



Universidad de Valladolid

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA**

TESIS DOCTORAL:

**ESTUDIO DEL REMODELADO IÓNICO EN
CÁNCER DE COLON MEDIANTE LA
TRANSFERENCIA MITOCONDRIAL Y LA
INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE
POLIAMINAS**

Presentada por Verónica Feijóo Salgado para
optar al grado de
Doctor/a por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Dr. Carlos Villalobos Jorge
Dr. Sendoa Tajada Esteban

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES EN CONGRESOS

Parte del material incluido en esta tesis doctoral ha sido publicado en el artículo:

Pérez-Riesgo E, Hernando-Pérez E, **Feijóo V**, Tajada S, Núñez L, Villalobos C. Transcriptional Basis of Ca²⁺ Remodeling Reversal Induced by Polyamine Synthesis Inhibition in Colorectal Cancer Cells. *Cancers*. 2023; 15(5):1600. <https://doi.org/10.3390/cancers15051600>

O ha sido enviado para publicar en:

Feijóo V, Tajada S, Núñez L, Villalobos C. Transfer of normal mitochondria to cancer cells reverses Ca²⁺ remodelling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research* (enviado).

También se ha presentado en forma de comunicación en los siguientes congresos:

- **Verónica Feijóo**, Sendoa Tajada, Lucía Núñez, Carlos Villalobos. Transfer of normal mitochondria to cancer cells reverses Ca²⁺ remodelling. 10th European Calcium Society Workshop 2023, The Ca²⁺ signaling toolkit in cell function, health and disease. Comunicación oral. Lovaina, Bélgica. Noviembre 2023.
- **Verónica Feijóo**, Sendoa Tajada, Lucía Núñez, Carlos Villalobos. Mitoception, the transfer of mitochondria from normal colonic cells to colon cancer cells, reverses remodelling of store-operated channels. VIII Congreso de la Red Española de Canales Iónicos (VIII RECI): P20. Alicante, España. Mayo 2022. P20.
- **Verónica Feijóo**, Sendoa Tajada, Carlos Villalobos, Lucía Núñez. Transfer of mitochondria from normal colon cells to colon cancer cells reverses remodelling of store-operated channels in colon cancer cells. XL Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (XL SECF): P1-19. Badajoz, España. Septiembre 2022.

FINANCIACIÓN

Este proyecto de tesis se ha desarrollado gracias a una ayuda destinada a la Financiación de Contratos Predoctorales de Personal Investigador de la Junta de Castilla y León, cofinanciadas por el Fondo Social Europeo al amparo de la Orden EDU/1100/2017 de 18 de diciembre de 2017 de la Consejería de Educación.

Este trabajo también se ha llevado a cabo gracias a los proyectos RTI2018-099298-B-100 del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y BFU2015-70131-R del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN.....	15
1. EL CÁNCER COLORRECTAL.....	17
1.1. Aspectos generales del cáncer colorrectal.....	17
1.2. Desarrollo del cáncer colorrectal.....	20
1.3. Prevención y tratamiento del cáncer colorrectal.....	22
2. HOMEOSTASIS DEL CALCIO INTRACELULAR.....	24
2.1. Funciones del Ca^{2+} dentro de la célula.....	24
2.2. Sistemas de transporte de Ca^{2+}	26
2.3. Entrada de Ca^{2+} operada por depósitos.....	42
2.4. Entrada de Ca^{2+} mediada por el canal <i>Orai1</i> independiente de depósitos.....	54
3. REMODELADO DEL CALCIO INTRACELULAR EN CÁNCER DE COLON.....	57
3.1. Remodelado de SOCE en cáncer colorrectal.....	57
3.2. Control mitocondrial de SOCE en cáncer.....	59
3.3. Remodelado de otros sistemas de transporte en CCR.....	61
4. POLIAMINAS EN CÁNCER DE COLON.....	62
5. HOMEOSTASIS DEL POTASIO EN CÁNCER.....	67
5.1. Alteración iónica del K^+ en cáncer.....	68
5.2. Canales <i>hERG1</i> y <i>hEAG1</i> en cáncer.....	69
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	73
MATERIALES Y MÉTODOS.....	77
1. CULTIVOS CELULARES.....	79
2. MEDIDA DE CALCIO CITOSÓLICO.....	80
3. MITOCEPCIÓN O TRANSFERENCIA DE MITOCONDRIAS.....	83
3.1. Marcaje mitocondrial.....	84
3.2. Aislamiento de mitocondrias.....	84
3.3. Transferencia mitocondrial o mitocepción.....	86
4. VALIDACIÓN DE LA MITOCEPCIÓN.....	87
4.1. Citometría de flujo.....	88
4.2. Microscopía confocal.....	88
5. ESTUDIO DEL POTENCIAL MITOCONDRIAL.....	89
6. EDICIÓN GÉNICA DE TRPC1 EN CÉLULAS HT29 MEDIANTE CRISPR/CAS9.....	90
6.1. Diseño y síntesis de los ARN guía.....	92
6.2. Diseño del plásmido donante.....	94
6.3. Transfección de las células HT29.....	94

