



Universidad de Valladolid

**“Mecanismo de acción de la
putrescina sobre la proliferación
de células endoteliales de colon”**

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Nutrición Humana y Dietética

Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid

Curso 2018/2019

Presentado por: Águeda Prieto Peñín

Tutelado por: Dra. Lucía Núñez Llorente

Agradecimientos

A mi tutora, por permitirme formar parte de su laboratorio. A todo el equipo del laboratorio D4 del IBGM, por hacer que me sintiera como una más. En especial, agradecer a Lucía G. todo el tiempo dedicado, por haberme ayudado a llevar a cabo este trabajo y por todo lo que me ha enseñado.

Resumen

El cáncer de colon o cáncer colorrectal (CRC) es una de las principales causas de muerte en nuestro país y en el mundo, siendo uno de los cánceres más comunes. A pesar de realizarse un cribado de la población mayor de 50 años, el CRC sigue teniendo una incidencia y mortalidad muy elevada falleciendo la mitad de los pacientes antes de los 5 años después del diagnóstico.

Se ha postulado que existen variaciones en la señal de calcio celular durante el desarrollo del cáncer. Específicamente, las células de cáncer de colon muestran un aumento de la entrada de calcio dependiente de depósitos (SOCE). Uno de los fármacos que actualmente se están ensayando para prevenir el cáncer de colon es difluorometilorinitina (DFMO), un inhibidor suicida de la enzima ornitina descarboxilasa, el paso limitante en la síntesis de poliaminas, como putrescina. Se ha asociado un nivel elevado de poliaminas con la presencia de cáncer de colon. Las poliaminas pueden provenir no sólo de la síntesis elevada en las células tumorales sino también de la dieta o de la propia microbiota. Se ha propuesto que el exceso de poliaminas podría contribuir al remodelado de la señal de calcio en el cáncer de colon. En el presente trabajo se ha investigado los efectos de putrescina sobre la señal de calcio y proliferación de células epiteliales normales de colon humano NCM460. Para ello, se ha utilizado la imagen de fluorescencia y el conteo celular en cámara de Neubauer. Los resultados indican que DFMO inhibe la entrada capacitativa de calcio y la proliferación celular en células NCM460 y que ambos efectos son abolidos con putrescina. Putrescina aumenta la entrada de calcio e induce proliferación celular en las células NCM460. Los resultados indican el papel relevante de la entrada capacitativa de calcio en el efecto proliferativo de las poliaminas y que esta vía de entrada de calcio podría ser una nueva diana en la quimioprevención del cáncer. Además, los datos sugieren que el control dietético de los niveles de poliaminas podría ayudar a prevenir el cáncer colorrectal.

Palabras clave: cáncer de colon, poliaminas, calcio intracelular, proliferación celular.

Abstract

Colon cancer or colorectal cancer (CRC) is one of the leading causes of death in our country and the world, being one of the most common cancers. Despite screening of the population over 50 years of age, CRC continues to have a very high incidence and mortality, with half of the patients dying within 5 years after diagnosis.

It has been postulated that there are variations in the cellular calcium signal during the development of cancer. Specifically, colon cancer cells show an increase in store-operated calcium entry (SOCE). One of the drugs currently being tested to prevent CRC is difluoromethylornithine (DFMO), a suicide inhibitor of the enzyme ornithine decarboxylase, the limiting step in the synthesis of polyamines, such as putrescine. A high level of polyamines has been associated with the presence of colon cancer. Polyamines accumulate not only from enhanced synthesis in tumor cells, but also from the diet or even from the populating microbiota. It has been proposed that excess polyamines could contribute to the remodeling of the calcium signal in colon cancer. In the present work, the effects of putrescine on the calcium signal and proliferation of normal epithelial cells of human colon NCM460 have been investigated. For this, fluorescence imaging and the cell proliferation assays in Neubauer's chamber have been used. The results indicate that DFMO inhibits SOCE and cell proliferation in NCM460 cells and that both effects are abolished with putrescine. In addition, putrescine itself increased both SOCE and NCM460 cell proliferation. The results indicate the relevant role of the capacitive calcium entry in the proliferative effect of polyamines and that this calcium entry pathway could be a new target in the chemoprevention of cancer. In addition, the data suggest that dietary control of polyamine levels may help prevent colorectal cancer.

Key words: colon cancer, polyamines, intracellular calcium, cell proliferation.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Las poliaminas	7
1.2. Fuentes de poliaminas.....	10
1.3. Cáncer de colon.....	13
1.4. Homeostasis del calcio intracelular	14
1.5. Entrada capacitativa de calcio (SOCE)	15
1.6. SOCE y cáncer de colon	16
2. JUSTIFICACIÓN.....	18
3. OBJETIVOS.....	18
4. MATERIAL Y MÉTODOS	19
4.1. Cultivo celular	19
4.2. Proliferación celular	19
4.3. Medida de la concentración de calcio citosólico $[Ca^{2+}]_c$	21
4.4. Análisis estadístico	23
5. RESULTADOS.....	24
6. DISCUSIÓN.....	29
7. CONCLUSIONES.....	30
8. BIBLIOGRAFÍA	31

ABREVIATURAS

ADC: Arginina descarboxilasa

APC: *Adenomatous polyposis coli*

ATP: adenosin trifosfato

[Ca²⁺]_c: concentración de calcio
citosólico

CO₂: dióxido de carbono

COX2: Ciclooxygenasa-2

DFMO: α -difluorometilornitina

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's
Medium*

EGTA: *Ethylene Glycol Tetraacetic
Acid*

EMM: error estándar de la media

FBS: suero bovino fetal

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HPLC: cromatografía líquida de alta
presión

HT29: células tumorales de colon
humano

IP₃: Inositol 1,4,5-Triphosphate

IP₃R: Inositol 1,4,5-Triphosphate
Receptor

MEC: medio externo completo

NCM460: células normales de colon
humano

NRK: *Normal Rat Kidney Epithelial
Cells*

ODC: Ornitina descarboxilasa

PAO: poliamina oxidasa

PBS: tampón fosfato salino

RE: retículo endoplásmico

RyR: receptor de rianodina

SAM: S-adenosilmetionina

SAMDC: S-adenosilmetionina
descarboxilasa

SAMdc: S-adenosilmetionina
descarboxilada

SERCA: *Sarcoplasmic or Endoplasmic
Reticulum Ca²⁺ ATPase*

SOCE: entrada capacitativa de calcio

SPCA: *Secretory pathway Ca²⁺
ATPase*

SpdS: espermidina sintasa

SpmS: espermina sintasa

SSAT: espermina/espermidina acetil
transferasa

TRIS-HCL: *Tris-Hydrochloride*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Las poliaminas

Las poliaminas, como la putrescina, la espermina, la espermidina y la cadaverina, son aminos alifáticas presentes en todos los organismos vivos (**Figura 1**). Estas moléculas son necesarias para el crecimiento, diferenciación y proliferación celular, así como para la inmunidad y la estabilidad del ADN [1, 2, 3]. También están implicadas en la adhesión celular, la reparación de la matriz extracelular y participan en procesos específicos de señalización [4]. Los niveles intracelulares de éstas siguen un estricto control regulador, de manera que una depleción de las mismas afecta a un gran número de procesos biológicos: transcripción, traducción, regulación de la expresión génica, autofagia y resistencia al estrés, entre otros [5, 6, 7, 8, 9]. Estos datos reflejan la importancia de las poliaminas en la función celular.

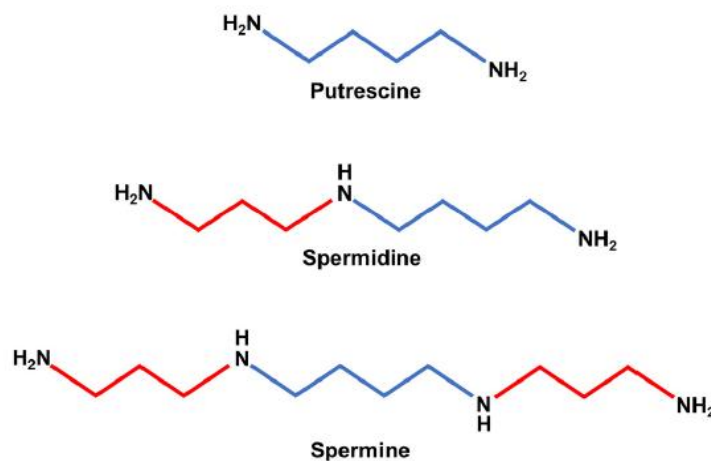


Figura 1: Estructura química de las principales poliaminas. Se trata de policationes pequeños, con carga positiva, lo cual es una condición fundamental para un correcto funcionamiento celular [3].

