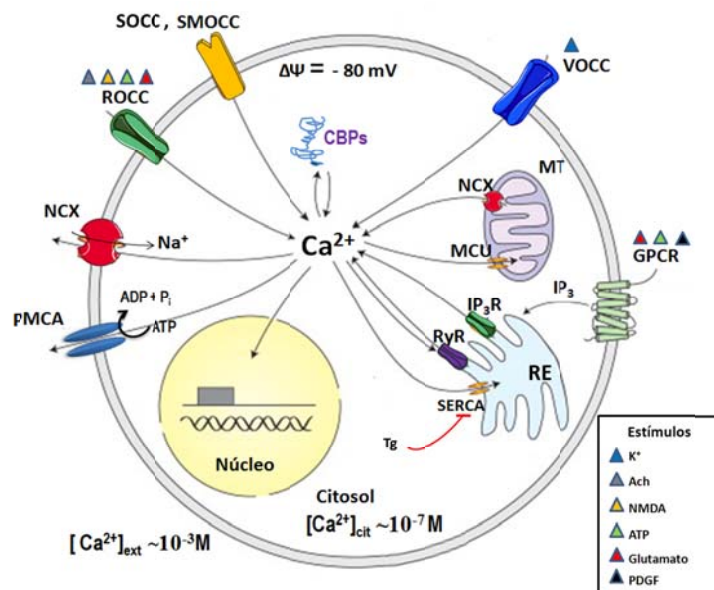


Figura 1. Homeostasis del Ca^{2+} intracelular. En la imagen se representan diferentes fuentes de Ca^{2+} , mecanismos de extrusión y tamponadores en una célula en condiciones fisiológicas. Se representan los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCCs), canales de Ca^{2+} operados por receptor (ROCCs), receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y canales de Ca^{2+} operados por depósitos (SOCCs) y canales operados por segundos mensajeros (SMOCCs) que participan en la entrada de Ca^{2+} en el citosol. La liberación de Ca^{2+} al citosol también tiene lugar desde los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , a través de los Receptores de Rianodina (RyR) y los Receptores de Inositol-trifosfato (IP_3R). También se muestran los sistemas de extrusión de Ca^{2+} , entre los que se incluyen el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) y las ATPasas de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) y del Retículo Endoplasmático (SERCA). El uniprotador de calcio mitocondrial (MCU), y el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (NCXm) que también contribuyen a la regulación del Ca^{2+} . Los estímulos que activan los diferentes canales se representan como triángulos sobre dichos canales, tal y como se indica en la leyenda. Modificado de Grienberger (Grienberger, 2012).

3.1.1 Mecanismos de Regulación de la Homeostasis del Ca^{2+} Intracelular

Los canales de Ca^{2+} se caracterizan por ser proteínas transmembranas que permiten el flujo selectivo de Ca^{2+} a favor de gradiente electroquímico. Se pueden clasificar en función de su mecanismo de activación, pudiendo distinguirse los canales de Ca^{2+} operados por voltaje, VOCCs, por receptor, ROCCs, por segundo mensajero, SMOCCs o por depósitos, SOCCs (Parekh, 2005).

3.1.1.1 Canales de Ca^{2+} Operados por Voltaje (VOCCs)

Los VOCCs se activan por cambios en el potencial de membrana de la célula. En general, se activan mediante la despolarización de la membrana plasmática, la cual puede alcanzarse cambiando la concentración relativa de K^+ en el medio extracelular, es decir, con un medio con alto K^+ extracelular. Estos canales se expresan principalmente en células excitables como las neuronas, las células musculares y las endocrinas. En las neuronas, estos canales son esenciales en la liberación de neurotransmisores y, por tanto, la transmisión sináptica. Se han descrito seis tipos de VOCCs, que a su vez se clasifican desde un punto de vista funcional en *canales de bajo umbral o canales tipo T* y *canales de alto umbral (L, N, P, Q y R)*. Los canales de bajo umbral, también denominados tipo T (transitorios), son activados desde potenciales de membrana bastante negativos por pequeñas despolarizaciones. Sin embargo, los segundos se activan desde potenciales menos negativos y además requieren de una despolarización más intensa. La alteración de la entrada de Ca^{2+} a través de los VOCCs puede desembocar en el desarrollo de diferentes patologías, tales como aterosclerosis y arritmias cardíacas. Además, en algunos tumores se ha observado una expresión elevada de canales tipo T y L, lo que sugiere que pueden tener un papel en la tumorigénesis (Taylor, 2008).

3.1.1.2 Canales de Ca^{2+} Operados por Receptor (ROCCs)

Los ROCCs permiten la entrada de Ca^{2+} al citosol como consecuencia de la unión de un ligando externo. Dentro de los ROCCs destacan los receptores purinérgicos P2X, los cuales permiten la entrada de Ca^{2+} tras la unión extracelular del ATP, su agonista. Estos receptores están ampliamente distribuidos, habiéndose descrito funciones en neuronas, células gliales, hueso, músculo, endotelio, epitelio y células hematopoyéticas. Estos canales tienen un papel importante en patologías tales como la enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes, isquemia, incluso en el desarrollo del cáncer (Burnstock, 2013). Los receptores ionotrópicos nicotínicos se activan por la unión de la *Acetilcolina* (ACh) y de otros agonistas como la nicotina. Estos receptores están implicados en la epilepsia, en la enfermedad de Alzheimer y además se han relacionado con el desarrollo de cáncer de pulmón (Ambrosi, 2013). Los receptores ionotrópicos de glutamato se clasifican en función del agonista que los active, pudiendo distinguir 3 tipos: receptores AMPA, NMDA o kainato. Estos receptores se expresan en neuronas y otras células del sistema nervioso y se ocupan de la transmisión sináptica.

3.1.2 Canales de Ca^{2+} Operados por Segundos Mensajeros (SMOCCs)

La actividad de los SMOCCs está regulada por moléculas que actúan como segundos mensajeros en el interior celular, siendo las más comunes el *Diacylglicerol* (DAG), el ácido araquidónico y sus metabolitos o diversos nucleótidos cíclicos como AMPc y GMPc.

3.1.3 Canales de Ca^{2+} Operados por depósitos (SOCCs)

La activación de los SOCCs constituyen una vía de entrada de Ca^{2+} al citosol como consecuencia del vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , fundamentalmente el *Retículo Endoplasmático* (RE).

3.1.3.1 Entrada de Ca^{2+} Operada por Depósitos

La entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular tras el vaciamiento de los depósitos, a través de ciertos canales de la membrana plasmática, se conoce como *Entrada Capacitativa de Ca^{2+}* o *Entrada de Ca^{2+} Operada por Depósitos* (SOCE). Esta vía regula gran variedad de funciones celulares, y guarda una importante relación funcional con orgánulos subcelulares que participan en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, como el propio RE y las mitocondrias. A nivel molecular, la proteína transmembrana STIM (*Molécula de Interacción Estromal*) actúa como un sensor de Ca^{2+} de los depósitos (Figura 2). Esto se debe a que en su estructura, en concreto, en la cara del lumen del RE, hay un dominio conocido como mano EF que une Ca^{2+} . Por lo tanto, cuando la concentración de Ca^{2+} del RE disminuye, también disminuye el porcentaje del mismo que permanece unido al dominio mano EF, lo que produce oligomerización entre las moléculas STIM. Dicha oligomerización permite la interacción de estas proteínas con los SOCCs, como por ejemplo Oraís y TRPs, los cuales se encuentran localizados en la membrana plasmática, lo que permite la entrada selectiva de Ca^{2+} (Feske, 2006).

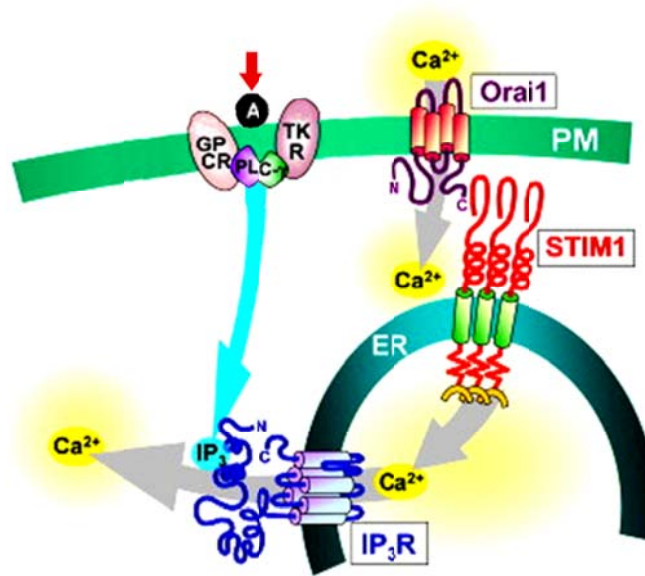


Figura 2. Entrada Capacitativa de Ca^{2+} . La activación por agonista tanto de GPCRs como de los *Receptores Tirosín Kinasa* (TKR) activan a la *fosfolipasa C* (PLC) que genera *Inositol 1,4,5-trifosfato* (IP_3), el cuál activa a su receptor IP_3R provocando el vaciamiento de Ca^{2+} del RE. Este efecto causa la redistribución y oligomerización de STIM1 dentro del RE hacia áreas cercanas de los canales Orai1 de la membrana plasmática. Se produce una interacción entre STIM1 y ORA1 dando lugar a la formación del canal STIM1-Orai1 que permite la entrada de Ca^{2+} al citosol. El relleno del RE revierte los pasos anteriores. Modificado de Hewavitharana (Hewavitharana, 2007).

Recientemente se ha descrito que SOCE está significativamente aumentada en líneas celulares tumorales y en diversos tumores contribuyendo a diferentes características tumorales como la proliferación excesiva, la inmortalidad replicativa, la migración, la metástasis y la resistencia a la muerte celular. Por ejemplo, se ha descrito que en cáncer de pulmón (Zha, 2015), colon (Hernández-Morales, 2017) y esófago (Zhu, 2014) existe sobreexpresión de moléculas implicadas en SOCE como Orai1 y STIM1. Además, la inhibición o silenciamiento de Orai1 y STIM1 reduce la migración del cáncer de próstata (Zhou, 2017) y melanoma (Umemura, 2014).

3.1.4 Sistemas de Extrusión de Ca^{2+} de la Membrana Plasmática.

La extrusión de Ca^{2+} hacia el medio extracelular es esencial para el mantenimiento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ basal. Esta extrusión se realiza en contra de gradiente electroquímico por medio de bombas de $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ asas de la membrana plasmática (PMCA) o intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$ (Rizzuto, 2006).