6.4.	<i>Selección de clones editados.</i>	95
6.5.	<i>Análisis de los clones.</i>	96
7.	EXTRACCIÓN DE ADN Y PCR	97
8.	EXTRACCIÓN DE ARN Y RT-QPCR	99
9.	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y <i>WESTERN BLOTTING</i> .	102
10.	INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE TRPC1.	104
11.	ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR UTILIZANDO EDU	104
12.	SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE SIRNA	106
13.	MEDIDA DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE POLIAMINAS.	108
14.	REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS MEDIANTE <i>PATCH-CLAMP</i> PLANAR.	109
15.	ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE GENES.	111
16.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	112
	RESULTADOS	113
1.	LA TRANSFERENCIA DE MITOCONDRIAS MODULA LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO INTRACELULAR.	115
1.1.	<i>Las células tumorales HT29 pueden ser mitoceptadas con mitocondrias aisladas de células normales NCM460.</i>	115
1.2.	<i>La mitocepción de células tumorales HT29 con mitocondrias de células normales reduce SOCE.</i>	120
1.3.	<i>El efecto sobre SOCE de la mitocepción de mitocondrias normales en células tumorales es transitorio: permanece tras 48 horas, pero se pierde 7 días después de la mitocepción.</i>	124
1.4.	<i>La mitocepción con mitocondrias aisladas de células tumorales tiene efecto sobre SOCE en células tumorales HT29, pero no en células normales NCM460.</i>	127
1.5.	<i>El potencial mitocondrial es diferente en las células tumorales mitoceptadas.</i>	133
2.	ESTUDIO DEL REMODELADO DEL Ca^{2+} INTRACELULAR EN CÉLULAS HT29 MEDIADO POR EL CANAL TRPC1.	135
2.1.	<i>Eliminación del canal TRPC1 mediante edición génica en células HT29.</i>	135
2.2.	<i>Inhibición farmacológica del canal TRPC1 en células HT29 y NCM460.</i>	140
3.	ESTUDIO DEL REMODELADO DE SOCE EN CÁNCER DE COLON RELACIONADO CON LA SÍNTESIS DE POLIAMINAS.	146
3.1.	<i>La inhibición de la síntesis de poliaminas con DFMO revierte la expresión de genes relacionados con el transporte de Ca^{2+} en células HT29.</i>	146
3.2.	<i>El silenciamiento de TRPV6 aumenta SOCE en las células tumorales HT29.</i>	149
3.3.	<i>El silenciamiento de SPCA2 disminuye el tamaño de los depósitos y aumenta SOCE en las células tumorales HT29.</i>	152
3.4.	<i>La inhibición de la síntesis de poliaminas con DFMO en células SW480 revierte la expresión de genes relacionados con el transporte de Ca^{2+}.</i>	154

4. REMODELADO DE LOS CANALES DE POTASIO EN EL CÁNCER COLORRECTAL Y REVERSIÓN POR INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE POLIAMINAS.	159
4.1. <i>Las células tumorales HT29 muestran menores corrientes totales de K⁺ aunque mayor cantidad de corrientes "tumorales" que las células normales NCM460.</i>	159
4.2. <i>La inhibición de la síntesis de poliaminas aumenta las corrientes de K⁺ en células HT29.</i>	161
4.3. <i>Expresión diferencial de canales de K⁺ en las células tumorales HT29 en comparación con las células normales NCM460.</i>	163
DISCUSIÓN.....	171
CONCLUSIONES.....	191
REFERENCIAS.....	195