Las poliaminas se forman principalmente a partir de la ornitina y la metionina; también son formadas a partir de la arginina y la lisina, pero estos dos aminoácidos sirven como fuentes secundarias [7]. En células de mamíferos, la síntesis de poliaminas (**Figura 2**) comienza con una descarboxilación de la ornitina a putrescina, catalizada por la enzima ornitina descarboxilasa (ODC). Posteriormente, se producen reacciones de adición de grupos aminopropilo, donados por la SAMdc, producida por la enzima SAMDC. Esta adición está catalizada por la SpdS y la SpmS, las cuales generan

espermidina y espermina, respectivamente [3, 5, 7]. No obstante, la síntesis de espermidina y espermina está limitada por la disponibilidad de metionina, ya que este aminoácido es precursor de la SAM [4].

En el caso de microorganismos y plantas, las poliaminas se producen a partir de la conversión de arginina a ornitina a través de la ADC y posteriormente a agmatina y putrescina [10].

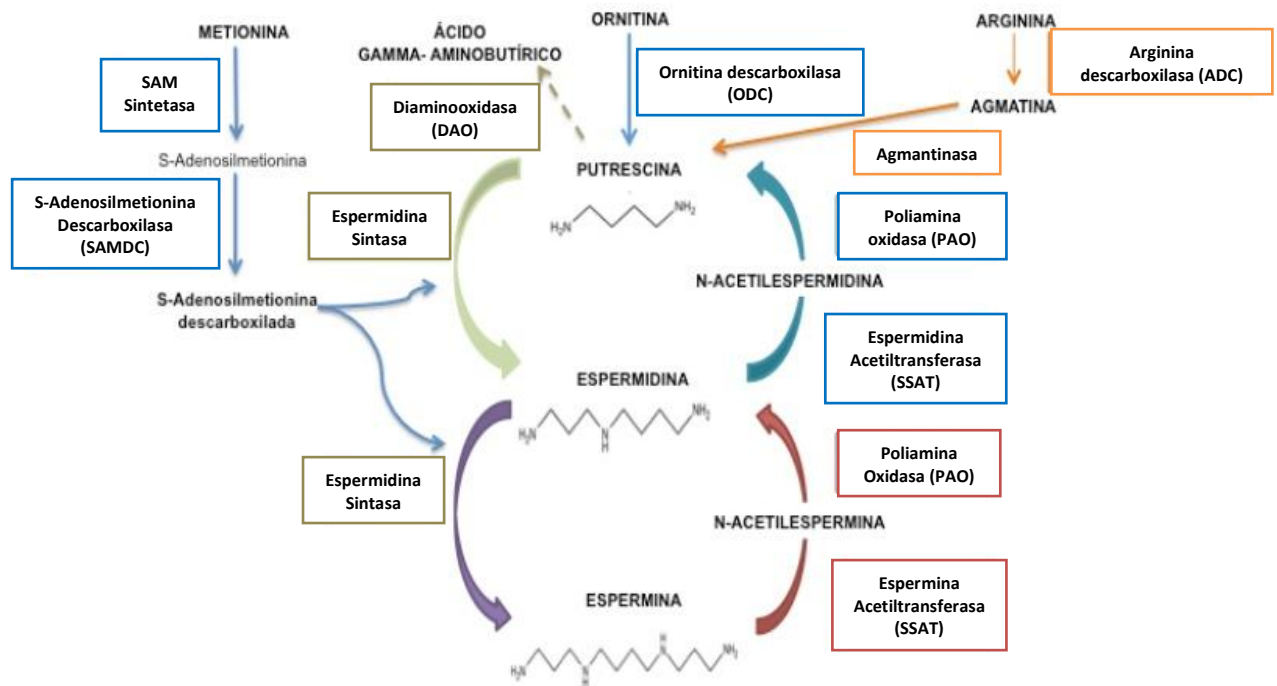


Figura 2: Síntesis e interconversión de poliaminas. La ornitina y la arginina son los principales precursores de las poliaminas, dependiendo de la SAM como agente metilante. Por otro lado, las poliaminas pueden interconvertirse entre ellas mediante reacciones de desacetilación [10].

Por otro lado, aunque las reacciones catalizadas por la SpdS y la SpmS son irreversibles, es posible el paso de espermina a espermidina, y de ésta a putrescina, a través de otra vía [4]. Gracias a la acción de acetil transferasas, en concreto SSAT, se forma N¹-acetilespermina y N¹-acetilespermidina, respectivamente. Posteriormente, la PAO_i produce espermidina o putrescina, liberando un aldehído (acetamidopropanal) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) [4]. Algunos estudios sugieren que la toxicidad derivada de altas concentraciones de poliaminas se debe al estrés oxidativo derivado de la formación de H₂O₂ así como al estrés oxidativo asociado a la interconversión de las poliaminas [3, 4].

La ODC es considerada la enzima limitante de la síntesis de poliaminas. Tiene una vida media corta: de 10 a 24 minutos *in vivo* y de 5 minutos a 8 horas en cultivo celular [1, 3, 4, 7]. Otra enzima limitante de la síntesis de poliaminas es la SAMDC. La actividad de la ODC puede verse modificada como respuesta a múltiples alteraciones celulares. Por ejemplo, la actividad de esta enzima se eleva como respuesta a enfermedades como el cáncer [7]. Debido al metabolismo alterado de las células cancerosas, éstas tienen una mayor concentración de poliaminas que las células normales. También se ha visto que la sobre expresión de la ODC por encima de cierto umbral puede ayudar a la promoción del tumor [10].

Algunos estudios indican que en determinados tipos celulares el agotamiento de las poliaminas inhibe la migración y la proliferación celular, aunque esta situación también puede proteger frente a agentes que inducen apoptosis. Por otro lado, una acumulación excesiva de poliaminas puede inducir apoptosis y transformación celular [1, 3, 4, 6]. Además, se ha observado un aumento significativo de poliaminas y la enzima ODC en la interfase G1/S y durante G2 antes del comienzo de la mitosis. Este hallazgo demuestra que existe una relación entre las poliaminas y la proliferación celular [11, 12].

Existe una fuerte relación entre las poliaminas y el crecimiento del tumor. Esto se debe, por un lado, al efecto estimulante que tienen las poliaminas sobre el crecimiento y la diferenciación, pero además, se ha observado que las poliaminas tienen efecto sobre el sistema inmune, específicamente sobre la concentración de interleucinas 1 (IL-1) y 6 (IL-6), así como sobre la concentración del factor de necrosis tumoral (TNF) [10]. Por ello, se ha valorado la inhibición de poliaminas y de su biosíntesis como una posible vía de tratamiento quimioterápico [10].

Debido a la importancia de las poliaminas en la proliferación celular, se han realizado varios estudios que emplean DFMO para estudiar el papel de dichas moléculas. Esta sustancia inhibe irreversiblemente la conversión de ornitina a putrescina a través de la enzima ODC [6]. Se ha observado que en cultivos "*in vitro*" esta sustancia detiene la proliferación celular, lo cual llevó a estudiar DFMO como posible agente antitumoral, no obteniendo el mismo efecto "*in vivo*" [11].

1.2. Fuentes de poliaminas

Los humanos obtenemos las poliaminas a través de dos fuentes: vía endógena y exógena. La vía endógena la constituye principalmente la biosíntesis de *novo*, pero la cantidad obtenida mediante esta vía es baja (1-2 nmol de poliaminas por hora por gramo de tejido en los órganos más activos) [2]. Las transformaciones entre poliaminas, las secreciones digestivas, las descamaciones y los productos del catabolismo de las células intestinales también forman parte de la vía endógena. Dentro de la vía exógena se encuentran las poliaminas producidas por los microorganismos intestinales y las obtenidas a través de la dieta, la cual es la principal fuente de estas [1, 10, 11].

Desde que nacemos obtenemos poliaminas a través de la leche materna, lo cual es esencial para la maduración del sistema inmunológico y el intestino delgado [10]. La poliamina mayoritaria en los alimentos es la putrescina, aunque la espermina, espermidina y cadaverina también están presentes en cantidades variables [13, 14] (**Tabla 1**). La dieta mediterránea constituye una fuente importante de poliaminas, ya que el aceite de oliva, las frutas, las hortalizas y las carnes rojas tienen un alto contenido de estas [10, 13, 15, 16, 17]. El pescado, el azúcar, los huevos y los lácteos tienen un contenido bajo en poliaminas; no obstante, los productos fermentados como el queso tienen concentraciones muy elevadas [14]. Dentro de las frutas, la naranja y la mandarina son las que más poliaminas contienen. Además, se ha observado que un zumo de naranja natural contiene un 30% más de poliaminas que uno envasado [10]. En cuanto al procesado de los alimentos, se ha observado que la cocción no altera la composición y la concentración de poliaminas de forma significativa, mientras que otros procesos, como la fermentación, sí parece que aumentan la concentración de estas [10].