3.1.5 Homeostasis del Ca^{2+} Intracelular en el Retículo Endoplasmático

El Ca^{2+} puede ser almacenado en orgánulos subcelulares que funcionan como depósitos con el fin de regular y mantener la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. Además, el Ca^{2+} puede ser liberado de estos depósitos por la presencia de canales intracelulares de Ca^{2+} de las endomebranas que se activan en respuesta a distintos ligandos que actúan como segundos mensajeros. El principal depósito de Ca^{2+} es el RE. En dicho depósito la concentración de Ca^{2+} es similar a la del medio extracelular (10^{-3} M). Los canales intracelular de Ca^{2+} del RE se clasifican en función del segundo mensajero que provoca su apertura y, por consiguiente, la liberación de Ca^{2+} hacia el citosol. Estos son el *receptor de Inositol trisfosfato o IP_3* (IP_3R) y el *Receptor de Rianodina* (RyR). El IP_3 se genera por fosfolipasas a su vez activadas por receptores de membrana como los receptores acoplados a proteínas G o ciertos receptores con actividad tirosina quinasa. Este es el caso, por ejemplo de los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas o PDGF. Como sistema de extrusión de Ca^{2+} se encuentra la SERCA (*Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium pump*). Cabe destacar que la SERCA puede ser inhibida irreversiblemente por acción de la *Tapsigargina* (Tg), lo que provoca el vaciamiento del RE, lo que activa la entrada capacitativa de Ca^{2+} en ausencia de IP_3 . 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 (Corbett, 2000).

3.1.6 Homeostasis del Ca^{2+} Intracelular en la Mitocondria

La *mitocondria* es un orgánulo subcelular que participa de forma activa en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. En condiciones de reposo, la concentración de Ca^{2+} mitocondrial es similar a la citosólica. La enorme diferencia de potencial entre la mitocondria y el citosol propicia la acumulación de Ca^{2+} en su interior a favor de su gradiente electroquímico. La entrada de Ca^{2+} a la mitocondria es mediada, básicamente, por el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial, un canal de Ca^{2+} activado por el propio Ca^{2+} intracelular. El Ca^{2+} acumulado en la mitocondria se extruye a través de intercambiadores mitocondriales como el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (NCLX), los cuales aprovechan el gradiente electroquímico de Na^+ para extruir Ca^{2+} . La captura de Ca^{2+} por la mitocondria impide la inactivación de los canales de Ca^{2+} que participan en la entrada capacitativa de Ca^{2+} .

3.2 Aspectos Generales de los Tumores del Sistema Nervioso Central

Los tumores cerebrales son un grupo muy heterogéneo de tumores. Actualmente se conocen más de 120 tipos, según la *Nacional Brain Tumor Society*, y son clasificados por la *Organización Mundial de la Salud* (OMS) a partir de su histología y su grado de malignidad, desde poco agresivo (benignos) a muy agresivo (maligno). Los tumores se clasifican en dos grandes grupos: los tumores primarios, que se originan a partir de células propias del *Sistema Nervioso Central* (SNC), y los tumores secundarios o metastásicos, que son los que se originan en otra parte del cuerpo y se implantan como metástasis en el cerebro. Además, atendiendo al grado de malignidad, la OMS clasifica a los tumores del SNC en: I, II, III, IV. Los tumores de grado I se caracterizan por tener un potencial proliferativo bajo. Los tumores de grado II son

tumores con un índice de proliferación bajo pero se caracterizan por ser infiltrantes y a menudo evolucionan a grados superiores. Los tumores de grado III presentan evidencias histológicas de malignidad y los de grado IV se relacionan con una evolución rápida y fatal, como es el caso habitual del glioblastoma. Entre los tumores primarios más frecuentes destacan el meningioma (benigno) y el glioblastoma (maligno), mientras que las metástasis más frecuentes son de cáncer pulmonar, mama y piel.

3.2.1 Tumores Cerebrales Primarios

Los tumores primarios del SNC constituyen en torno al 2 % del total de las neoplasias del adulto y son responsables del 2.4 % de las muertes por cáncer. En España se diagnostican unos 3.000 casos nuevos al año y se estima una incidencia levemente superior en varones que en mujeres (Dolecek, 2012). A pesar de la relativa baja incidencia, los tumores cerebrales suponen un importante problema de salud, ya que son enfermedades de mal pronóstico y que provocan un gran deterioro funcional. La localización de estos tumores es variable, aunque el sitio más común son las meninges, siendo estos los tumores benignos más frecuentes, seguidos de los gliomas. Según su histología, los tumores primarios se clasifican en tumores de origen glial, pineal y meníngeos.

3.2.1.1 Tumores de origen glial: Gliomas

Los gliomas representan el 80 % de los tumores primarios malignos del SNC (Ganau, 2015). Éstos son los más agresivos y letales y se definen como tumores que se originan en las células de la glía, las cuales son necesarias para el mantenimiento, protección y nutrición de las neuronas. A pesar de los avances terapéuticos incluyendo la cirugía y la radio/quimioterapia, el tratamiento de los gliomas malignos es paliativo, con una supervivencia media aproximadamente de 1 año (Omuro, 2013). Dentro de las células de la glía se encuentran los astrocitos, oligodendrocitos y las células ependimarias, entre otras. Cada uno de estos tipos celulares puede dar lugar a tumores, estableciendo así la siguiente clasificación:

- **Ependimoma:** Son tumores que se forman en las células ependimales, es decir en las células que revisten los espacios que existen dentro del cerebro y de la médula espinal. Se caracterizan por aparecer en edad pediátrica o en individuos jóvenes, y representan el 4 % de los gliomas.
- **Oligodendroglioma:** tumores derivados de los oligodendrocitos y se caracterizan por ser generalmente benignos. Es un tumor de baja prevalencia (6 % de los gliomas), siendo más frecuente en los hombres.
- **Astrocitoma:** tumores que derivan de los astrocitos y que presentan una incidencia en torno al 12 % de todos los tumores cerebrales y al 20 % de todos los gliomas.
- **Glioblastoma multiforme:** Es el tumor cerebral más frecuente, representando el 25 % de los tumores cerebrales y el 50 % de los gliomas, siendo uno de los tumores más agresivos del organismo. Hasta el momento sólo se consigue prolongar la vida del paciente, aunque cada vez con mejor calidad de vida. Se caracteriza por presentar una proliferación celular descontrolada, infiltración difusa, resistencia a la apoptosis, células gigantes y pleiomorfismo nuclear y celular (Yamakana, 2009).

3.2.1.2 Meningiomas

Son tumores que se originan en las envolturas del cerebro, a partir de células aracnoides. Se caracterizan por ser benignos y de crecimiento lento, por lo que los síntomas y signos suelen ser debidos a compresión de estructuras adyacentes.

3.2.1.3 Angiolipoma

Se originan a partir de adipocitos y vasos sanguíneos anormales. Generalmente son de carácter benigno poco frecuentes, representan en torno al 1 % de los tumores espinales.

3.2.2 Metástasis Cerebrales

Son lesiones originadas en tejidos fuera del cerebro pero que se implantan en el tejido cerebral. Son las lesiones cerebrales más frecuentes en adultos. Las metástasis cerebrales ocurren entre un 15 % y un 20 % de los pacientes con cáncer, siendo estas 10 veces más frecuentes que los tumores cerebrales primarios.

3.3 Papel del Ca^{2+} en el Cáncer

La señalización del Ca^{2+} podría estar implicada de manera directa o indirecta en procesos característicos de las células tumorales. Numerosos estudios apuntan a que durante la carcinogénesis tiene lugar un remodelado del Ca^{2+} intracelular. Probablemente, este remodelado sea consecuencia de mutaciones, tanto genéticas como epigenéticas, 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, 2013; Prevarsakaya, 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+} . 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, 2012). Todos estos cambios podrían contribuir a la progresión del cáncer a través de la alteración de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ (Lee, 2011). Por lo tanto, queda claro que los principales canales de Ca^{2+} están involucrados en el crecimiento tumoral maligno. Por ejemplo, La modulación de los VOOCs parece jugar un papel fundamental para la aplicación farmacológica y clínica en lo referente a tumores cerebrales y malignos. También se ha encontrado que los canales TRPs, puesto que participan en la regulación de la homeostasis, control del crecimiento o supervivencia celular, podrían ser otro punto a tener en cuenta en la terapia de los glioblastomas. Otro canal que podría jugar un papel importante es el P2X7R, pues su activación está ligada con el aumento de la expresión de factores que promueven la inflamación, la migración de células tumorales, el incremento de la movilización del Ca^{2+} intracelular y la despolarización de la membrana en los gliomas malignos (Cuddapah, 2011) (Wei, 2008).

Además, estudios recientes relacionan la sobreexpresión de STIM1 y Orai1 en tumores sólidos, lo que promueve la migración celular, invasión, proliferación y resistencia a la apoptosis y quimioresistencia. Por ello, se piensa que inhibidores de estas proteínas podrían ser usados como dianas terapéuticas para prevenir la metástasis. Sin embargo hay estudios contradictorios, Hooper, R. (Hooper, 2015) han informado de que en metástasis de melanoma, dado el papel de la PKC, la SOCE está disminuida.

3.4 Hipótesis, Objetivo Principal y Objetivos Específicos

La hipótesis del presente trabajo es la existencia de alteraciones fisiopatológicas de la señal de Ca^{2+} en células de tumores cerebrales humanos que pudieran ser útiles para el diagnóstico, establecimiento del pronóstico y posibles tratamientos de los tumores.

El Objetivo Principal del Trabajo Fin de Máster es determinar las posibles alteraciones de la señal de Ca^{2+} en las células de tumores cerebrales humanos. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Puesta a punto de un protocolo estándar para el establecimiento de cultivos primarios de muestras de tumores cerebrales humanos, tanto de tumores primarios como metástasis cerebrales, recién extraídas de los pacientes.
2. Caracterizar la presencia de GFAP, proteína propia de la glía, en los cultivos primarios de tumores cerebrales.
3. Caracterizar la respuesta en términos de Ca^{2+} intracelular a distintos agonistas en los cultivos primarios de tumores cerebrales, tanto de tumores primarios como de metástasis cerebrales, que impliquen la activación de diferentes receptores y sistemas de transporte de Ca^{2+} en el Sistema Nervioso Central incluyendo la entrada capacitativa de Ca^{2+} , los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y los receptores/canales de ATP y NMDA

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 BUFFERS Y SOLUCIONES

Tabla 1. Materiales y Reactivos

| Reactivo/ Material | Casa Comercial |
|--|--|
| Poly-L-Lysina, Filtro Nylon 40 μM | BD (Madrid, España) |
| Medio Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS); L-Glutamina; Tripsina-EDTA | Gibco (Barcelona, España) |
| Fura2/AM; Medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEN) 4.5 g/L Glucosa | Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EE.UU) |
| Goat anti-conejo IgG - FITC anticuerpo secundario | Molecular Probes (Eugene, OR, EE.UU) |
| Ácido etilenglicol-bis (2- aminoetilico) - N,N,N',N'-tetraacético (EGTA); KCl; Na ₂ HPO ₄ ; KH ₂ PO ₄ ; HCl; MgCl ₂ ; NaCl; NaOH; Tris-HCl; Tritón X-100; CaCl ₂ ; Glucosa | Merck (Madrid, España) |
| Placa nunc 4 pocillos; Placa Petri | Labelinics (Barcelona, España) |
| Policlonal conejo anti-GFAP; DNAasa I; | Sigma- Aldrich Co. (Madrid, España) |
| Suero Bovino Fetal (FBS) | Thermo Fisher (Waltham, MA) |
| Papaína | Worthington (Lakewood, NJ, EE.UU) |
| PBS; Penicilina-Estreptomicina | Lonza (Barcelona, Spain) |
| Tapsigargina | Alomone (Jerusalem, Israel) |
| Ácido kainato | Tocris Bioscience (Bristol, UK) |