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_{cit}	Concentración de Ca ²⁺ en el citoplasma.
[Ca²⁺]_{ext}	Concentración de Ca ²⁺ extracelular.
[Ca²⁺]_{mit}	Concentración de Ca ²⁺ en la mitocondria.
[Ca²⁺]_{RE}	Concentración de Ca ²⁺ en el retículo.
ΔΨ_m	Potencial de membrana mitocondrial.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AG	Aparato de Golgi.
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i> .
ARN	Ácido ribonucleico.
CCR	Cáncer colorrectal.
CICR	Liberación de Ca ²⁺ inducida por Ca ²⁺ , del inglés <i>Ca²⁺-induced Ca²⁺ release</i> .
CIMP	Metilación de islas CpG, del inglés <i>CpG island methylation pathway</i> .
CPA	Ácido ciclopiazónico, del inglés <i>ciclopiazonic acid</i> .
CRAC	Canal activado por liberación de Ca ²⁺ , del inglés <i>Ca²⁺ release-activated channel</i> .
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> .
DFMO	Difluorometilornitina.
EAG	<i>Ether-à-go-go</i> .
EEM	Error estándar de la media.
EIM	Espacio intermembrana.
EMRE	Regulador esencial de MCU, del inglés <i>essential MCU regulator</i> .
ERG	<i>Ether-à-go-go related gene</i> .
FBS	Suero fetal bovino, del inglés <i>fetal bovine serum</i> .
gRNA	ARN guía.
HCX	Intercambiador H ⁺ /Ca ²⁺ .
HDR	Reparación por homología directa, del inglés <i>homology-directed repair</i> .
HZ	Heterocigoto.
IC	Intervalo de confianza.
I_{CRAC}	Corriente de Ca ²⁺ activada por la liberación de Ca ²⁺ , del inglés <i>Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current</i> .
IP₃	Inositol trifosfato, del inglés <i>inositol 1,4,5-triphosphate</i> .
IP₃R	Receptor de inositol trifosfato, del inglés <i>inositol triphosphate receptor</i> .
I_{SOC}	Corriente de Ca ²⁺ operada por depósitos, del inglés <i>store-operated Ca²⁺ current</i> .
KO	<i>Knock-out</i> .
MCU	Uniportador de Ca ²⁺ mitocondrial, del inglés <i>mitochondrial Ca²⁺ uniporter</i> .
MCUR	Regulador de MCU, del inglés <i>MCU regulator</i> .
MEC Ca0	Medio externo completo sin Ca ²⁺ .
MEC Ca1	Medio externo completo con Ca ²⁺ .
MICU	<i>Mitochondrial Ca²⁺ uptake</i> .
min	Minutos.
MME	Membrana mitocondrial externa.
MMI	Membrana mitocondrial interna.

MP	Membrana plasmática.
mPTP	Poros de permeabilidad transitoria mitocondrial, del inglés <i>mitochondrial permeability transition pore</i> .
MSI	Inestabilidad de microsatélites, del inglés <i>microsatellite instability</i> .
NCKX	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ /K ⁺ .
NCLX	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ /Li ⁺ .
NCX	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ .
ODC	Ornitina descarboxilasa.
PBS	Tampón fosfato salino, del inglés <i>phosphate buffered saline</i> .
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>polymerase chain reaction</i> .
PMCA	ATPasa de Ca ²⁺ de la membrana plasmática, del inglés <i>plasma membrane Ca²⁺ ATPase</i> .
qPCR	PCR cuantitativa, del inglés <i>quantitative PCR</i> .
RE	Retículo endoplásmico.
ROS	Especies reactivas de oxígeno, del inglés <i>reactive oxygen species</i> .
ROCC	Canal de Ca ²⁺ operado por receptor, del inglés <i>receptor-operated Ca²⁺ channel</i> .
RyR	Receptor de rianodina, del inglés <i>Ryanodine receptor</i> .
SERCA	ATPasa de Ca ²⁺ del retículo sarcoendoplásmico, del inglés <i>sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase</i> .
SICE	Entrada de Ca ²⁺ independiente de depósitos, del inglés <i>store-independent Ca²⁺ entry</i> .
siRNA	ARN pequeño de interferencia, del inglés <i>small interfering RNA</i> .
SMOCC	Canal de Ca ²⁺ operado por segundos mensajeros, del inglés <i>second Messenger-operated Ca²⁺ channel</i> .
SOCC	Canal de Ca ²⁺ operado por depósitos, del inglés <i>store-operated Ca²⁺ channel</i> .
SOCE	Entrada de Ca ²⁺ operada por depósitos, del inglés <i>store-operated Ca²⁺ entry</i> .
SPCA	ATPasa de Ca ²⁺ de la vía secretora, del inglés <i>secretory pathway Ca²⁺ ATPase</i> .
STIM	<i>Stromal interaction molecule</i> .
TM	Transmembrana.
TMRM	Tetrametilrodamina metil éster.
TRP	Receptor de potencial transitorio, del inglés <i>transient receptor potential</i> .
TRPC	Receptor TRP canónico, del inglés <i>transient receptor potential canonical</i> .
TRPM	<i>Transient receptor potential melastatin</i> .
TRPP	<i>Transient receptor potential polycystic</i> .
TRPV	<i>Transient receptor potential vanilloid</i> .
u.a.	Unidades arbitrarias.
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje, del inglés <i>voltage-dependent anion channel</i> .
VOCC	Canal de Ca ²⁺ dependiente de voltaje, del inglés <i>voltage-operated Ca²⁺ channel</i> .
WB	<i>Western blot</i> .
WT	<i>Wild-type</i> .