El consumo diario de poliaminas varía entre países, estando el consumo medio entre 250-550 $\mu\text{mol}/\text{día}$ [2, 13]. No obstante, en Europa el consumo es más elevado, llegando a los 700 $\mu\text{mol}/\text{día}$, mientras que en Japón predomina una dieta pobre en poliaminas [13, 14, 16].

	Putrescina (mg/kg)	Espermidina (mg/kg)	Espermina (mg/kg)
Verduras y legumbres			
Champiñón	4.0	88.6	3.4
Pimiento verde	54.7	11.6	9.0
Soja	17.0 – 41.0	207.0	69.0
Guisante	32.4	49.5	6.5
Guisante (congelado)	46.3	46.6	3.8
Guisante (cocido)	5.7	65.2	52.5
Berenjena	31.7	4.3	0.6
Lechuga	5.6	44	3.2
Brócoli (crudo)	5.6 – 9.0	33.2 – 41.3	8.7 – 9.9
Brócoli (cocido)	5.6	27.3	7.1
Coliflor (cruda)	3.8 – 5.3	24.8 – 31.2	2.4 – 6.1
Coliflor (cocida)	4.0	26.2	6.3
Chucrut	146.0	8.2	-
Cebolleta	24.5	17.0	0.2
Apio	6.1	26.7	-
Garbanzo	2.6	28.8	1.2
Frutas			
Naranja	117.0 – 137.0	1.9 – 8.4	0.2 – 1.6
Mandarina	122.0	2.3	0.4
Mango	80.0	30.0	3.2
Lima	41.0	5.0	1.8
Melón	-	11.7	-
Carne			
Ternera (magra, cruda)	0.5 – 10.1	2.6 – 19.0	27.3 – 39.8
Ternera (carne picada, cruda)	4.0 – 8.9	3.0 – 71.7	20.8 – 46.9
Ternera (cocinada)	2.4	6.3	28.0
Ternera (hígado, crudo)	1.0	6.8	197.0
Cerdo (magro, crudo)	3.0 – 11.0	3.9 – 4.6	28.3
Carne curada	-	5.6	35.7
Pollo (crudo)	0.4 – 2.86	2.9 – 9.3	59.2 – 62.6
Pollo (al horno)	2.0	17.3	44.4
Pollo (hígado)	-	48,7	133
Pato	1.7	8.4	65.3
Pescado			
Bacalao	1.4 – 28.0	0.6 – 1.3	0.6
Bacalao (salado)	4.9	1.5	2.6
Bacalao (huevas)	90.9	13.6	20.0
Vieira	43.0	2.1	10.1
Lácteos			
Queso cheddar (curado)	653	199.5	-
Cereales			
Maíz	50.7	43.2	1.2
Cereales integrales	0.7 – 3.5	13.1 – 24.4	4.5 – 8.1
Salvado de arroz	48.8	51.0	88.8
Arroz (cocido)	1.2	1.5	9.1

Tubérculos			
Patata	9.7 – 17.6	11.2 – 13.5	2.6 – 3.0
Patata (cocida)	3.9 – 21.6	10.9 – 23.5	2.2 – 5.2
Patata (frita)	21.6	23.8	2.6
Boniato	3.7	4.5	0.8
Frutos Secos			
Pistacho	18.2	11.0	13.3
Anacardo	0.8	4.6	24.0
Avellana	4.2	21.0	6.5
Bebidas			
Té negro	15.3	38.1	59.0
Zumo de pomelo	98.6	-	-
Zumo de naranja	85.0	2.5	-

Tabla 1: Contenido en poliaminas de diferentes alimentos. Se muestra el contenido de las principales poliaminas en algunos alimentos, incluyendo principalmente aquellos que más poliaminas contienen [2, 12]. Se expresa la cantidad en mg de poliamina por kg de alimento. Aquellos alimentos en los que se indica un margen de cantidades es debido a que hay diferencias en su contenido en función del estudio consultado. Todos los alimentos son en crudo, salvo aquellos en los que se especifica su preparación.

La concentración intracelular de poliaminas está regulada por la síntesis de *novo*, la degradación, la excreción, el transporte y las fuentes externas, como la dieta [5, 16]. Como el transporte de poliaminas es un proceso saturable, la concentración de estas en el organismo dependerá de estos transportadores, entre otros factores.

Los leucocitos presentan una mayor concentración de poliaminas por célula, pero como los eritrocitos son mayoritarios en sangre, reside en estos el principal grupo de poliaminas circulantes, en los cuales son absorbidas por transportadores de membrana específicos [5]. Las poliaminas en suero se unen a proteínas y lipoproteínas debido a su carga positiva, no obstante, la forma más común de encontrarlas en las células es asociadas con ácidos nucleicos [13].

Para el análisis del contenido en poliaminas de una muestra biológica se pueden emplear múltiples técnicas, pero la más utilizada es la cromatografía líquida de alta presión o HPLC. La muestra biológica más empleada para este análisis es la sangre, ya que el 90% de las poliaminas circulantes se encuentran aquí. La concentración de éstas en los glóbulos rojos está entre 5 - 50 $\mu\text{mol/L}$, siendo mayor esta concentración en personas con diferentes patologías, como el cáncer [5, 13].

Las poliaminas varían su concentración entre distintos fluidos biológicos. En sangre, concretamente en los eritrocitos, se observan aumentos de poliaminas en etapas de crecimiento. Además, en situaciones como el cáncer, aumentan su concentración debido al aumento de la proliferación celular. En orina, en situaciones catabólicas, se ve aumentada su excreción, así como en pacientes con politraumatismos. La presencia en orina de la putrescina se emplea como marcador de proliferación celular, mientras que la espermidina sirve como marcador de muerte celular [13]. Los niveles de poliaminas en suero y orina disminuyen de manera progresiva con la edad, además, se ha observado una disminución de la ODC relacionada también con la edad [5].

1.3. Cáncer de colon

El cáncer colorrectal es uno de los más comunes en el mundo, siendo la cuarta causa de muerte por cáncer en el mundo y la segunda en España. Su incidencia aumenta con la edad, por lo que actualmente se realiza un cribado de la población mayor de 50 años. No obstante, muchos de los pacientes diagnosticados con este tipo de cáncer fallecen en los 5 años posteriores a la cirugía debido a recidivas [18, 19, 20].

La progresión desde un epitelio de colon normal a un carcinoma de colon comienza con la formación de un microadenoma frecuentemente asociado a mutaciones en el gen supresor de tumores APC. Normalmente APC marca β catenina para su degradación. Sin embargo, las mutaciones de APC impiden la marca por lo que β catenina se acumula y promueve la activación de oncogenes como c-myc que a su vez promueven la expresión de genes como COX-2 y ODC que favorece el crecimiento de microadnomas a macroadenomas. Posteriormente, si se ven alterados otros genes, puede aumentar ese microadenoma, convirtiéndose en un adenoma. Si estas mutaciones no se revierten, pueden generar un carcinoma, debido a la pérdida de genes supresores de tumores [19]. Por último, si se pierde el gen supresor de metástasis, se puede generar un carcinoma metastásico (**Figura 3**).

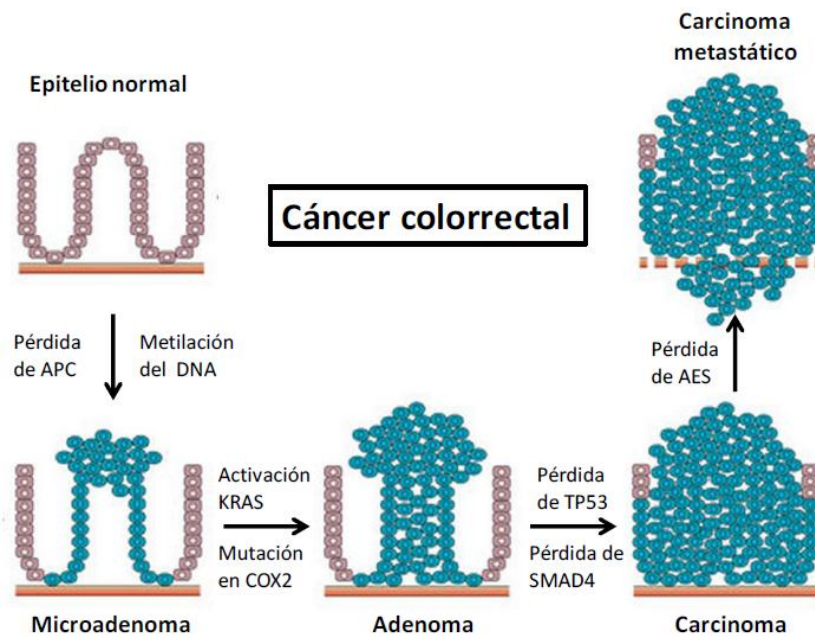


Figura 3: Esquema de la progresión del cáncer de colon [19]. Las transformaciones en el epitelio del colon son debidas muchas veces a mutaciones en el gen APC. Posteriormente se forman adenomas que van aumentando su tamaño debido a otras mutaciones y pérdidas de genes, hasta que finalmente se forma el carcinoma metastático (Tesis doctoral Dr. Diego Sobradillo).