Tabla 2. Medios utilizados para la disgregación y cultivo celular

| Medio | Composición |
|---|--|
| Solución Salina tamponada con Fosfato (PBS) (pH 7,4) | NaCl 136 mM; KCl 2,7 mM; Na ₂ HPO ₄ 8 mM; KH ₂ PO ₄ 1,5 mM |
| DMEN 4,5 g/L Glucosa + 10 % FBS (Medio de Cultivo) | DMEN alta glucosa (4,5 g/L); 1 % L-Glutamina 1 mM; 1 % Penicilina-Estreptomicina 1 mM; 10 % FBS |
| HBSS + 4 % BSA | HBSS; Penicilina-Estreptomicina 1 mM; BSA 4% |
| HBSS + 0,6 % BSA | HBSS; 1 % Penicilina-Estreptomicina 1 mM; BSA 0,6 % |

Tabla 3. Medios utilizados para imagen de Ca²⁺

| Medio | Composición |
|---|--|
| Medio libre de Calcio (Ca 0) (pH 7,42) | NaCl 145 mM; KCl 5 mM; MgCl ₂ 1 mM; HEPES 10 mM; Tris-HCl 1M-EGTA 0.5 mM; Glucosa 10 mM |
| Medio externo estándar (MEC, Ca1) (pH7,42) | NaCl 145 mM; KCl 5 mM; MgCl ₂ 1 mM; HEPES 10 mM; CaCl ₂ 1 mM; Glucosa 10 mM |
| Medio libre de magnesio (Mg 0) (pH 7,42) | NaCl 146 mM; KCl 5 mM; HEPES 10 mM; Glucosa 10 mM; CaCl ₂ 1 mM |
| Medio alto K⁺ (75 mM) (pH 7,42) | KCl 145 mM; CaCl ₂ 1 mM; Glucosa 10 mM; MgCl ₂ 1 mM; HEPES 10 mM |

4.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES

4.2.1 Cultivo Primario de Células Tumorales

Los cultivos celulares tumorales fueron obtenidos de muestras de tejido tumoral cerebral, proporcionados por el Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid. Se obtuvo el consentimiento informado y la aprobación del comité ético. El diagnóstico anatómico-patológico se realizó en el propio hospital y se recogieron los datos clínicos como grado del tumor, edad y sexo. Para realizar el cultivo se siguió el protocolo Brewer (Brewer, 1993) con alguna modificación. Específicamente, al llegar la muestra al IBGM, el tejido se trocea con ayuda de un bisturí y se lava en medio HBSS + BSA 0,6 %. Seguidamente se congela en N₂ líquido parte de la muestra. Con el resto del tejido se procede a realizar el cultivo. En primer lugar, se trituran los trozos de tejido empleando unas tijeras de cirugía y se transfieren a un *ependorf*, el cual contiene 1,6 mL de solución de papaína (32 μ L Papaína (20 u/mL) + 1600 μ L de medio HBSS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ + BSA 0,6 %) previamente filtrada y activada (15 minutos en incubador a 37 °C y 10 % CO₂). A continuación, se incuba durante 15 minutos a 37 °C en baño de agua, agitando el *ependorf* cada 5 minutos. Transcurridos 15 minutos, se añaden 80 μ L de DNAsa I (50 μ g/mL) y se incuba de nuevo durante 15 minutos. Seguidamente, el tejido se transfiere a un tubo cónico de 10 mL, el cual contiene 4 mL de medio de cultivo DMEN 4,5 g/L glucosa + 10 % FBS, y se digiere mecánicamente con una pipeta. Posteriormente, se filtra a través de un filtro de Nylon de 40 μ m y la suspensión celular se centrifuga a 1000 rpm durante 4 min. El pellet se resuspende cuidadosamente en 1 mL de medio de cultivo con una micropipeta.

La densidad celular se mide con ayuda de una cámara Neubauer. Tras el conteo de células, éstas se siembran en *flask* de 25 cm² a la densidad deseada (5x10⁴ cel/mL).

Dependiendo del tipo de tumor, también son sembradas en cristales (12 mm de diámetro tratados con Poly-L-Lysina). Los cultivos celulares se mantienen en un incubador a 37 °C y 10 % de CO₂ en medio de cultivo.

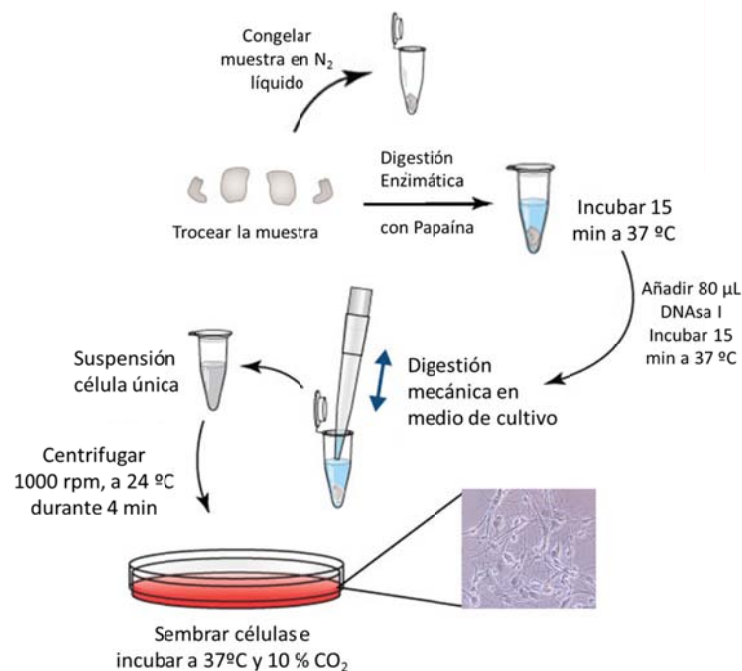


Figura 3. Protocolo para el cultivo primario de muestras tumorales. 1) Trocear el tejido, 2) Digestión enzimática con Papaína (15 min a 37 °C) + 80 μ L DNAsa I (15 min a 37°C), 3) Centrifugar a 1000 rpm, 24°C, durante 4 min, 4) Disgregación mecánica del tejido, 5) Siembra de las células. Modificado de Seibenhener (Seibenhener, 2012).

4.2.2 Inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica (IC) es una técnica que permite detectar la presencia y localización celular de moléculas de interés, tales como proteínas específicas o antígenos presentes las células estudiadas, mediante el uso de un anticuerpo primario. Éste se une de forma específica a su antígeno, y posteriormente un anticuerpo secundario que reconocerá al anticuerpo primario, lo que permite la realización de un examen visual mediante un microscopio de fluorescencia. En ocasiones es posible semi-cuantificar los niveles de expresión de la proteína de interés utilizando medidas de densidad óptica de la imagen de fluorescencia de la muestra.

En este caso se llevó a cabo una IC para identificar las células positivas para la proteína de origen glial, GFAP. En primer lugar, las células se fijan en los cubreobjetos. Para ello, se incuban durante 20 minutos con PFA al 4 % en PBS. Tras la incubación, se lava 6 veces con PBS 1 %. Seguidamente, se permeabiliza las células, lo que permite la unión del anticuerpo a su diana de forma específica. Para ello, se incuban con Tritón X-100 al 0.1% en goat serum al 10 % en PBS durante 10 minutos. A continuación, se realizan 3 lavados con PBS 1 % y se incuban en goat serum al 20 % en PBS (evita posibles uniones inespecíficas del anticuerpo primario). Posteriormente, se incuban las células con el anticuerpo primario, para lo cual se prepara una solución de goat serum al 10 % en PBS a una dilución 1:200 y se incuban durante 12 h a temperatura ambiente y atmósfera húmeda (4 °C). Para la identificación de células positivas a GFAP se utiliza como anticuerpo primario de conejo *anti-Proteína Fibrilar Ácida* (anti-IgG GFAP). Tras 12 h de incubación, los cristales se lavan 3 veces con PBS 1 % y se incuban con el anticuerpo secundario, cabra anti-IgG de conejo IgG conjugado con FITC, que emite fluorescencia verde. El anticuerpo secundario también se prepara en una solución de GS al 10 % en PBS a una dilución 1:300 y se incuban durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación, los cristales se lavan 3 veces con PBS 1 % y después con agua desionizada. Finalmente, se colocan los cristales en un portaobjetos sobre una gota de solución de montaje (50 % de glicerol en PBS) y se sellan con esmalte, almacenándolos en oscuridad a 4 °C hasta el momento de capturar las imágenes con el microscopio de fluorescencia. Cabe destacar, que con el fin de evitar falsos positivos se realizó un control positivo del anticuerpo secundario para cada IC.

4.2.3 Medida de la Concentración de Calcio Citosólico mediante Imagen de Fluorescencia.

Los cambios de $[Ca^{2+}]_{cit}$ a nivel de célula única se detectan gracias a la molécula Fura2/AM, la cual actúa como indicador fluorescente. Esto permite el estudio de variaciones en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en respuesta a diferentes estímulos por medio de microscopía de imagen de fluorescencia.

La molécula penta-acetosimetilester de Fura2 (Fura2/AM) es un quelante de alta afinidad por Ca^{2+} con restos aromáticos, que son los que le confieren propiedades fluorescentes. La sonda Fura2/AM es capaz de atravesar las membranas celulares gracias a su carácter hidrofóbico, al contrario que la molécula de origen, Fura2. Una vez en el interior celular, es hidrolizado por esterasas intracelulares liberando la molécula de Fura2 y quedando retenido el fluoróforo en el interior de cada célula (Grynkiewicz, 1985). El Fura2 es capaz de excitarse a dos longitudes de onda diferentes, es decir, es radiométrico, lo que permite que el cociente de fluorescencias (RATIO F340/380) sea independiente de la cantidad de colorante acumulado dentro de las células. Ésta característica es de suma importancia, pues permite eliminar muchos de los artefactos asociados a la imagen de fluorescencia (Tsien, 1988).

La unión de Ca^{2+} al colorante, cuya estequiometría es de 1:1, cambia la fluorescencia del espectro de excitación del Fura2, aumentando la luz emitida al excitar a la longitud de onda de 340 nm, pero disminuye la excitada a 380 nm (Figura 4), de modo que se puede derivar la ecuación de la ley de acción de masas para la posible determinación de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ (Grynkiewicz, 1985).