RESUMEN

RESUMEN

La homeostasis iónica es muy importante para las funciones celulares y su alteración puede dar lugar al desarrollo de patologías como el cáncer. El cáncer es una de las primeras causas de muerte en el mundo. En nuestro país, el cáncer colorrectal (CCR) es el cáncer con mayor incidencia. Procesos relacionados con el desarrollo de CCR implican un remodelado de la homeostasis iónica y, más concretamente, del calcio y del potasio. En células de CCR se han observado cambios en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, más concretamente de la entrada de calcio operada por depósitos (SOCE), aumentada en las células tumorales de colon HT29. Estos cambios pueden estar modulados por la mitocondria, por moléculas relacionadas con el transporte de Ca^{2+} como TRPC1 o por el exceso de poliaminas, asociadas al desarrollo de CCR.

En esta tesis se ha investigado la contribución de la mitocondria, la proteína TRPC1 y las poliaminas al remodelado del Ca^{2+} intracelular en células de CCR. Los resultados indican que la transferencia de mitocondrias aisladas de células normales puede reducir SOCE en células tumorales HT29. Sin embargo, la transferencia de mitocondrias aisladas de células tumorales aumenta SOCE en células HT29, mientras que no tiene efecto sobre SOCE en las células normales NCM460. Los resultados de la edición del canal TRPC1 en células tumorales HT29 no tienen un efecto claro sobre SOCE como tampoco lo tiene su inhibición farmacológica utilizando Pico145 a bajas concentraciones. Por otro lado, la inhibición de la síntesis de poliaminas utilizando DFMO puede revertir la expresión diferencial tumoral de genes relacionados con el transporte de Ca^{2+} en líneas celulares de CCR y, en consecuencia, revertir el remodelado del Ca^{2+} intracelular observado en CCR. Además, en las células tumorales HT29, donde hay una infraexpresión de canales de K^+ , se ha observado una disminución de la corriente total de K^+ en comparación con las células NCM460, que se revierte con la inhibición de la síntesis de poliaminas con DFMO. Sin embargo, la corriente mediada por los canales Kv10.1 y Kv11.1, mayor en células tumorales HT29, aumenta tras el tratamiento de las células tumorales con DFMO.

Los resultados de este proyecto abren nuevas vías de investigación en relación con el CCR poniendo el foco en la mitocondria y la transferencia mitocondrial entre células, así como en las poliaminas y su depleción para revertir el remodelado iónico que se produce en el CCR.