1.4. Homeostasis del calcio intracelular

El calcio es un ion implicado en múltiples procesos fisiológicos, actuando como segundo mensajero. No es metabolizado por las células, sino que se obtiene del medio extracelular o a partir de orgánulos intracelulares como el RE o la mitocondria [20, 21]. Por ello, el estudio de la señalización del calcio se centra en su transporte hacia el citosol. Existe un gran gradiente electroquímico que favorece la entrada de Ca^{2+} al interior celular ya que su concentración extracelular está entre 1 – 2 mM, y la intracelular es cuatro órdenes de magnitud inferior sobre 100 nM [19]. Es importante que este gradiente se mantenga estable para un correcto funcionamiento de los procesos celulares. El transporte de este ión al interior celular se realiza a favor de gradiente mediante proteínas transmembranales llamadas canales, al igual que la salida de este del RE al citosol. Pero el transporte desde el citosol a los orgánulos intracelulares ocurre en contra de gradiente a través de bombas o intercambiadores, de manera que se consume energía en forma de ATP.

Los canales implicados en la regulación de la concentración de calcio citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) son, principalmente, los canales operados por voltaje (VOCs: *Voltage-Operated Ca^{2+} Channels*), canales operados por receptor (ROCs: *Receptor-Operated*

Ca^{2+} Channels), los activados por segundo mensajero (SMOCs: *Second Messenger-Operated Ca^{2+} Channels*) y, finalmente, los canales operados por depósitos (SOCs: *Store-Operated Ca^{2+} Channels*). Existen otros canales situados en los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , como los canales receptores de IP_3 (IP_3R) y los receptores de rianodina (RyR). En la mitocondria existe el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial, que constituye el principal sistema de retirada de este ion del citosol hacia la mitocondria. Entre las bombas destacan la SERCA y la SPCA, ambas ATPasas que introducen Ca^{2+} en los depósitos [18, 19].

1.5. Entrada capacitativa de calcio (SOCE)

La entrada capacitativa de calcio o entrada operada por depósitos (**Figura 4**) supone la principal vía de entrada de calcio a las células no excitables [22]. Esta vía de entrada es activada cuando los depósitos intracelulares de calcio se vacían, principalmente el RE. En experimentos con tapsigargina, un inhibidor de SERCA, se ha observado que el vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} induce la entrada de este ion en la célula [19]. La entrada fisiológica de calcio a las células, o la SOCE fisiológica, se activa tras la salida de calcio a través del receptor IP_3R situado en el RE. Cuando se activan los receptores acoplados a proteínas G, se activa la fosfolipasa C y la síntesis de IP_3 en el interior celular, este se une a su receptor (IP_3R), el cual se abre, dejando salir calcio al citosol. Por otro lado, SERCA está constantemente introduciendo calcio al RE. Cuando las células son tratadas con tapsigargina, esta bloquea SERCA, de manera que impide el paso del calcio del citosol al RE. Mientras, el canal receptor de IP_3 continua abierto, permitiendo la salida de calcio del RE. Como la unión tapsigargina-SERCA es irreversible, cuando transcurre el tiempo de tratamiento con tapsigargina se han vaciado por completo los depósitos lo que activa la entrada capacitativa de calcio o SOCE.

Las principales proteínas implicadas en la activación de SOCE son STIM y ORAI. La disminución de los niveles lumbales de Ca^{2+} es detectado por el sensor STIM1, que se oligomeriza e interactúa con ORAI1. Ante esta situación, el canal ORAI1 se abre, permitiendo la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular al citoplasma [22, 23]. Existen otros canales, los TRPCs, que no son selectivos para Ca^{2+} y también permean Na^+ a la célula. Estos canales también parecen activarse por el vaciamiento de los depósitos de calcio [24].

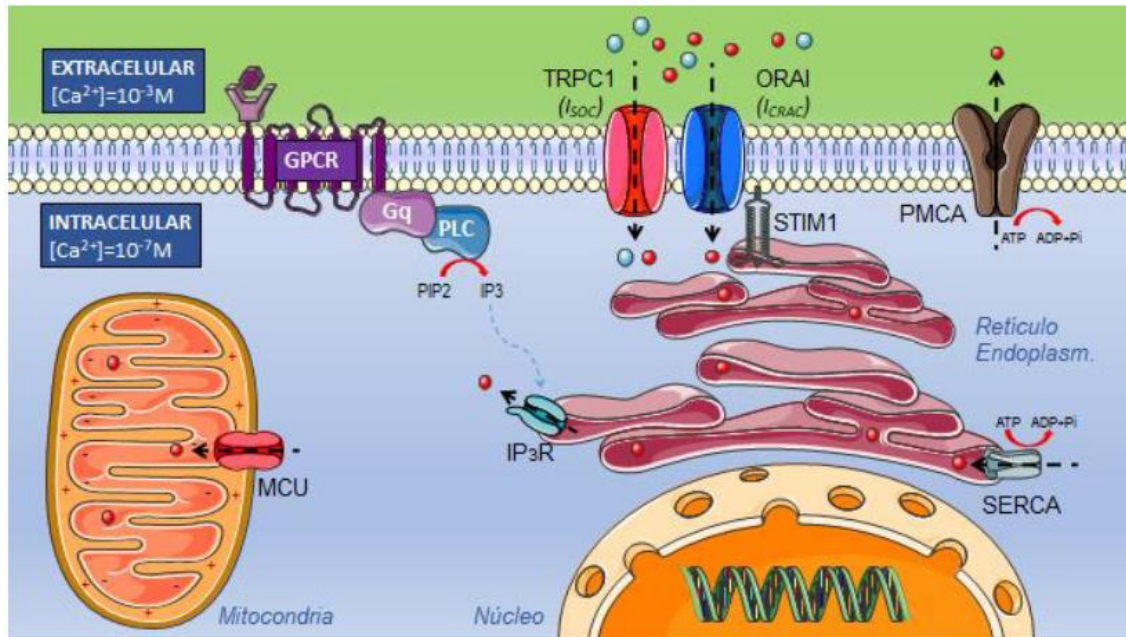


Figura 4: Entrada capacitativa de calcio (o store-operated Ca^{2+} entry, SOCE). La activación de receptores acoplados a proteínas G produce la síntesis de IP_3 que abre el canal asociado del retículo y libera el calcio de los depósitos y el consiguiente descenso de la concentración del calcio en el retículo. Cuando STIM1 detecta una disminución de calcio almacenado en el depósito oligomeriza e interacciona con los canales ORAI1 y/o TRPC1 de la membrana plasmática, lo cual favorece su apertura y entrada de Ca^{2+} al interior celular para el relleno de los depósitos y la activación celular.

1.6. SOCE y cáncer de colon

Se ha descrito en diversos tipos de cáncer un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, la cual promueve la proliferación o migración celular. Estos cambios en la homeostasis del Ca^{2+} podrían contribuir a la fisiopatología del cáncer al afectar a características distintivas del este: resistencia a la apoptosis, división sin límite, evasión de supresores del crecimiento, promoción de la angiogénesis, crecimiento autosuficiente y metástasis [19]. Específicamente se ha observado que en las células de carcinoma de colon humano existe un aumento de la entrada capacitativa de calcio (**Figura 5**). Este remodelado de la entrada de calcio es común en otros tipos de cáncer como el cáncer de mama o próstata. Además, las moléculas implicadas en la entrada capacitativa de calcio se hallan sobreexpresadas en las células tumorales, y el aumento de su expresión en pacientes se correlaciona con un peor pronóstico. Por ejemplo, se ha observado que tanto STIM1 como STIM2 se sobreexpresan en este tipo de tumores respecto al tejido normal de colon. Este aumento se correlaciona con el tamaño del tumor, la invasión y la metástasis de los ganglios linfáticos. El silenciamiento de STIM1 disminuye tanto la