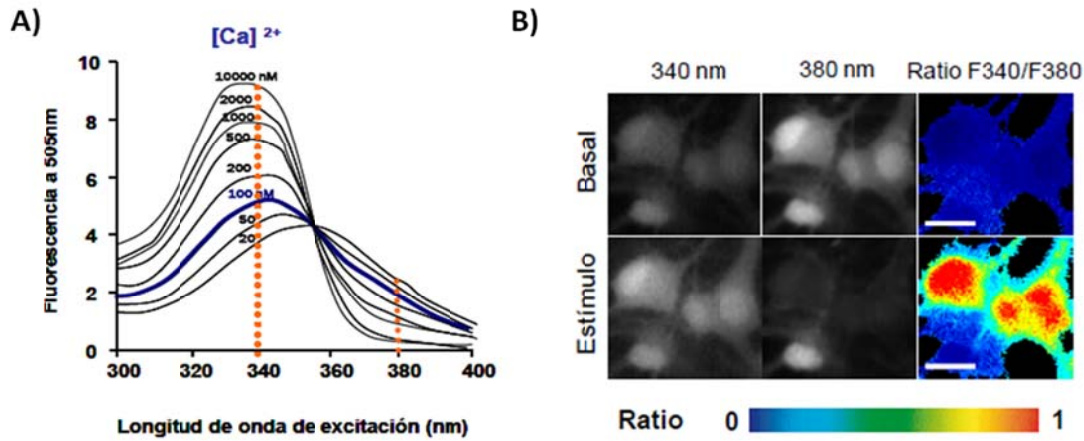


Figura 4. A) Espectro de emisión del Fura2. La gráfica muestra la emisión de fluorescencia de la molécula de Fura2 a 505 nm cuando es excitado con longitudes de onda entre 300 y 400 nm. Medidas realizadas con Ca^{2+} libre a concentraciones entre 20 nM y 0,1 mM, a 20 °C. Se observa el máximo de emisión del complejo Fura2- Ca^{2+} a 340 nm, y el mínimo a 380 nm. Al aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ aumentará la fluorescencia a 340 nm y disminuirá a 380 nm. Modificado de Grynkiewicz, (Grynkiewicz, 1985). **B) Imagen de fluorescencia de Ca^{2+} .** Imágenes de fluorescencia de neuronas cargadas con Fura2/AM y excitadas a 340 y 380 nm, así como el ratio F340/F380 codificado en pseudocolor en situación de reposo (basal) y tras la estimulación (estímulo).

Para los experimentos, las células se siembran sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro a una densidad de alrededor de 50×10^4 cel/cristal y se incuban con Fura2/AM (4 μM , 1h, oscuridad, temperatura ambiente) en medio estándar externo (MEC). Tras la incubación, los cristales se colocan sobre la cámara de perfusión termostatzada a 37 °C de un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert S100 TV). Durante el experimento, las células se mantienen perfundidas con MEC precalentado a 37 °C y se excitan alternativamente a 340 nm y 380 nm, mediante una rueda de filtros (Warner Instruments) sincronizada a la fuente de excitación halógena (Zeiss X-Cite Series 120). La fluorescencia emitida a 505 nm es recogida a través de un objetivo 40x de inmersión en aceite (40x (Zeiss 40/1,30) y capturada mediante una cámara digital Orca ER de Hamamatsu Photonics, (Hamamatsu, Japón). Las imágenes de fluorescencia se toman en regiones de interés, y las variaciones en la fluorescencia de cada una de las células seleccionadas se cuantifican mediante los programas AquaCosmos 2.0 (Hamamatsu) y Origin 7.

4.3 Análisis de Datos

El análisis de los registros de imagen de Ca^{2+} para SOCE se realizó con ayuda de un software que se está desarrollando en el propio laboratorio y que, en breve, estará disponible como software de código abierto en el repositorio *GitHub*. Entre otras prestaciones, permite obtener de forma automática los datos de todas y cada una de las células estudiadas, tales como la altura y el área. Además, también permite afrontar el problema de la gran heterogeneidad de los cultivos tumorales agrupando las células en diferentes grupos según su comportamiento ante los estímulos empleados en los experimentos, para lo que emplea diferentes técnicas multivariantes tales como *Análisis de Componentes Principales*, *Clúster jerárquico*, *K-medoides*, así como la detección de *outliers* mediante criterios multivariantes (*distancias de Mahalanobis*).

Mediante un ANOVA de un factor completamente aleatorizado no balanceado, se estudió si los diferentes tumores estudiados presentan diferencias significativas en la entrada capacitativa de Ca^{2+} , estudiando por un lado los tumores primarios y por otro las metástasis. La hipótesis contrastadas fueron la nula “*todos los tumores presentan la misma SOCE*” frente a la alternativa “*al menos un tumor muestra una SOCE diferente a la de los demás*”. Previamente, se han evaluado los supuestos de normalidad (*Test de Shapiro-Wilks*) y homocedasticidad (*Test de Bartlett*) de los residuos.

En cuanto a los supuestos del modelo, se aceptó la normalidad de los errores (Primarios: *p valor* = 0.24; Metástasis: *p valor* = 0.96) y de la homogeneidad de las varianzas (Primarios: *p valor* = 0.48; Metástasis: *p valor* = 0.24). Tanto en el caso de los tumores primarios como de las metástasis, mediante el ANOVA, se rechazó, para un nivel de significación del $\alpha = 0.05$, la hipótesis nula y se acepta que al menos uno de los tumores (o de las metástasis) presenta una SOCE diferente al resto de tumores primarios (o de metástasis), con un *p valor de* 0.0022 para los tumores primarios y 0.00028 para las metástasis. Puesto que mediante el ANOVA se ha rechazado la hipótesis nula, el siguiente paso fue evaluar qué tumores muestran un mismo comportamiento y, por tanto, cuáles pueden agruparse en un mismo grupo considerando que tienen la misma SOCE, siendo la SOCE diferente entre miembros de diferentes grupos. Para ello, se realizaron comparaciones dos a dos, con la consecuente corrección por comparaciones múltiples, en este caso mediante el *método de Bonferroni*. En el *método de Bonferroni* se realiza un contraste de t entre cada par de tumores, donde los grados de libertad son *Nº de células – Nº de Tumores (o Metástasis)*, el error es el error aleatorio estimado por el ANOVA y el nivel de significación corregido es 0.05 dividido entre las posibles combinaciones dos a dos entre los 4 tumores o entre las 3 metástasis.

5 RESULTADOS

5.1 Cultivos primarios de tumores cerebrales

El primer paso ha sido poner a punto un protocolo estándar para la obtención de cultivos primarios de los distintos tumores cerebrales humanos suficientemente versátil para atender la gran heterogeneidad de los diferentes tipos de tumores recibidos. Dicho protocolo se describe con detalle en el apartado *métodos*. Se realizó un protocolo similar en la mayoría de los tumores, pudiendo variar el tiempo de digestión en algunos de ellos. En los cultivos de tumores primarios en los que había un número suficiente de células, éstas se sembraron sobre cubreobjetos para realizar experimentos el mismo día de cultivo (0 DIV), o al día siguiente (1 DIV), y en el caso de las metástasis siempre se sembraron las células en cubreobjetos para hacer los experimentos a 0-1 DIV. En todos los cultivos se han sembrado células para obtener cultivos a largo plazo. En la mayoría de los tumores primarios se observaba división celular hasta llegar como máximo a 4-5 pases y se ha podido congelar al menos una muestra de células. En la mayoría de los cultivos de tumores primarios las células se han mantenido en cultivo hasta 40-50 DIV.

El Hospital Universitario Río Hortega, nos ha proporcionado 22 muestras frescas de tumores (desde el 28-2-2018 hasta el 7-6-2018), de las cuales se han obtenido cultivos celulares primarios de 14 muestras de tejido tumoral provenientes de pacientes recién operados (Tabla 4). En estos cultivos ha sido caracterizada la presencia de la proteína GFAP, propia de las células de la glía. Además, se realizaron estudios funcionales mediante imagen de Ca^{2+} estudiando la respuesta a diferentes agonistas, así como el estudio de la entrada capacitativa de Ca^{2+} .

Tabla 4. Resumen de las muestras tumorales

| Tipo | ID | Grado | Cultivo | Imagen de Ca^{2+} |
|--------------------------|----------------------------------|-------|---------|---------------------|
| Meningioma | Meningioma 1 | I | SI | SI |
| | Meningioma 2 | I | SI | SI |
| | Meningioma 3 | II | SI | SI |
| | Meningioma 4 | I | SI | SI |
| | Meningioma 5 | I | NO | NO |
| Oligodendroglioma | Oligodendroglioma 1 | II | SI | SI |
| | Oligodendroglioma 2 | II | SI | SI |
| Astrocitoma | Astrocitoma 1 | III | SI | SI |
| | Astrocitoma 2 | I | SI | SI |
| Glioblastoma | Glioblastoma 1 | | SI | SI |
| | Glioblastoma 3 | | NO | NO |
| | Glioblastoma 4 | | SI | SI |
| Metástasis | Metástasis 1 (poco diferenciado) | | NO | NO |
| | Metástasis 2 (Pulmonar) | | SI | SI |
| | Metástasis 3 (Pulmonar) | | NO | NO |
| | Metástasis 5 (Melanoma) | | SI | SI |
| | Metástasis 6 (Adeno papilar) | | NO | NO |
| | Metástasis 7 (Renal) | | NO | NO |
| | Metástasis 8 (Ductal Mama) | | SI | SI |
| | Metástasis 9 (Pulmonar) | | SI | SI |
| Ependimoma | Ependimoma 1 | II | NO | NO |
| Angiolipoma | Angiolipoma 1 | II | NO | NO |

5.2 Caracterización Funcional de Cultivos Primarios de Tumores Cerebrales

➤ Meningiomas

Los meningiomas derivan de las células aracnoides. Como se muestra en la Tabla 4, de las 5 muestras de meningioma obtenidas se ha logrado el cultivo de 4 de ellas. En todos los cultivos las células se dividieron hasta el pase 4-5. Se realizaron experimentos de Imagen de Ca^{2+} (con $n \geq 2$, para cada cultivo, analizando en total 96 células) entre 2 DIV y 17 DIV. No se obtuvieron diferencias significativas entre los cultivos a corto y largo plazo.

La Figura 5 muestra un experimento representativo de un meningioma, concretamente el meningioma 4 (2 DIV). La Figura 5A muestra imágenes representativas de transmisión y de IC frente a GFAP, en la que se observa que las células de meningioma son negativas a GFAP. Mediante imagen de Ca^{2+} , se evaluó tanto SOCE como la respuesta a distintos agonistas. Para evaluar SOCE, las células fueron tratadas con Tg (1 μM) en medio libre de Ca^{2+} durante 10 min. Posteriormente fueron perfundidas con medio MEC conteniendo Ca^{2+} 1 mM. La adición de Ca^{2+} al medio externo aumento la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en todas las células de meningioma, indicando así la activación de SOCE (Ratio 340/380 media de 10 experimentos $=0.21 \pm 0.09$ $k=96$ células)- En cuanto a la respuesta a los distintos agonistas, se observó que este tipo tumoral no responde a la despolarización con medio con alto K^+ (75 mM), ni a glutamato (1 mM). Sin embargo, las células respondieron tanto a NMDA (100 μM) como a ATP (100 μM).