INTRODUCCIÓN

1. El cáncer colorrectal.

1.1. Aspectos generales del cáncer colorrectal.

Según los últimos informes del *Global Cancer Observatory* (GCO) perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2020 se registraron en el mundo más de 19 millones nuevos casos de cáncer y cerca de 10 millones de muertes por esta causa, situando el cáncer como una de las dos primeras causas de muerte en el mundo (Bray *et al.*, 2021). Si nos fijamos en los distintos tipos, el cáncer colorrectal (CCR) ocupa el tercer lugar en incidencia en el mundo (figura 1A), detrás del cáncer de mama y el cáncer de pulmón, pero el segundo en mortalidad, solo por detrás del cáncer de pulmón (figura 1C). En el caso concreto de España, en el año 2020 se registraron más de 280.000 casos de cáncer en el año 2020, de los cuales el CCR era el de mayor incidencia (figura 1B), con más de 40.000 casos, y el segundo en mortalidad (figura 1D). Además, según la OMS, en el año 2040 se espera que en nuestro país la incidencia aumente hasta los 375.000 casos de cáncer, de los cuales aproximadamente el 15% se corresponderá con CCR (Sung *et al.*, 2021).

Pese a estas cifras, la tasa de mortalidad por cáncer ha ido descendiendo a lo largo de los años debido a los sistemas de prevención y la mejora en los tratamientos. En el caso concreto del CCR, la mortalidad en Europa en mayores de 50 años se ha reducido debido al cambio en el estilo de vida y dieta (Malvezzi *et al.*, 2018). En menores de 50 años, la incidencia del CCR ha aumentado en la población europea en general, aunque la mortalidad se ha mantenido y está por debajo de la mortalidad de países como Estados Unidos, Canadá y Reino Unido, entre otros, debido en parte a la menor tasa de obesidad y el consumo de alcohol (Santucci *et al.*, 2021).