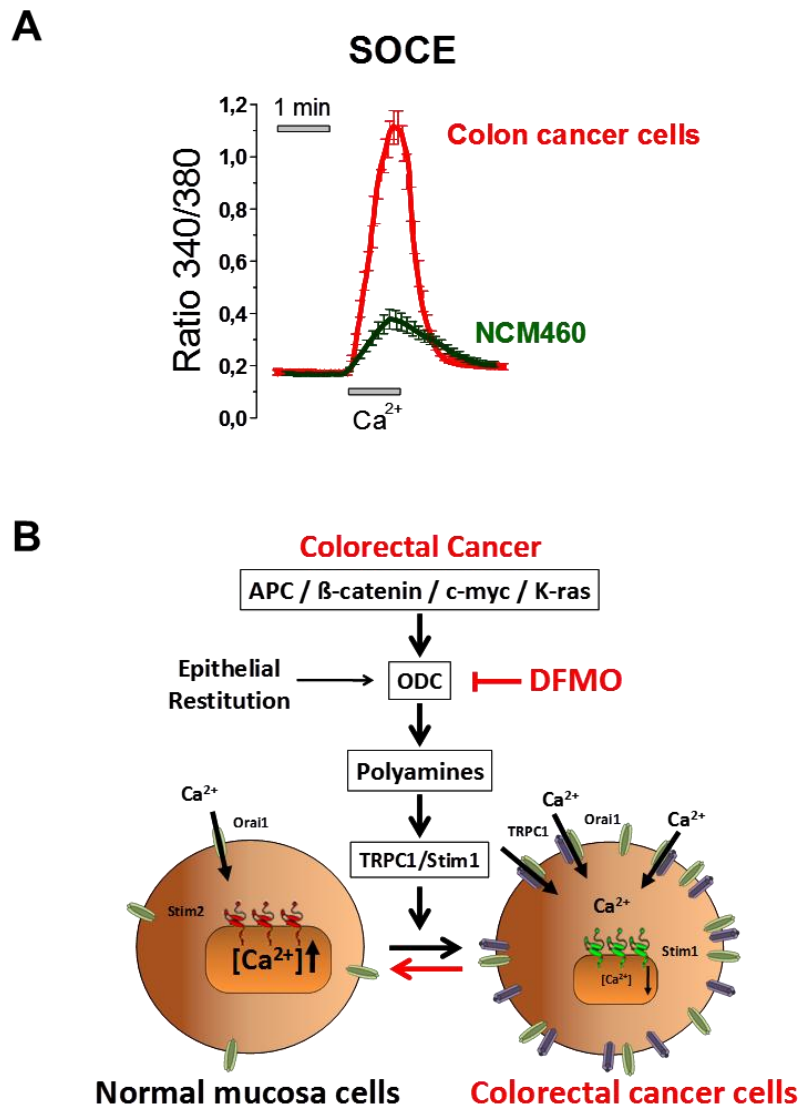


Figura 5: A. Las células de cáncer de colon (HT29) presentan una entrada operada por depósitos mucho mayor que las células normales de colon (NCM460), [22]. **B.** Posible papel de las poliaminas en el remodelado del calcio que ocurre en células de cáncer de colon. [19]

migración como SOCE, mientras que el silenciamiento de STIM2 aumenta su proliferación [21]. Datos recientes indican que la inhibición de la síntesis de poliaminas en células de cáncer de colon producen una reversión del remodelado de la homeostasis del calcio intracelular, lo que indica que los canales de calcio implicados en la entrada capacitativa de calcio podrían ser nuevas dianas en la quimioprevención del cáncer. Además, los datos sugieren que las poliaminas promueven el cambio fenotípico hacia el fenotipo tumoral favoreciendo el remodelado del calcio intracelular. Por tanto, se hace necesario investigar el efecto de las poliaminas sobre la entrada capacitativa de calcio en colonocitos normales humanos y su efecto sobre el crecimiento celular.

2. JUSTIFICACIÓN

Como se ha descrito en la introducción, parece que existe una clara relación entre la concentración de poliaminas en nuestro organismo y la alimentación. Por esta razón, hemos querido estudiar el papel de la putrescina en la proliferación celular y la posibilidad de que los posibles efectos estén mediados por cambios en la homeostasis del calcio intracelular.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es estudiar el papel del calcio intracelular en el crecimiento celular inducido por poliaminas en colonocitos humanos normales (células NCM460). Para ello, nos hemos marcado los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar los efectos de DFMO y putrescina sobre proliferación celular en células NCM460.
- Estudiar los efectos de DFMO y putrescina sobre la entrada capacitativa de calcio (SOCE) en células NCM460.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Cultivo celular

Las células empleadas para este trabajo son la línea celular NCM460. Se trata de células epiteliales de colon humano sano, las cuales han sido descongeladas y cultivadas hasta un máximo de 8 pases.

El cultivo de estas células se ha realizado con medio DMEM, con glucosa 1 g/L, suplementado con 10% de FBS dializado, L-glutamina al 1%, penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 g/ml). Es importante que para hacer este medio se emplee FBS dializado, ya que de esta manera se reduce la cantidad de poliaminas procedentes del medio. Las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera con un 10% de CO₂.

Para subcultivar las células NCM460 se lavan con PBS y se levantan añadiendo tripsina-EDTA durante 3 minutos, a 37 °C. A continuación se centrifugan durante 4 minutos, a 24 °C y 1200 rpm. Se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet con medio DMEM dializado a la concentración necesaria.

4.2. Proliferación celular

Los experimentos de proliferación celular en células NCM460 se realizaron de la siguiente manera: las células NCM460 son cultivadas en placas de 6 pocillos durante 96 h con los diferentes tratamientos. Para analizar la proliferación celular, se emplea el conteo de muestras representativas mediante una cámara de Neubauer, cogiendo una muestra de cada pocillo al principio del experimento y otra al final. Con la siguiente fórmula se calcula la tasa de proliferación a partir de los datos obtenidos en el conteo de las muestras representativas:

$$\text{Tasa de proliferación} = \frac{\text{n}^{\circ}\text{células (T96h)} - \text{número de células (T0h)}}{96h}$$

Existen múltiples métodos para el conteo celular, pero en este caso se ha empleado la cámara de Neubauer. Esta cámara consiste en un portaobjetos con una hendidura en el centro, la cual tiene en el fondo una cuadrícula (**Figura 6**). Esta hendidura se encuentra 0'1 mm por debajo del resto de la superficie de la cámara, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos queda una distancia de 0'1 mm entre esta

hendidura y el cubreobjetos, y el volumen comprendido en este espacio es de $0,1 \text{ mm}^3$, es decir, $0,1 \text{ }\mu\text{l}$. De esta manera, cuando se coloca aquí la muestra, podemos obtener el número de células por ml que tenemos, multiplicando el número de células obtenido en cada cuadrícula L por 10.000.

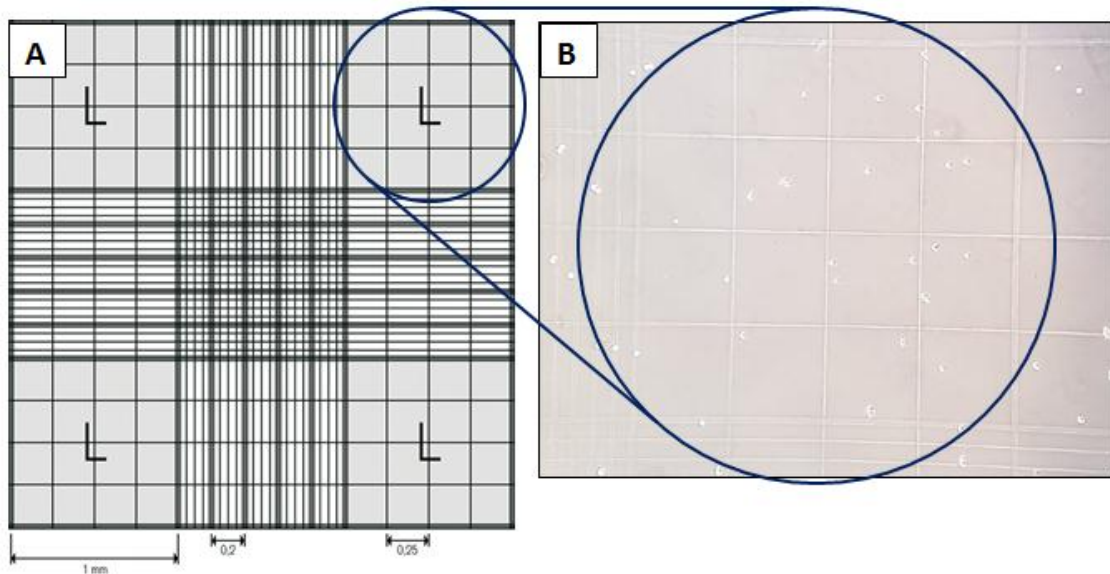


Figura 6: Cuadrícula de una cámara de Neubauer. A) Se trata de un cuadrado de $3 \times 3 \text{ mm}$, con una separación entre cada línea de $0,25 \text{ mm}$. Las zonas marcadas con una L tienen un área de 1 mm^2 , en las cuales se realiza el conteo celular. **B)** Se muestra una de las zonas L. Se observan los 16 cuadrados donde se encuentran las células. Es importante seguir siempre el mismo criterio para contar las células, de manera que además de incluir las que se sitúan en estos cuadrados, también se contarán aquellas que toquen los bordes izquierdo y superior.