MENINGIOMA

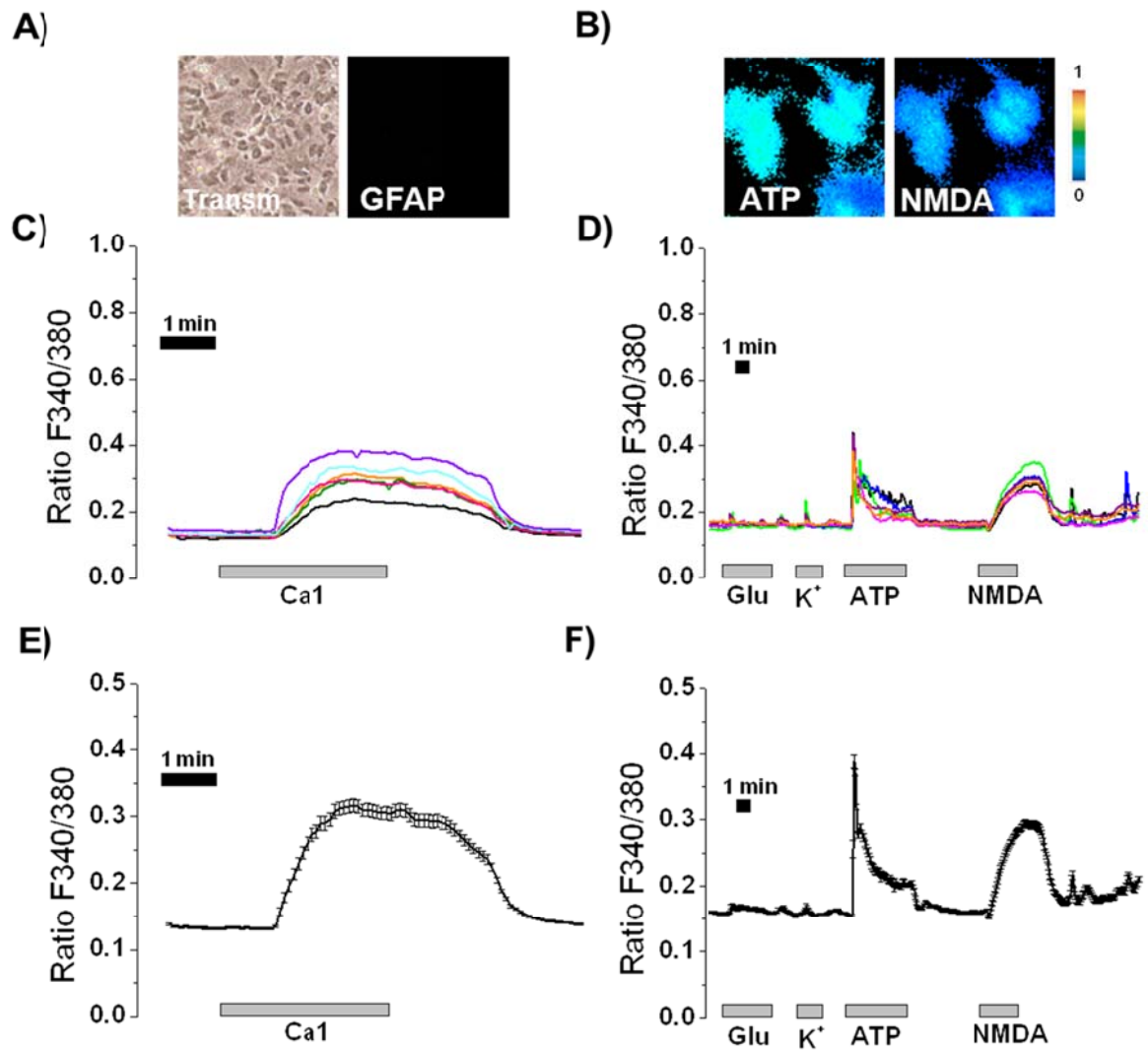


Figura 5. Caracterización del cultivo primario de células tumorales del meningioma 4 (2 DIV). A) Imágenes representativas de transmisión y de IC α -GFAP + FITC. **B)** Imágenes de Ca^{2+} de la respuesta a NMDA y K^+ . La barra en pseudocolor se muestra a la derecha (valores de Ratio de 0 (azul) a 1 (rojo)). **C, E)** Respuesta representativa de SOCE en célula única y media \pm Se (Error estándar) (k= 31 células), respectivamente. **D, F)** Respuesta agonistas en célula única y media \pm Se (k= 41 células), respectivamente (agonistas: NMDA (100 μ M), glutamato (1 mM), K^+ (75 mM) y ATP (100 μ M)).

➤ Oligodendrogliomas

Los oligodendrogliomas derivan de la transformación tumoral de oligodendrocitos. Se dispuso de 2 muestras de oligodendrogliomas, procedentes de 2 pacientes distintos (Tabla 4). Se ha logrado el cultivo en ambas muestras. Sin embargo en uno de los cultivos las células no se dividieron, mientras que en el otro se dividieron hasta el pase 4. Se realizaron experimentos de Imagen de Ca^{2+} (con $n \geq 3$, para cada cultivo, analizando en total 66 células) entre 2 DIV y >40 DIV. No se obtuvieron diferencias significativas entre los cultivos a corto y largo plazo.

La Figura 6 muestra un experimento representativo realizado en células de un oligodendroglioma, concretamente el oligodendroglioma 1 (3 DIV). La Figura 6A muestra imagen de transmisión e imagen representativa de la IC frente a GFAP en estas células, en la que se observa que los cultivos primarios de oligodendroglioma son positivos para GFAP.

Mediante imagen de Ca^{2+} , se evaluó tanto SOCE como la respuesta a distintos agonistas. Respecto del estudio de SOCE, se registró la activación de la entrada capacitativa de Ca^{2+} en todas las células de oligodendroglioma (Ratio 340/380 media de 7 experimentos = $0.3 \pm 0,019$ $k=66$ células). En cuanto a la respuesta a los distintos agonistas, se observó que este tipo tumoral respondió a kainato, a alto K^+ (75 mM) y al agonista específico de oligodendrocitos, PDGF, confirmando así la presencia de dicho tipo celular en el cultivo.

OLIGODENDROGLIOMA

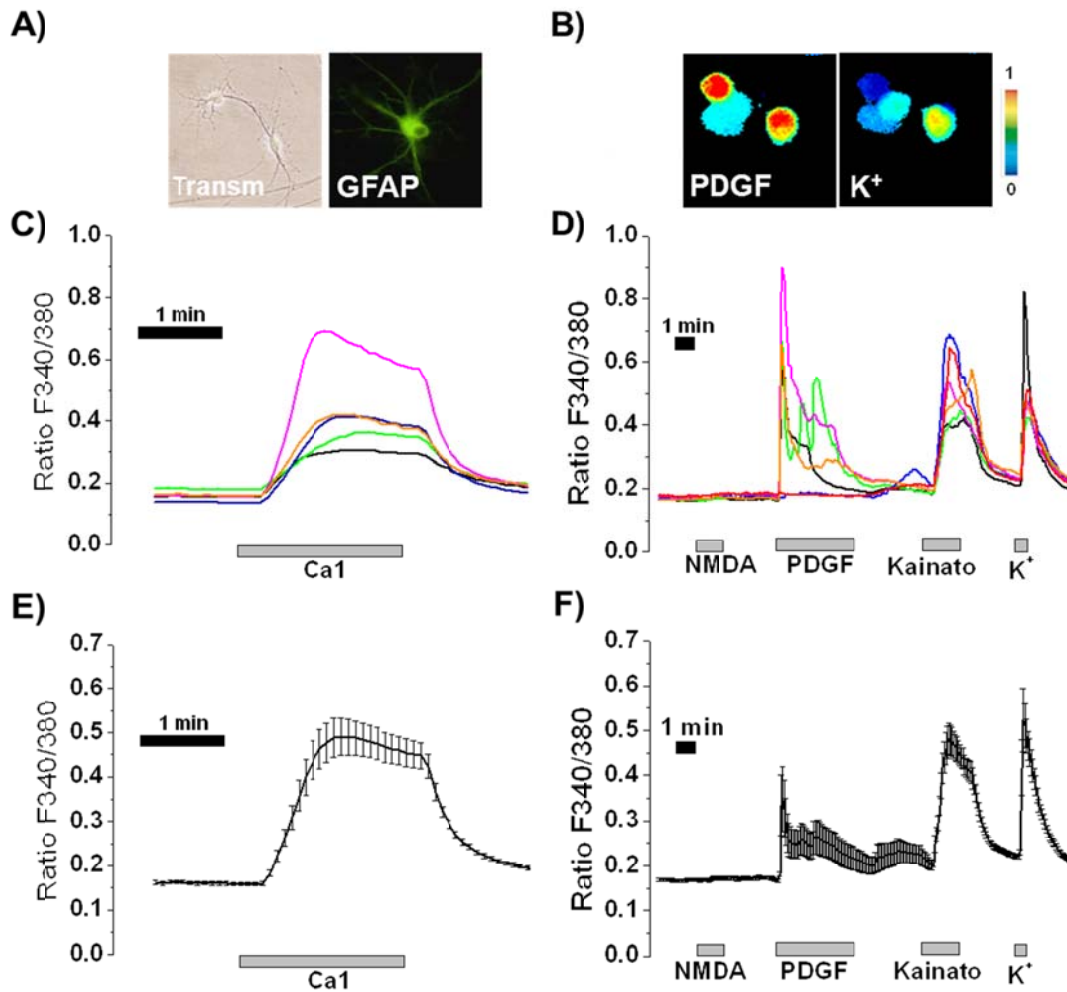


Figura 6. Caracterización del cultivo primario de células tumorales del oligodendroglioma 1 (3 DIV). **A)** Imágenes representativas de transmisión y de IC α -GFAP + FITC. **B)** Imágenes de Ca^{2+} codificadas en pseudocolor de la respuesta a PDGF y K^+ . **C, E)** Respuesta representativa de SOCE en célula única y media \pm Se (k= 11 células), respectivamente. **D, F)** Respuesta agonistas célula en única y media \pm Se (k= 13 células), respectivamente (agonistas: NMDA (100 μM), Ácido kainato (100 μM), PDGF y alto K^+ (75 mM)).

➤ **Astrocitomas**

Los astrocitomas, también de origen glial, derivan de los astrocitos. Se dispuso de 2 muestras de astrocitomas procedentes de 2 pacientes distintos (Tabla 4). Se ha logrado el cultivo en ambas muestras. Sin embargo, en uno de los cultivos las células no se dividieron, mientras que en el otro se dividieron hasta el pase 3. Se realizaron experimentos de Imagen de Ca^{2+} (con $n=2$, para cada cultivo, analizando en total 32 células) entre 7 DIV y >40 DIV. No se observaron diferencias significativas entre los cultivos y corto y largo plazo.

La Figura 7 muestra un experimento representativo de un astrocitoma, concretamente el astrocitoma 1 (7 DIV). En la Figura 7A se muestran imágenes representativas de transmisión e IC de cultivos primarios de Astrocitoma. En ellas se observa como los cultivos de astrocitoma son positivos a GFAP.

Recurriendo a la técnica de imagen de Ca^{2+} , se evaluó tanto SOCE como la respuesta a distintos agonistas. Se registró la activación de la entrada capacitativa de Ca^{2+} en todas las células de astrocitoma (Ratio 340/380 media de 4 experimentos = 0.268 ± 0.026 $k=32$ células). Respecto a la respuesta a los distintos agonistas, se observó que los astrocitomas respondieron a ATP (100 μM) y medio con alto K^+ (75 mM), aunque la respuesta a este estímulo fue menor.