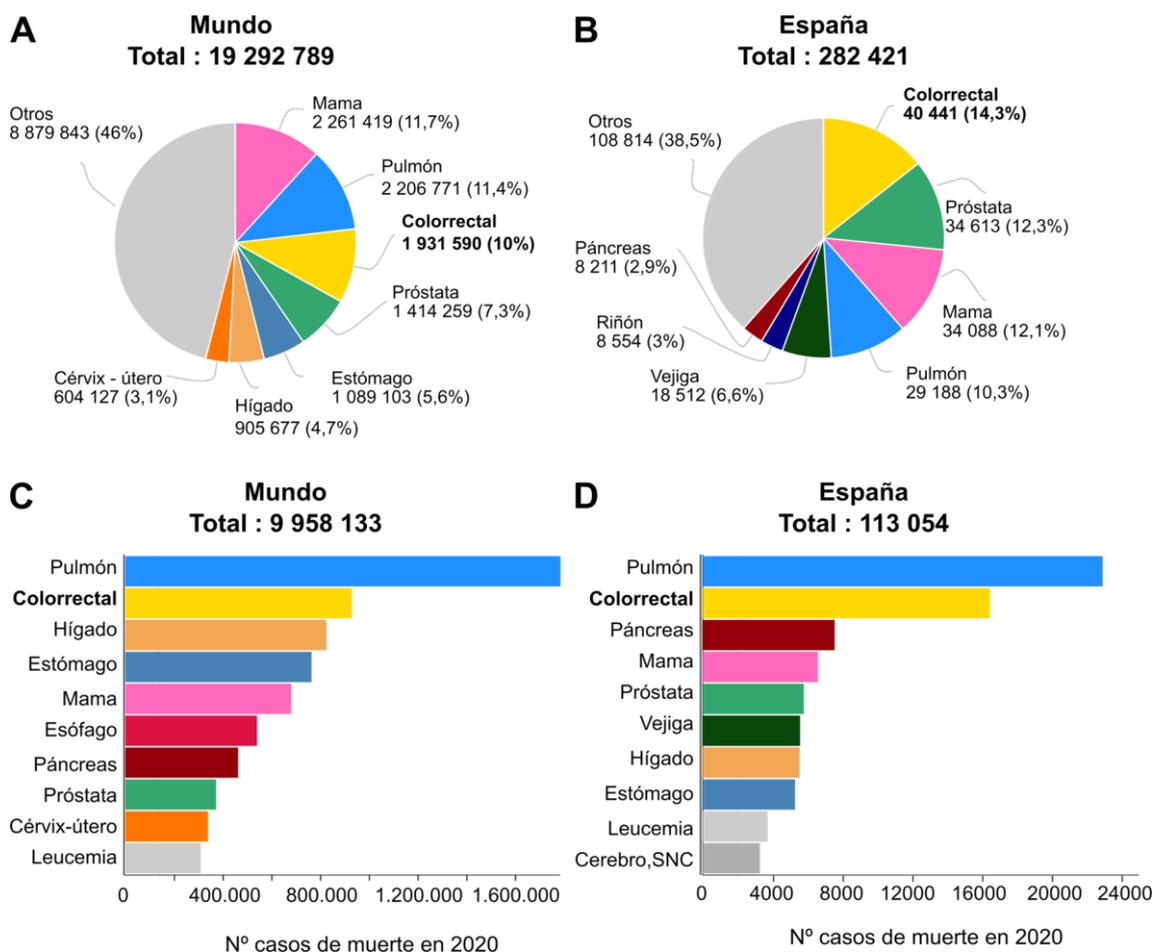


Figura 1. Incidencia y mortalidad en el año 2020 de los diferentes tipos de cáncer en el mundo y en España. A. B. Incidencia de los diferentes tipos de cáncer en el mundo (A) y en España (B) en el año 2020. C.D. Gráfico de barras con los 10 tipos de cáncer con mayor número de casos de muertes en el mundo (C) y en España (D) durante el año 2020. Datos obtenidos de GCO (<https://gco.iarc.fr/>).

Algo común a todos los tipos de cáncer es que presentan células que han pasado de la normalidad a un estado de crecimiento neoplásico, adquiriendo características para formar tumores malignos. Estas características se conocen como hitos o *hallmarks* del cáncer y engloban aquellos cambios fenotípicos a nivel celular comunes a todos los tipos de cáncer.

Los hitos del cáncer se describieron por primera vez en el año 2000, donde se enumeraron seis *hallmarks*: mantenimiento de las señales proliferativas, evasión de los supresores de crecimiento, activación de la invasión y metástasis, desarrollo de inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis y resistencia a la muerte celular (Hanahan and Weinberg, 2000). Años más tarde, los mismos autores describieron nuevos *hallmarks* emergentes y características favorables para el desarrollo tumoral.

Estas nuevas capacidades, añadidas a las seis anteriores ya descritas, incluían la desregulación del metabolismo energético celular, la evasión de la destrucción inmune, la inflamación promovida por el tumor y la aparición de inestabilidad genómica y mutaciones (Hanahan and Weinberg, 2011). Los últimos estudios, con el fin de abarcar toda la complejidad de la patogénesis del cáncer, añaden unas nuevas características favorables, consecuencia de las condiciones de neoplasia por las cuales las células cancerosas y los tumores pueden adoptar sus distintivos rasgos funcionales. Estas nuevas características incluyen la ganancia de plasticidad fenotípica, la reprogramación epigenética no debida a mutaciones, la variabilidad en el microbioma y las células senescentes (Hanahan, 2022). Por lo tanto, en la actualidad se identifican un total de catorce *hallmarks* o características favorables, recogidas en la figura 2, comunes a los diferentes tipos de cáncer.



Figura 2. Hallmarks del cáncer. Características o hitos del cáncer descritos por Hanahan y Weinberg que incluyen los *hallmarks* descritos en el año 2000, las incorporaciones del año 2010 y las nuevas adiciones sugeridas en 2022. Imagen adaptada de los nuevos *hallmarks* del cáncer (Hanahan, 2022).

1.2. Desarrollo del cáncer colorrectal.

La mayoría de los casos de CCR se asocian a mutaciones espontáneas no hereditarias y cambios epigenéticos relacionados con distintos factores de riesgo como la obesidad, un estilo de vida sedentario, el microbioma intestinal, exceso de consumo de carne, grasas y azúcares, el consumo de alcohol o el tabaquismo entre otros (Giovannucci, 2002). Sin embargo, alrededor del 30% de los casos de CCR presentan un perfil familiar donde cerca del 5% se ha relacionado con un síndrome hereditario. En el perfil hereditario se incluye la transmisión o predominancia de variantes de genes específicos de predisposición a CCR como el gen *APC* (del inglés *adenomatous polyposis coli*); genes para la reparación de errores o MMR (del inglés *missmatch repair*); moléculas de adhesión epitelial (EPCAM), o los genes *SMAD4* y *BMPR1a* (Giglia and Chu, 2016; Siegel *et al.*, 2020; Syngal *et al.*, 2015). También se han encontrado evidencias del papel que puede jugar el microbioma o los productos que genera, y se ha visto que pacientes con CCR presentan una menor diversidad en la microbiota intestinal (Cheng *et al.*, 2020; Tjalsma *et al.*, 2012).