Para realizar el experimento se siembran las células NCM460 en dos placas de 6 pocillos (2 ml en cada pocillo), empleando 3 pocillos para cada condición a estudiar. La concentración de células que se sembraron en cada pocillo fue aproximadamente 70.000 células.

Al comenzar el experimento, cuando se siembran las células con los diferentes tratamientos en las placas, se coge una muestra representativa de cada pocillo. A partir de esta muestra obtenemos el número inicial de células por ml que tenemos. Se dejan las placas en el incubador de CO_2 durante 96 h. Transcurrido este tiempo, se retira el medio de los pocillos, se lavan las células con PBS y se levantan con tripsina-EDTA a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 4 minutos. Se añade medio DMEM dializado para frenar la acción de la tripsina. A continuación, se vuelve a coger una muestra representativa de $100 \text{ }\mu\text{l}$ cada pocillo y se cuentan de nuevo las células con la cámara de Neubauer.

4.3. Medida de la concentración de calcio citosólico $[Ca^{2+}]_c$

El estudio de la $[Ca^{2+}]_c$ a tiempo real se ha realizado mediante imagen de fluorescencia empleando fura-2/AM como sonda de calcio intracelular. Este compuesto actúa como indicador fluorescente, y deriva del fura-2, el cual es un quelante de calcio al que se ha unido un grupo acetoximetil éster. El fura-2 no puede atravesar la membrana plasmática al ser una molécula polar altamente cargada. Sin embargo, el fura-2/AM sí puede hacerlo gracias al grupo éster, que es hidrófobo [21]. Cuando el fura-2/AM atraviesa la membrana es de-esterificado por esterasas intracelulares, liberando fura-2 ácido, que es impermeable a la membrana [19, 22].

La unión de fura-2 con el Ca^{2+} hace que aumente la emisión de fluorescencia a 520 nm al excitar con luz de 340 nm, mientras que al excitar con luz de 380 nm, la emisión a 520 nm disminuye (**Figura 7**). Debido a esto se emplea el cociente (ratio) de fluorescencia capturada al excitar a estas dos longitudes de onda, 340 y 380, para medir $[Ca^{2+}]_i$, de manera que el ratio F340/F380 es directamente proporcional a la concentración de calcio intracelular.

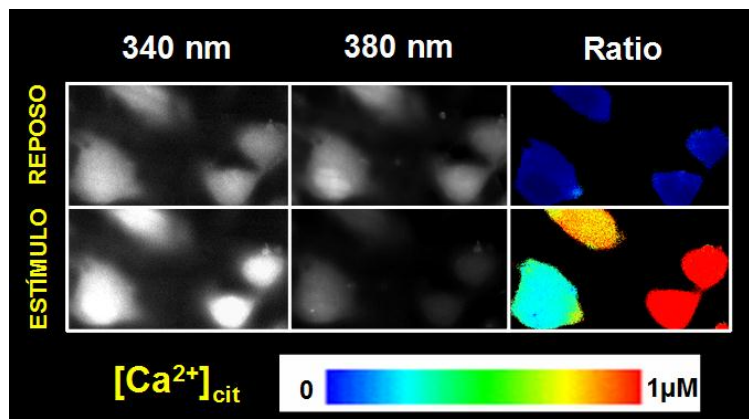


Figura 7: Imágenes de fluorescencia de calcio intracelular. Se trata de células excitadas a 340 y 380 nm, y su cociente (F340/380). En las imágenes superiores se muestran las células en reposo, y en las inferiores tras un estímulo. Se puede observar que a 340 nm la estimulación aumenta la emisión de fluorescencia, mientras que a 380 nm disminuye. Se acompaña de una escala de pseudocolor (ratio de 0 a 1). (Imagen tomada de la Tesis Doctoral de Eva Muñoz Conejero).

Para sembrar las células se emplearon cubreobjetos de cristal de 12 mm de diámetro tratados con poli-L-lisina (0,01 mg/ml). Las células se sembraron en forma de gota a una concentración de 5.000 células/ml. Tras 1 hora, cuando las células se han adherido al cubreobjetos, se añade a cada pocillo medio de cultivo (500 μ l), con o sin

putrescina y DFMO, según corresponda en cada caso. Se dejan las placas en el incubador de CO₂ hasta que se realice el experimento de imagen a las 96 horas. Para realizar el experimento se seleccionan 2 o 3 cubreobjetos de cada condición. Se lava el cubreobjetos en MEC Ca1, cuya composición es la siguiente: NaCl (145mM), KCl (5mM), MgCl₂ (1mM), CaCl₂ (1mM), HEPES/NaOH, glucosa (10mM), pH 7,42. Se incuban durante 1 hora en MEC Ca1 con fura-2/AM 4 μM, todo ello a temperatura ambiente y en oscuridad (evitando así el foto-apagamiento). A continuación, se lava de nuevo el cristal en MEC Ca0, cuya composición es la misma que la del MEC Ca1, pero sustituyendo el calcio por EGTA 0'5M en TRIS-HCL. Se deja incubando durante 10 minutos en MEC Ca0 con tapsigargina 1μM, también en oscuridad y a temperatura ambiente. La tapsigargina es un inhibidor de la bomba SERCA. Al añadirla a las células lo que se consigue es que se vacíen los depósitos de Ca²⁺ del retículo endoplásmico (RE) y se active SOCE [18].

Una vez incubadas las células con tapsigargina, se colocan los cubreobjetos en la platina termostatizada a 37 °C del microscopio de fluorescencia invertido. Durante el experimento las células son perfundidas continuamente con MEC Ca0 o MEC Ca1, siguiendo siempre el mismo protocolo (**Tabla 2**).

TIEMPO	PERFUSIÓN
0'	MEC Ca0
1'	MEC Ca1
3'	MEC Ca0
6' 30''	Fin

Tabla 2: Protocolo seguido durante el experimento de imagen. En la tabla se muestra el tiempo de duración total (6' 30''), así como los medios empleados durante el mismo, el minuto en que son administrados y durante cuánto tiempo.

Durante el experimento se realiza un registro continuo de la concentración de Ca²⁺ citosólico de todas las células presentes en la imagen, mediante el programa AquaCosmos 2.6. Posteriormente se analiza ese registro con el programa Origin 7.0.

4.4. Análisis estadístico

Los datos de analizados para obtener los resultados de los ensayos de proliferación proceden de 5 experimentos independientes; los resultados de SOCE fueron obtenidos analizando 3 experimentos independientes. Los resultados mostrados se han obtenido al hacer la media $(\bar{X}) \pm EEM$. Cuando se comparan dos medias se ha empleado la t de Student para muestras no pareadas. Para comparar datos procedentes de dos o más grupos se ha empleado el análisis de la varianza ANOVA de dos factores. Se consideraron significativas aquellas diferencias en las que $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

La putrescina aumenta la proliferacion de las células NCM460

Para el estudio del efecto proliferativo de la putrescina se cultivaron las células NCM460 en presencia o ausencia (control) de putrescina durante 96 h. Así mismo, se estudió el efecto del DFMO sobre la proliferación de las células NCM460. El DFMO inhibe la enzima que controla la síntesis de putrescina. Por tanto, con este tratamiento se estaría eliminando la putrescina endógena producida normalmente por las células. De la misma manera, si se tratan las células con DFMO y con putrescina añadida podemos demostrar que su efecto está relacionado.

Se emplea putrescina 100 μM y DFMO 500 μM , mismas concentraciones empleadas para el experimento de calcio. En la **figura 8** se muestra que la putrescina aumenta la proliferación de células NCM460 de colon y cómo el DFMO la inhibe. La combinación de putrescina y DFMO no modifica la proliferación. Estos resultados demuestran que DFMO inhibe la proliferación de las células NCM460 y que este efecto es debido a la inhibición de la síntesis de poliaminas.