ASTROCITOMA

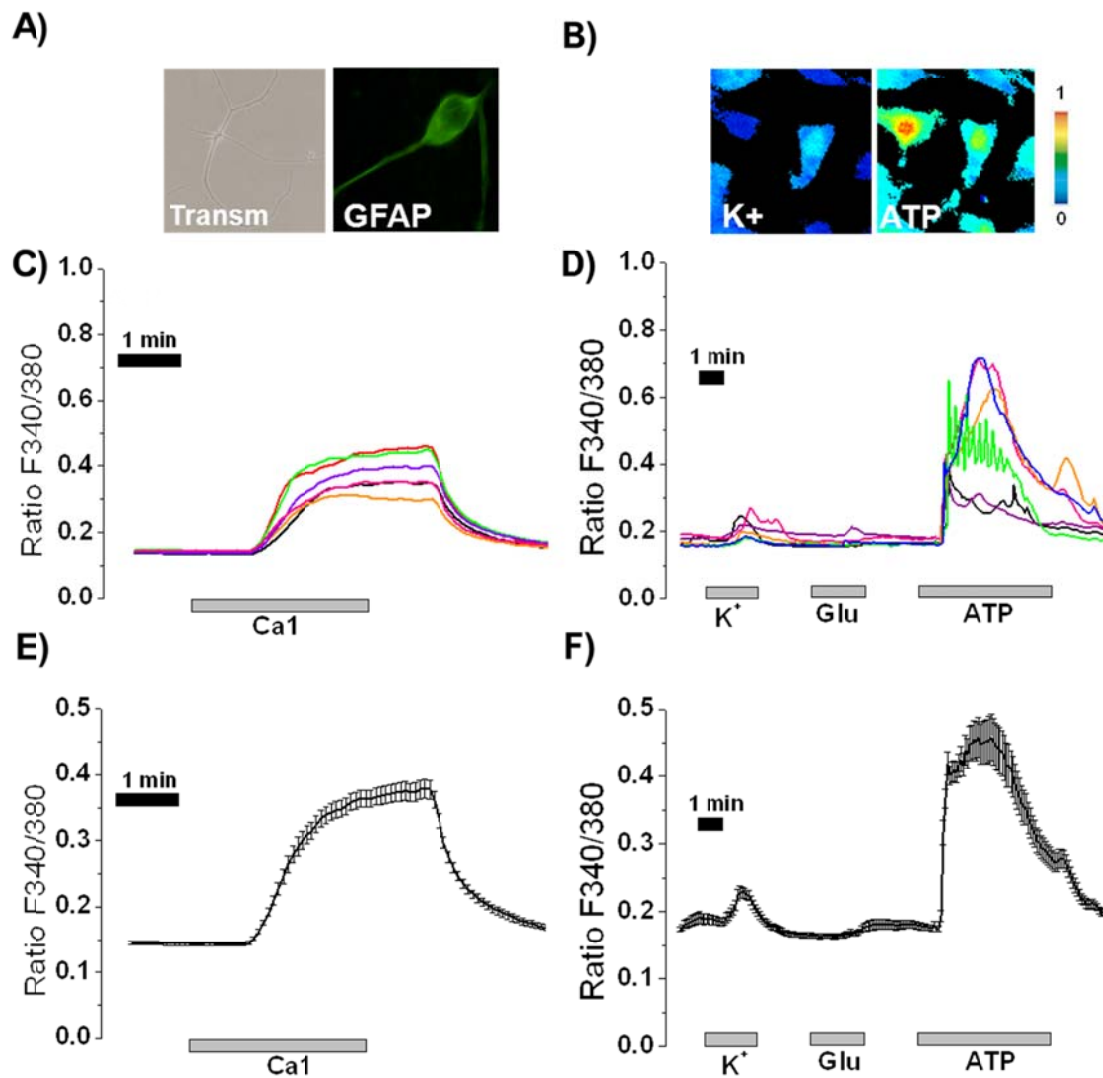


Figura 7. Caracterización del cultivo primario de células tumorales del astrocitoma 1 (7 DIV). **A)** Imagen de transmisión e imagen de representativa de IC α -GFAP + FITC. **B)** Imágenes de Ca^{2+} codificadas en escala pseudocolor de la respuesta a alto K^+ y ATP. **C, E)** SOCE en célula única y media \pm Se ($k=7$ células), respectivamente. **D, F)** Respuesta a agonistas en célula única y respuesta media \pm Se ($k=13$ células), respectivamente (agonistas: K^+ (75 mM), glutamato (1 mM) y ATP (100 μ M)).

➤ Glioblastomas

Los glioblastomas son los tumores de origen glial con peor pronóstico de supervivencia. En este caso, se dispuso de 3 muestras de glioblastoma procedentes de 3 pacientes distintos (Tabla 4). Se ha logrado el cultivo en 2 muestras, en uno de los cultivos las células no se dividieron, mientras que en el otro se dividieron hasta el pase 4-5. Se realizaron experimentos de Imagen de Ca^{2+} (con $n \geq 2$, para cada cultivo, analizando en total 42 células) entre 1 DIV y >40 DIV. No se observaron significativas entre los cultivos a corto y largo plazo.

En la Figura 8 se muestra un experimento representativo de un glioblastoma, concretamente el glioblastoma 4 (1 DIV). En la Figura 8A se muestran imágenes representativas de transmisión e IC de cultivos primarios de glioblastoma. En ellas se observa como los cultivos de glioblastoma son positivos a GFAP.

Empleando la técnica de imagen de Ca^{2+} , se evaluó tanto SOCE como la respuesta a distintos agonistas. En todos los cultivos de glioblastoma se registró la activación moderada de la entrada capacitativa de Ca^{2+} (Ratio 340/380 media de 4 experimentos = $0.12 \pm 0,04$ k=42 células). Respecto al estudio de la respuesta a los distintos agonistas, se observó que este tipo tumoral responde a NMDA (100 μM) y ATP (100 μM).

GLIOBLASTOMA

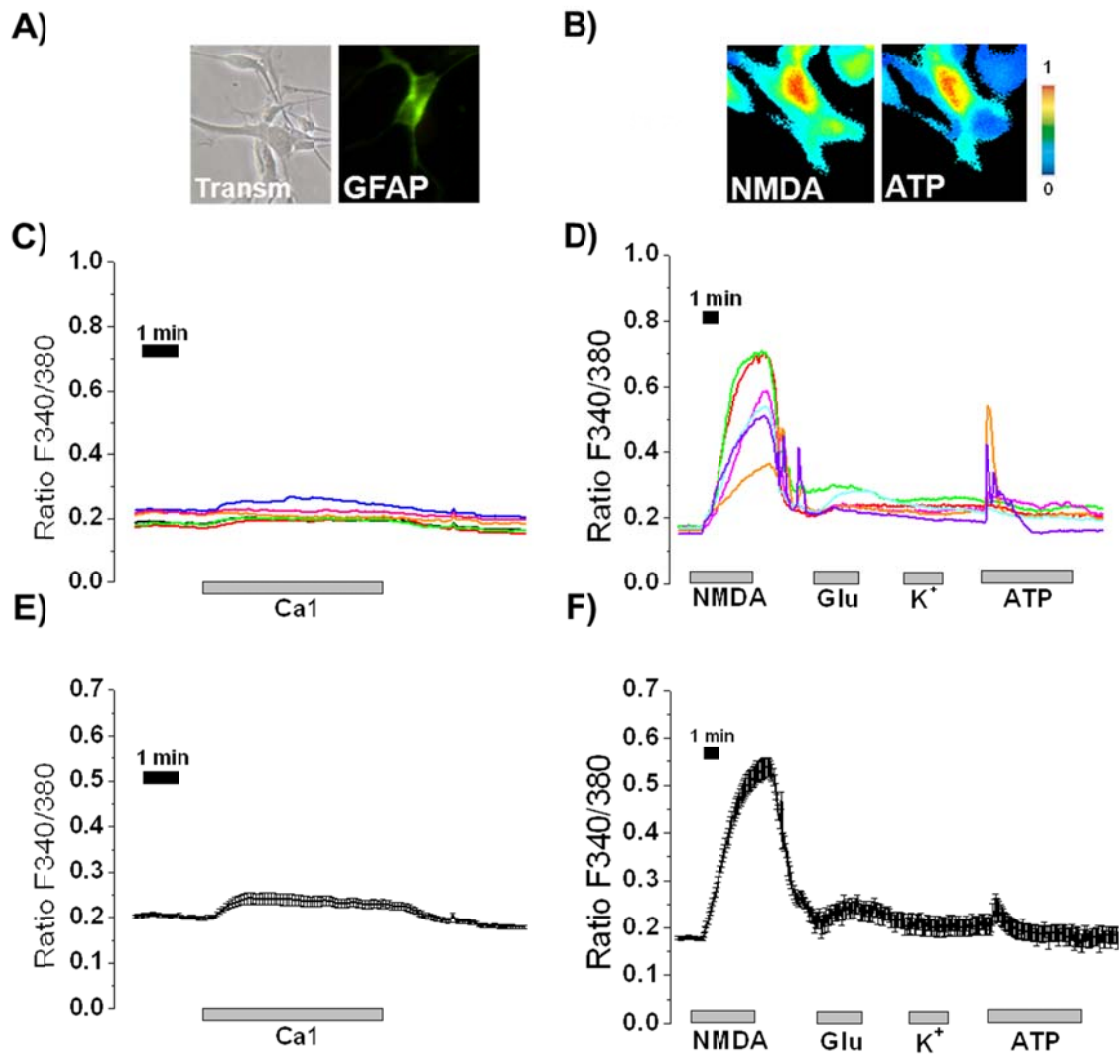


Figura 8. Caracterización del cultivo primario del glioblastoma 1 (1 DIV). **A)** Imágenes representativas de transmisión y de IC α -GFAP + FITC. **B)** Imágenes de fluorescencia de Ca^{2+} codificadas en escala pseudocolor de la respuesta a NMDA y ATP. **C, E)** SOCE en célula única y media \pm Se ($k=22$ células), respectivamente. **D, F)** Respuesta a agonistas en célula única y respuesta media \pm Se ($k=20$ células), respectivamente (agonistas: NMDA (100 μ M), glutamato (1mM), K^+ (75 mM) y ATP (100 μ M)).

➤ Metástasis

Se obtuvieron 9 muestras de metástasis cerebrales procedentes de distintos pacientes (Tabla 4), Se ha logrado el cultivo de 4 de ellas, de las cuales se han realizado IC e imagen de Ca^{2+} . Todos los experimentos se realizaron a 0-1 DIV.

En la Figura 9, se muestran experimentos representativos para los 3 tipos de metástasis de los que se ha logrado el cultivo. Se muestran las imágenes representativas de transmisión e IC α -GFAP así como los registros medios de imagen de Ca^{2+} del estudio de SOCE y la respuesta a distintos agonistas para la metástasis de mama (Figura 10A), adenopapilar (Figura 10 B) y pulmonar (Figura 10 C). Las imágenes de IC muestran que las células de los 3 tipos de metástasis son negativas a GFAP. Respecto del estudio de SOCE se registró una entrada de Ca^{2+} moderada en la metástasis adeno papilar (Ratio 340/380 media de 3 experimentos = $0.09 \pm 0,04$ k=32 células) y pulmonar (Ratio 340/380 media de 7 experimentos = $0.049 \pm 0,009$ k=104 células), mientras que en la metástasis de mama SOCE fue claramente mayor (Ratio 340/380 media de 4 experimentos = $0.208 \pm 0,026$ k=45 células). En cuanto a la respuesta a los distintos agonistas, se observó que las células de los 3 tipos de metástasis responden a ATP (100 μM), y además la metástasis adeno papilar responde a K^+ (75 mM) y glutamato (100 μM).