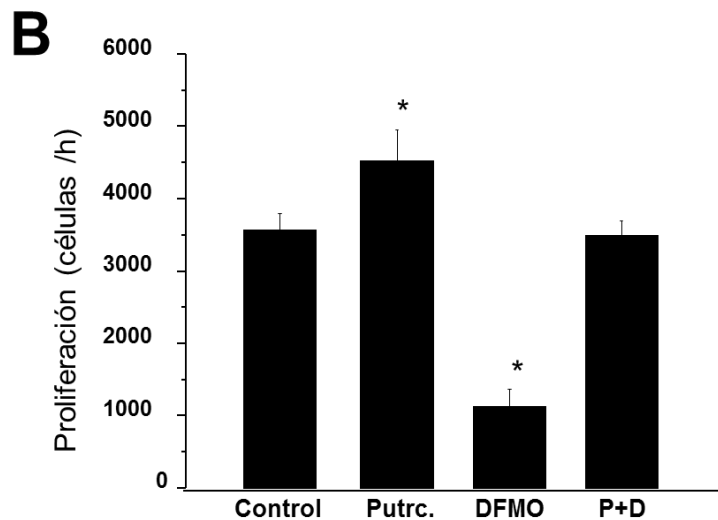
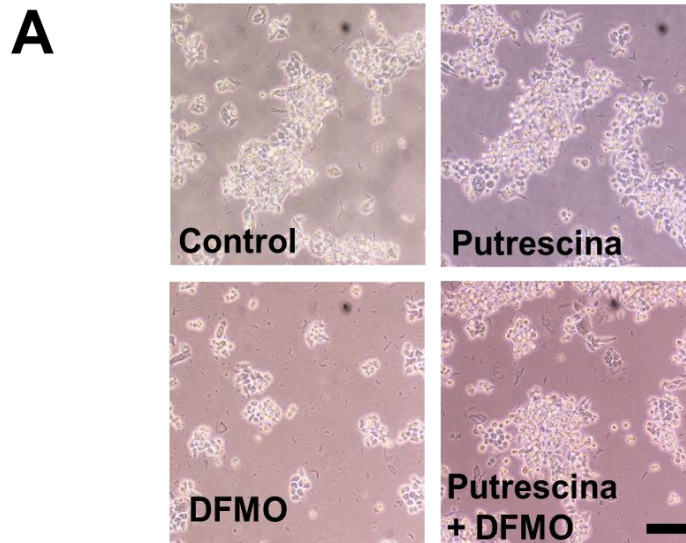


Figura 8: Efecto de la putrescina, DFMO y la combinación de ambas sobre la proliferación de las células NCM460. Se muestra el efecto de la putrescina (100 μ M), el DFMO (500 μ M) y la combinación de ambas, putrescina (100 μ M) + DFMO (500 μ M), sobre la proliferación en células NCM460 medida en células/hora (ver apartado Material y métodos) durante 96 h de tratamiento. **A.** Imágenes capturada con un objetivo 20x. Se observa el efecto anti-proliferativo del DFMO, así como el efecto proliferativo de la putrescina, respecto al control. El experimento mostrado en estas figuras es un experimento representativo de todos los realizados (n=5). Se acompaña de una barra negra que indica la escala: 100 μ m. **B.** Cada barra muestra el promedio de la proliferación celular (células/hora) expresada como la media (\bar{X}) \pm EEM de n=3. La tasa de proliferación de las células tratadas con putrescina fue significativamente mayor respecto al control ($p < 0.05$)*; mientras que la tasa de proliferación de las células tratadas con DFMO fue significativamente menor respecto al control ($p < 0.05$)*. Cuando se combinó la putrescina con el DFMO la proliferación de estas células fue igual que el control.

Efecto de la putrescina y del DFMO sobre la entrada de calcio operada por depósitos (SOCE)

Para estudiar la entrada de calcio dependiente de depósitos se han realizado experimentos de imagen de fluorescencia con la sonda fura-2. Como lo que se busca es activar SOCE y así poder estudiar el efecto de la putrescina y el DFMO, es necesario vaciar los depósitos de Ca^{2+} del RE. Para ello se emplea tapsigargina, que inhibe de forma irreversible la bomba SERCA; de esta manera se vacían los depósitos de forma pasiva [20, 21]. Se realizaron experimentos en ausencia (control), presencia o combinación de putrescina 100 μM y DFMO 500 μM , durante 96 h. Se mide la respuesta de las células a la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular. Como se ve en las **figuras 9 y 10**, la putrescina potencia SOCE, mientras que el DFMO la inhibe. El efecto inhibitorio de DFMO se anula en presencia de putrescina. Se realizaron un total de 3 experimentos de imagen, de los cuales se seleccionó uno como representativo, que es el que se muestra representado en las **figuras 9 y 10**. El análisis se realizó en célula única, como se puede observar en las gráficas.

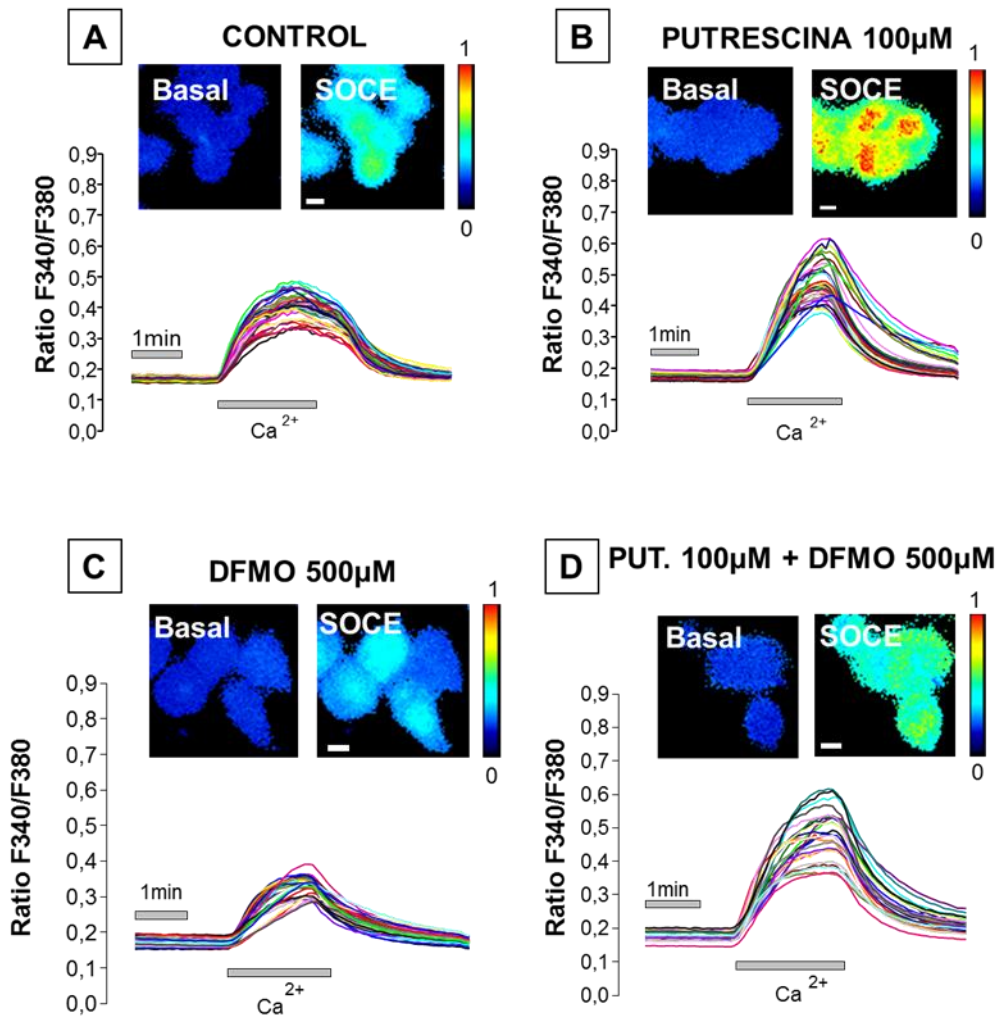


Figura 9: Efecto de la putrescina, DFMO y la combinación de ambas sobre la entrada capacitativa de calcio (SOCE) en células NCM460. La respuesta de las células al estímulo de calcio se mide mediante el ratio F340/F380, que es directamente proporcional a la $[Ca^{2+}]_C$ en el tiempo. En las gráficas se indica en qué momento se exponen las células al medio con calcio (MEC Ca1). Se reflejan en las gráficas todas las células analizadas (célula única). Las imágenes situadas en la parte superior de cada gráfica muestran las células en reposo y durante el estímulo de calcio, en el cual se activa SOCE. Junto con las imágenes se muestra una escala de pseudocolor (valores de ratio 0 a 1) y una barra blanca de calibración (corresponde a 10 μ m). **A.** Esta gráfica muestra la entrada capacitativa en las células control, sin tratamiento. **B.** Aquí se muestra SOCE de las células tratadas con putrescina 100 μ M (96h). Como se observa, el pico es más elevado que el de las células control. **C.** Cuando se tratan las células con DFMO 500 μ M (96h) la respuesta celular es la representada en la gráfica. SOCE en estas células es menor que en las células control. **D.** Cuando combinamos putrescina 100 μ M y DFMO 500 μ M (96h) la respuesta de las células es la observada en esta gráfica. Se trata de un experimento representativo de tres. Se han analizado en total 840 células individuales, específicamente en el experimento que se muestra se representan 35 células en control, 46 células en putrescina, 31 células en DFMO y 27 células en putrescina + DFMO.