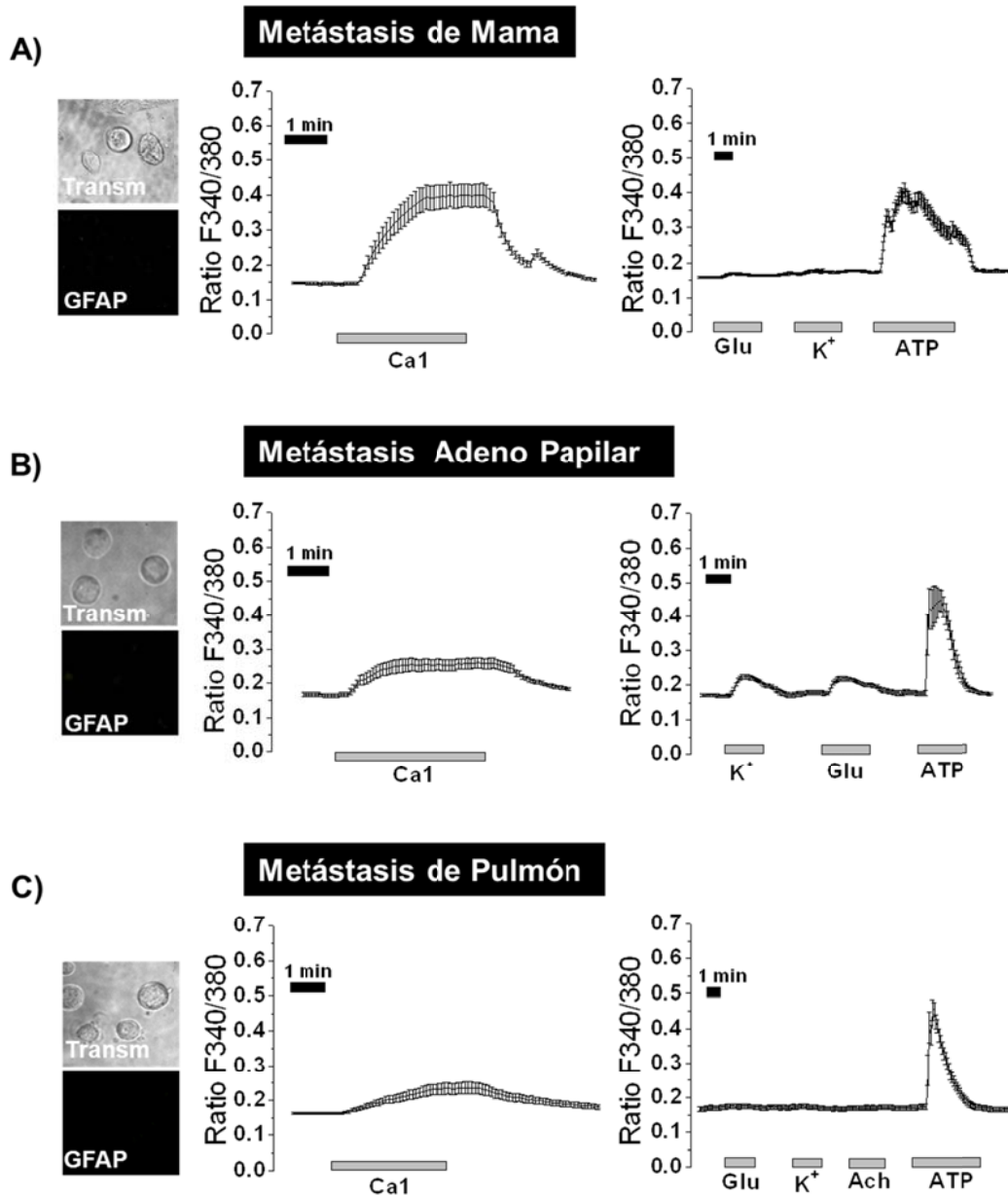


Figura 9. Caracterización del cultivo primario de células tumorales de metástasis de A) mama (1 DIV) B) adeno papilar (0 DIV) y C) pulmón (0 DIV). En el lateral izquierdo se muestran imágenes representativas de transmisión y de IC α -GFAP + FITC de los cultivos de metástasis. En el centro se muestran registros representativos de la concentración de Ca^{2+} (R340/380) tras la activación de SOCE Media \pm Se (mama k=9, adeno papilar k=15 y pulmón k=8). A la derecha la respuesta media de las células a diferentes estímulos incluyendo glutamato (100 μ M), alto K^+ (75 mM), acetilcolina (100 μ M), ATP (100 μ M) (mama k=26, adeno papilar k=6 y pulmón k=13).

5.3 Comparación de la Entrada Capacitativa de Ca^{2+} en Tumores Cerebrales

La Figura 10 muestra el análisis comparativo de los incrementos de Ca^{2+} (Ratio F340/380) que se producen tras la activación de la entrada capacitativa de Ca^{2+} en los distintos tipos de células tumorales. Los métodos estadísticos utilizados se describen en el apartado de *materiales y métodos*. Se encontraron los siguientes grupos:

- Tumores Primarios (Figura 10A) (nivel de significación corregido = 0.0083):
 - Oligodendroglioma, Astrocitoma.
 - Glioblastoma.

Hay que destacar que el Meningioma está en los dos grupos a caballo entre los dos grupos. Aumentando el tamaño muestral seguramente acabe por decantarse por uno de los dos grupos e, incluso crear un grupo por sí mismo.

- Metástasis (Figura 10B) (nivel de significación corregido = 0.017):
 - Mama.
 - Adeno papilar, Pulmón.
- Realizando una comparación utilizando *ANOVA* entre todos los tipos de tumores se encontró que no existen diferencias significativas entre las metástasis de pulmón, adeno papilar y el glioblastoma. (nivel de significación corregido = 0.0024)

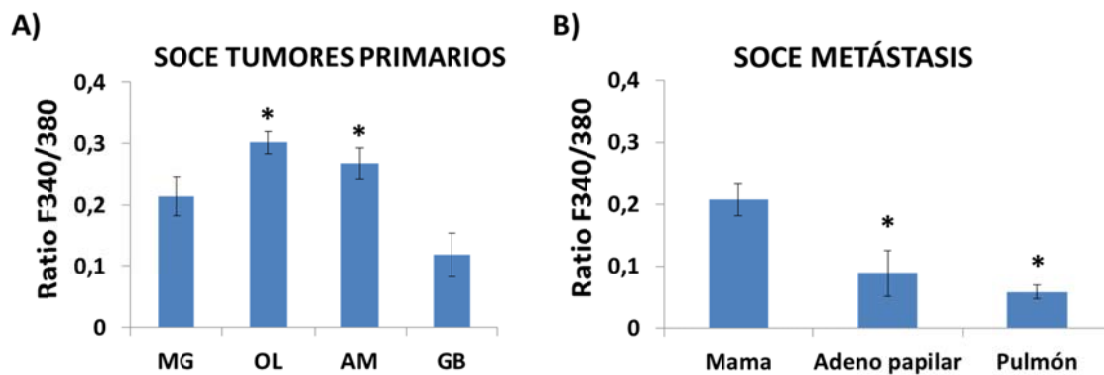


Figura 10. Diagramas de Barras de las medias de los Ratio F340/380 de SOCE con el error estándar, correspondientes a todas las muestras y cultivos realizados en A) Tumores primarios cerebrales. Los asteriscos muestran las diferencias significativas respecto del Glioblastoma para un nivel de significación de 0.05. B) Metástasis cerebrales. Los asteriscos muestran las diferencias significativas respecto de la metástasis de mama para un nivel de significación de 0.05. Abreviaturas: MG: Meningioma, OL: Oligodendroglioma, AM: Astrocitoma, GB: Glioblastoma. Tamaños muestrales (n) y número de células (k): MG: (n=10, k=96); OL: (n=7, k=66); AM: (n=5, k=32), GB: (n=5, k=42); Mama: (n=4, k=45); Adeno papilar: (n=3, k=32); Pulmón: (n=7, k=104).

6 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

La homeostasis del Ca^{2+} intracelular es de gran importancia pues regula procesos tales como la muerte celular programada, proliferación y migración, las cuales están claramente desreguladas en el fenotipo tumoral. De hecho, numerosos autores proponen que durante el cáncer se produce un remodelado de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular que favorece las características diferenciales de las células tumorales (cancer hallmarks) como la proliferación celular, la capacidad de migración e invasión y la resistencia a la muerte. Sin embargo muchos estudios han sido llevados a cabo en líneas celulares y menos en tumores primarios o metástasis, especialmente en tumores cerebrales donde prácticamente no hay estudios. Estudios recientes han relacionado la sobreexpresión de proteínas implicadas en SOCE como STIM1 y Orai1 en tumores sólidos, lo que favorece la migración celular, invasión, proliferación y resistencia a la apoptosis y quimioresistencia. Por ello, se piensa que inhibidores de estas proteínas podrían ser dianas terapéuticas para prevenir la metástasis. Sin embargo hay estudios contradictorios, pues Hooper, R. (Hooper, 2015) han informado que en metástasis de melanoma la SOCE está disminuida. Por otro lado, varios estudios (Keir, 2013) destacan la importancia de los canales VOCCs tipo T y sugieren estos como posibles dianas terapéuticas en tumores cerebrales. Otros estudios también señalan la importancia del microambiente de los tumores (pH, la presencia de factores de crecimiento, neurotransmisores, etc.) en la fisiopatología y proliferación de los tumores como es el caso de los glioblastomas. En estos se ha descrito como tras la estimulación con ATP se produce la liberación de glutamato, el cual resulta tóxico para el tejido y se relaciona con un aumento de la invasión del tumor en las regiones cerebrales (Strong, 2018).

En el presente trabajo, se ha optimizado el protocolo de obtención de cultivos primarios de tumores cerebrales a partir de muestras de pacientes recién operados. Cabe destacar que los estudios llevados a cabo en estos cultivos se acercan más a las condiciones fisiológicas del cáncer en humanos que aquellos estudios llevados a cabo en modelos de líneas celulares o animales. Dentro del amplio abanico de los diferentes tipos de tumores cerebrales, se han obtenido cultivos primarios de los siguientes tipos: meningiomas, oligodendrogliomas, astrocitomas, glioblastomas y metástasis cerebrales de distintos orígenes. Con el fin de que los resultados observados se acerquen lo más posible al comportamiento de estos tumores en el propio paciente, es conveniente realizar los experimentos a 0-1 DIV, siempre que las condiciones experimentales lo permitan.

Dado que los cultivos primarios obtenidos presentan una gran heterogeneidad celular y, que algunos de los tipos tumorales tienen origen glial, se llevó a cabo la identificación de las células de la glía mediante la detección de GFAP por IC. Como cabría esperar, los cultivos primarios de origen glial (oligodendroglioma, astrocitoma y glioblastoma) son positivos a GFAP, mientras que en los cultivos de metástasis cerebrales no se detectó la presencia de GFAP.