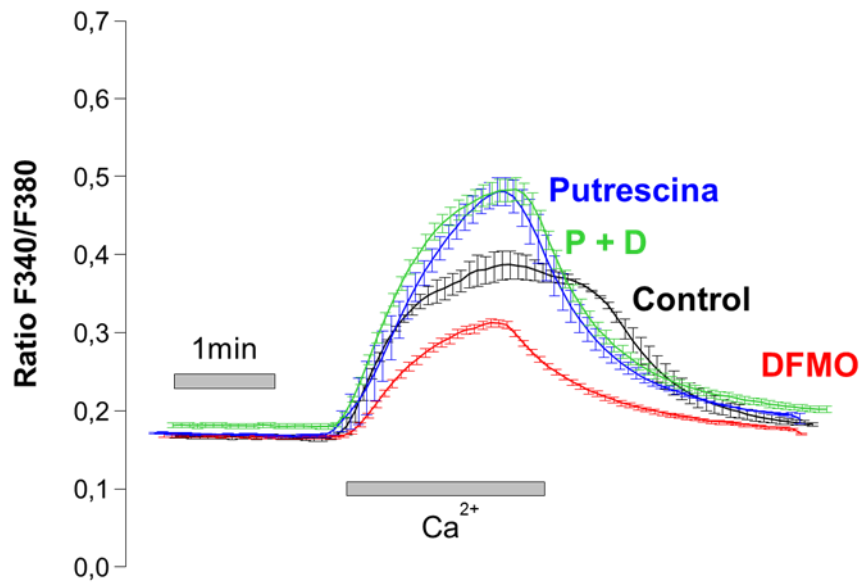


Figura 10: Comparación del efecto de la putrescina, DFMO y la combinación de ambas sobre la entrada capacitativa de calcio (SOCE) en células NCM460. En esta gráfica se representa el mismo experimento representativo que en la figura 9, pero en este caso haciendo la media (\bar{X}) \pm EEM de todas las células, diferenciando en función del tratamiento. Se han superpuesto todas las líneas de la gráfica haciendo coincidir el pico de calcio.

6. DISCUSIÓN

Las poliaminas son consideradas factores de crecimiento durante el desarrollo embrionario y parecen tener un papel fundamental en el ser vivo adulto en la reparación del tejido epitelial. Para ello, el daño epitelial promueve su síntesis transitoriamente lo que favorece un cambio fenotípico. De una célula quiescente se pasa a una célula con capacidad para migrar y proliferar para la restauración del epitelio dañado. Este efecto parece estar mediado por cambios en la concentración de calcio citosólico. Sin embargo, la producción excesiva de poliaminas para alimentar el crecimiento tumoral. De hecho, las células tumorales presentan una sobreexpresión de la enzima ODC, el paso limitante en la síntesis de poliaminas. Así las mismas poliaminas que parecen contribuir a la reparación tisular, promueven el crecimiento tumoral. Los mecanismos no son bien conocidos pero se ha propuesto un papel para el calcio intracelular. Nuestros resultados indican que DFMO, un inhibidor suicida de ODC, inhibe la proliferación celular y la entrada capacitativa. Además, la poliaminas putrescina, revierte los efectos de DFMO tanto a nivel proliferativo como a nivel de entrada capacitativa de calcio. Es más, la putrescina por si misma promueve el aumento de la entrada capacitativa de calcio y de la proliferación celular de una línea bien caracterizada de colonocitos humanos normales. Estos datos indican que la entrada capacitativa de calcio está implicada en los efectos pro-proliferativos de putrescina y que los canales implicados podrían ser una nueva diana en quimioprevención del cáncer colorrectal. Además, los resultados invitan la especulación de si una dieta rica en poliaminas podría favorecer el crecimiento de tumores colorrectales. Nuevos estudios deberían informar sobre esta posibilidad, aunque cualquier estudio deberá tener en cuenta el origen endógeno y exógeno de las poliaminas en el tracto gastrointestinal.

7. CONCLUSIONES

La putrescina inhibe la proliferación de las células epiteliales de colon (NCM460), mientras que DFMO tiene el efecto contrario, comportándose como una sustancia anti-proliferativa.

El efecto de la putrescina sobre la entrada capacitativa de calcio (SOCE) de estas células es un aumento de dicha entrada. Por el contrario, el efecto observado cuando se añade DFMO es una inhibición de esa entrada.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Battaglia V, DeStefano Shields C, Murray-Stewart T, Casero RA Jr. Polyamine catabolism in carcinogenesis: potential targets for chemotherapy and chemoprevention. *Amino Acids*. 2014; 46 (3): 511 – 519.
2. Atiya Ali M, Poortvliet E, Strömberg R, Yngve A. Polyamines in foods: development of a food database. *Food Nutr Res*. 2011; 55: 424 – 429.
3. Bae DH, Lane DJR, Jansson PJ, Richardson DR. The old and new biochemistry of polyamines. *Biochim Biophys Acta*. 2018; 1862 (9): 2053 – 2068.
4. Moinard C, Cynober L, de Bandt JP. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. 2005; 24 (2): 184 – 197.
5. Gugliucci A. Polyamines as clinical laboratory tools. *Clin Chim Acta*. 2004; 344 (1-2): 23 – 35.
6. Yuan Q, Ray RM, Johnson LR. Polyamine depletion prevents camptothecin-induced apoptosis by inhibiting the release of cytochrome c. *Am. J. Physiol*. 2002; 282 (6): 1290 – 1297.
7. Miller-Fleming L, Olin-Sandoval, V, Campbell, K, and Ralser, M. Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *J. Mol. Biol*. 2015; 427 (21): 3389 – 3406.
8. Mandal S, Mandal A, Johansson HE, Orjalo AV, Park MH. Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013; 110 (6); 2169 – 2174.
9. Robert A, Casero Jr, Anthony E. Pegg. Polyamine catabolism and disease. *Biochem. J*. 2009; 421 (3): 323 – 338.
10. Guasco HC, Chávez SJL, Ferriz MRA, de la Torre CK, Elton PE, García GT. Poliaminas: pequeños gigantes de la regulación metabólica. *Rev. educ. bioquím*. 2014; 33 (2): 51 – 57.
11. Algranati ID, Serra MP, Carrillo C, González NS. Biología molecular del metabolismo de poliaminas en parásitos tripanosomátidos. Expresión de genes heterólogos de ornitina y arginina descarboxilasa en *Trypanosoma cruzi*. *Química Viva*. 2005; 2: 78 – 94.
12. Handa AK, Fatima T, Mattoo AK. Polyamines: Bio-Molecules with Diverse Functions in Plant and Human Health and Disease. *Front Chem*. 2018; 6: 10.

13. Zoumas-Morse C, Rock CL, Quintana EL, Neuhaus ML, Gerner EW, Meyskens FL Jr. Development of a Polyamine Database for Assessing Dietary Intake. *J Am Diet Assoc.* 2007; 107 (6): 1024 – 1027.
14. PNT Binh, K Soda, M Kawakami. Mediterranean diet and polyamine intake: possible contribution of increased polyamine intake to inhibition of age-associated disease. *Nutr Diet Suppl.* 2011; 3: 1 – 7.
15. Knut A Eliassen, Ragnhild Reistad, Unni Risøen, Helle F.Rønning. Dietary polyamines. *Food Chem.* 2002; 78 (3): 273 – 280.
16. Nishibori N, Fujihara S, Akatuki T. Amounts of polyamines in foods in Japan and intake by Japanese. *Food Chem.* 2007; 100 (2): 491 – 497.
17. Kalač P. Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005–mid 2013. *Food Chem.* 2014; 161: 27 – 39.
18. Villalobos, C.; Sobradillo, D.; Hernández-Morales, M.; Núñez, L. Remodeling of calcium entry pathways in cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016, 898, 449–466
19. González LG, Hernández-Morales M, Núñez L, Villalobos C. Inhibition of polyamine biosynthesis reverses Ca^{2+} channel remodeling in colon cancer cells. *Cancers.* 2019; 11 (1).
20. Villalobos C, Sobradillo D, Hernández-Morales M, Núñez L. Calcium remodeling in colorectal cancer. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2017; 1864: 843–849.
21. Lewis RS. Store-operated calcium channels. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 2011; 3 (12).
22. Sobradillo D, Hernández-Morales M, Ubierna D, Moyer M.P, Núñez L, Villalobos C. A reciprocal shift in transient receptor potential channel 1 (TRPC1) and stromal interaction molecule 2 (STIM2) contributes to Ca^{2+} remodeling and cancer hallmarks in colorectal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 2014; 289: 28765 – 28782.
23. Villalobos C, Hernández-Morales M, Gutiérrez LG, Núñez L. TRPC1 and ORAI1 channels in colon cancer. *Cell Calcium.* 2019; 81: 59 – 66.
24. Muñoz E, Valero RA, Quintana A, Hoth M, Núñez L, Villalobos C. Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit vascular smooth muscle cell proliferation by enabling the Ca^{2+} -dependent inactivation of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} /Orai channels normally prevented by mitochondria. *J. Biol. Chem.* 2011; 286: 16186–16196