Hemos caracterizado las respuestas de las células tumorales a una serie de agonistas que estimulan receptores propios de las células tumorales que activan diversos sistemas de transporte de Ca^{2+} . Así mismo se ha estudiado la entrada capacitativa de Ca^{2+} cuyo aumento ha sido descrito en tumores de origen epitelial como el cáncer de colon y el cáncer de mama donde podría contribuir a algunas características de las células tumorales. La imagen de Ca^{2+} reveló una posible asociación entre el grado de malignidad de los tumores y la disminución de la entrada capacitativa de Ca^{2+} . Cabe destacar que, en los cultivos de metástasis pulmonar y adeno papilar, SOCE está notablemente disminuida, mientras que en la metástasis de mama no se observó el mismo comportamiento. Esta disminución de SOCE en metástasis está de acuerdo

con los resultados obtenidos por Hooper en el estudio de melanomas invasivos (Hooper, 2015). SOCE está también muy disminuida en los Glioblastomas, un tipo de tumor considerado de una gran malignidad.

En cuanto a la respuesta a los distintos agonistas, se obtuvieron resultados dispares dependiendo del tipo tumoral. El tumor más característico fueron los oligodendrogliomas, único tipo de tumor primario cerebral que mostró entrada de Ca^{2+} por canales dependientes de voltaje activados por despolarización con medio con alto K^+ . Además las células de oligodendroglioma respondieron a kainato y PDGF, un agonista específico de células de oligodendroglía. Los astrocitomas, solo respondieron a ATP pero no a alto K^+ ni glutamato. Los meningiomas y glioblastomas respondieron a NMDA que activa un receptor/canal de Ca^{2+} característico de las neuronas del SNC. Sin embargo, los glioblastomas no responden a ATP mientras que los meningiomas si lo hacen. Por tanto, los datos sugieren que los antagonistas de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje podrían efectos biológicos en los oligodendrogliomas, pero no en el resto de tumores cerebrales primarios. Además, los antagonistas del receptor para NMDA podrían tener efectos en meningiomas y glioblastomas. Finalmente, los antagonistas de receptores purinérgicos podrían tener efectos sobre meningiomas y astrocitomas.

Respecto a las metástasis cerebrales, solo se observó respuesta a ATP. No obstante en el caso de la metástasis adeno papilar, se registró un ligero incremento del Ca^{2+} citosólico tras la estimulación con K^+ y glutamato.

Estos resultados suponen la base a futuros estudios, también en colaboración con el Servicio de Neurocirugía del Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid, en los que se pretende abordar no solo el estudio funcional de los tumores y su entorno o halo, sino también las bases moleculares del remodelado del Ca^{2+} intracelular, para lo que se prevé hacer estudios tanto transcriptómicos como proteómicos, entre otros.

7 CONCLUSIONES

1. Se ha logrado poner a punto un protocolo versátil para la obtención de cultivos primarios de muestras de tumores cerebrales recién extraídas de los pacientes.
2. Las células de tumores cerebrales de origen glial (oligodendrogliomas, astrocitomas y glioblastomas) expresan GFAP mientras que las células de metástasis cerebrales no expresan GFAP.
3. Los oligodendrogliomas responden a despolarización con alto K^+ , kainato y PDGF.
4. Los glioblastomas responden a NMDA, pero no a K^+ , ATP o glutamato.
5. Los meningiomas y astrocitomas responden a ATP, pero no a K^+ o glutamato.
6. Existe una correlación negativa entre la malignidad del tumor y la entrada capacitativa de Ca^{2+} . Las metástasis pulmonares y adeno papilar muestran déficit de SOCE y responden, casi exclusivamente, a ATP.

8 AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los Dres. Rosario Sarabia e Ignacio Arrese, así como a todo el Servicio de Neurocirugía del Hospital Universitario Río Hortega (HURH) de Valladolid, por el acceso a las muestras de tumores cerebrales. Asimismo, agradecemos a Enrique Pérez-Riesgo la colaboración en el análisis estadístico de los resultados. Este trabajo ha sido financiado gracias al proyecto de investigación de referencia BFU2015-70131R del Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Ambrosi, P., Becchetti, A. (2013). Targeting Neuronal Nicotinic Receptors in Cancer: New Ligands and Potential Side-Effects. *Recent Patents Anticancer Drug Discovery*. 8(1): 38-52.
- Berridge, M. J., Bootman, M.D. Roderick, H. L. (2003). Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 4(7): 517-529.
- Brewer, G.J., Torricelli, J.R., Evege, E.K., & Price, P.J. (1993). Optimized Survival of Hippocampal Neurons in B27-Supplemented Neurobasal, a New Serum-Free Medium Combination. *Journal of Neuroscience Research*. 35(5): 567-76.
- Burnstock, G. (2013). Purinergic Signalling: Pathophysiology and Therapeutic Potential. *Keio Journal of Medicine*. 62(3), 63-73.
- Chen YF, Chen YT, Chiu WT, Shen MR (2013). Remodeling of Calcium Signaling in Tumor Progression. *Journal of Biomedical Science*. 20: 23.
- Clapham, D. E. (1995). Calcium Signaling. *Cell Press*. 80(2): 259-268.
- Corbett, E.F., Michalak, M. (2000). Calcium, a Signaling Molecule in the Endoplasmic reticulum? *Trends in Biochemical Science* . 25(7): 307-11.
- Cuddapah, V. A., Sontheimer, H. (2011). Ion Channels and Transporters in Cancer. *Ion Channels and the Control of Cancer Cell m_iMigration*. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 301(3), C541–C549.
- Dolecek, T.A., Propp, J.M., Stroup, N.E., Kruchko, C. (2012). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro-oncology*. 14 Suppl 5:v1-49.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M. , Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly M., Rao, A. (2006). A Mutation in Orai1 Causes Immune Deficiency by Abrogating CRAC Channel Function. *Nature*. 441(7090): 179-1785.
- Ganau, L., Paris, M., Ligarotti, G. K., Ganau, M. (2015). Management of Gliomas: Overview of the Latest Technological Advancements and Related Behavioral Drawbacks. *Behavioural Neurology*. 862634.

- Grienberfer, C., Konnerth, A. Imaging Calcium in Neurons. (2012). *Neuron*. 8;73(5):862-85.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y. (1985). A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties. *Journal of Biological Chemistry*, 260(6): 3440-3450.
- Hernández-Morales, M., Sobradillo, D., Valero, R. A., Muñoz, E., Ubierna, D., Moyer, M. P., Núñez, L., Villalobos, C. (2017). Mitochondria Sustain Store-Operated Currents in Colon Cancer cells but not in Normal Colonic Cells: Reversal by Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Oncotarget*. 8(33), 55332–55352.
- Hewavitharana, T., Deng, X., Soboloff, J., Gill, D.L. Role of STIM and Orai Proteins in the Store-Operated Calcium Signaling Pathway. *Cell Calciu*. 42: 173-182
- Hooper, R., Zhang, X., Webster, M., Go, C., Kedra, J., Marchbank, K., Gill, D.L., Weeraratna, A.T., Trebak, M., Soboloff, J. (2015). Novel protein Kinase C-mediated Control of Orai1 Function in Invasive melanoma. *Molecular Cell Biology*. 35;2790-2798
- Keir, S.T., Friedman, H.S., Reardon, D.A., Bigner, D.D., Gray, L.A., (2013). Mibefradil, a Novel Therapy for Glioblastoma Multiforme: Cell Cycle Synchronization and Interlaced Therapy in a Murine Model. *Journal of Neurooncology*. 111:97-102
- Lee, J.M., Davis, F.M., Roberts-Thomson, S.J., Monteith, G.R. (2011). Ion Channels and Transporters in Cancer. Remodeling of Ca²⁺ Signaling in Tumorigenesis: Role of Ca²⁺ Transport. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 301: C969-76.
- Monteith, G. R., Davis, F. M., & Roberts-Thomson, S. J. (2012). Calcium Channels and Pumps in Cancer: Changes and Consequences. *The Journal of Biological Chemistry*. 287(38), 31666–31673.
- Omuro, A., DeAngelis, L.M. (2013). Glioblastoma and Other Malignant Gliomas. A Clinical Review. *JAMA*. 310(17):1842–1850.
- Parekh, A. B. and Putney, J. W. (2005). Store-Operated Calcium Channels. *Physiological Reviews*. 85(2): 757-810.
- Prevarskaya N., Oquadid-Ahidouch, H., Skryma, R., Shuba, Y. (2014). Remodelling of Ca²⁺ Transport in Cancer: how it Contributes to Cancer Hallmarks? *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*. 369: 20130097.
- Rizzuto, R., Pozzan, T. (2006). Microdomains of Intracellular Ca²⁺: Molecular Determinants and Functional Consequences. *Physiological Reviews*. 86(1): 369-408.
- Seibenhener, M. L., Wooten, M. W. (2012). Isolation and Culture of Hippocampal Neurons from Prenatal Mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. (65), 3634.
- Strong, A.D., Indart, M.C., Hill, N. R., Daniels, R.L. (2018). GL261 Glioma Tumor Cells Respond To ATP with an Intracellular Calcium Rise and Glutamate Release. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1-10
- Taylor, J. T., Zeng, X.-B., Pottle, J. E., Lee, K., Wang, A. R., Yi, S. G., Scruggs, J.A., Sikka, S.S., Li, M. (2008). Calcium signaling and T-type Calcium Channels in Cancer Cell Cycling. *World Journal of Gastroenterology*. 14(32), 4984–4991.

- Tsien, R. D., Wong, R.K. (1988). Cellular Mechanism of Neuronal Synchronization in Epilepsy. *Science*. 11(10): 745-747.
- Umemura, M., Baljinnayam, E., Feske, S., De Lorenzo, M. S., Xie, L.-H., Feng, X., Oda, K., Makino, A., Fujita, T., Yokoyama, U., Iwatsubo, M., Chen, S., Goydos, J.S., Ishikawa, Y., Iwatsubo, K. (2014). Store-Operated Ca²⁺ Entry (SOCE) Regulates Melanoma Proliferation and Cell Migration. *PLoS ONE*. 9(2), e89292.
- Yamanaka, M.D., Saya, M.D. (2009). Molecularly Targeted Therapies for Glioma. *Annals of Neurology*. 6(6):717-29
- Wei, W., Ryu, J.K., Choi, H.B., McLarnon, J.G. (2008) Expression and Function of the P2X(7) Receptor in Rat C6 Glioma Cells. *Cancer Lett*. 260:79-87.
- Zha, Z-Y., Zhong, L-X., Feng, M., Wang, J-F., Liu, D-B., Xiong, J-P. (2015). Over-Expression of Orai 1 Mediates Cell Proliferation and Associates with Poor Prognosis in Human Non-Small Cell Lung Carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 8(5):5080-8
- Zhou, Y., Gu, P., Li, J., Li, F., Zhu, J., Gao, P., Zang, Y., Wang, Y., Shan, Y., Yang, D. (2017). Suppression of STIM1 Inhibits the Migration and Invasion of Human Prostate Cancer Cells and is Associated with PI3K/Akt Signaling Inactivation. *Oncology Reports*. 38(5), 2629–2636.
- Zhu, H., Zhang, H., Jin, F., Fang, M., Huang, M., Yang, C. S., Chen, T., Fu, L., Pan, Z. (2014). Elevated Orai1 Expression Mediates Tumor-Promoting Intracellular Ca²⁺ Oscillations in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Oncotarget*. 5(11), 3455–3471.