En los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de la genética relacionada con el CCR y se han descrito tres mecanismos principales implicados en el inicio y progresión de este tipo de cáncer: el primero y más común es la inestabilidad cromosómica (CIN, del inglés *chromosomal instability*); el segundo es la inestabilidad de microsatélites (MSI, del inglés *microsatellite instability*), causado por problemas en la reparación de secuencias de nucleótidos repetidas en el ADN, y el tercero es el asociado con el fenotipo de metilación de las islas CpG (CIMP, del inglés *CpG Island Methylation Pathway*), relacionado con mutaciones en *BRAF* y asociado generalmente con MSI (Bogaert and Prene, 2014). El primero de los mecanismos es el más común (en torno al 70% de los casos) y se ha encontrado tanto en casos espontáneos como en familiares. Establece la secuencia adenoma-adenocarcinoma debido a una serie de mutaciones en supresores tumorales y oncogenes (figura 3). La primera mutación generalmente implica la pérdida de *APC*, un supresor tumoral. Esta mutación favorece la proliferación celular promoviendo la formación de pequeños adenomas benignos. Los pequeños adenomas con mutaciones en *APC* pueden acumular mutaciones en proto-oncogenes como *KRAS*, de manera que se activan y se incrementa la proliferación celular provocando un adenoma maligno. Este escenario puede empeorar dando lugar al adenocarcinoma a través de mutaciones secuenciales en otros genes como el supresor tumoral *TP53* o *PIK3CA*, necesario en la transición adenoma-carcinoma.

También se pueden producir mutaciones en *SMAD4* o *TGFBR*. Todo ello promueve la capacidad de infiltración y metástasis del CCR hacia otros órganos (Armaghany *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2018; Tirendi *et al.*, 2023; Vogelstein *et al.*, 2013).

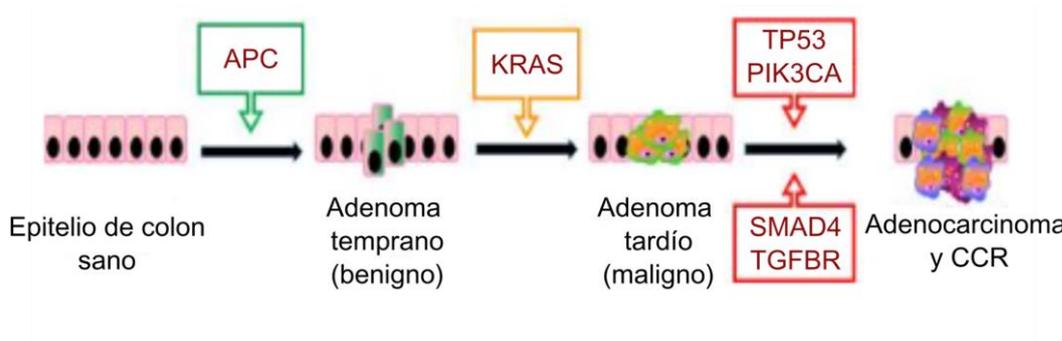


Figura 3. Transición de la iniciación y progresión del CCR. Pasos que establecen la secuencia adenoma-adenocarcinoma en el CCR. En rojo en cajas se indican las diferentes mutaciones que tienen lugar en la transición entre las distintas etapas. Figura adaptada de (Tirendi *et al.*, 2023).

El 70% de los casos de cáncer colorrectal esporádico comienza con mutaciones en *APC* que provocan su pérdida de función. El gen *APC* codifica un supresor tumoral relacionado con la vía de señalización Wnt/ β -catenina, la cual tiene un papel esencial en CCR tanto esporádico como hereditario (De Filippo *et al.*, 2002). La vía de señalización de Wnt/ β -catenina mantiene las células troncales indiferenciadas en la base de las criptas colónicas hasta el momento de la diferenciación. β -catenina actúa como factor de transcripción y controla la migración de estas células indiferenciadas fuera de las criptas, donde se diferenciarán y morirán al cabo de 3-7 días. La proteína *APC* promueve la degradación de β -catenina funcionando como un regulador negativo de esta vía. Las mutaciones en *APC* o su pérdida en los enterocitos provocan la acumulación de β -catenina, de manera que no se produce la migración y se mantiene el fenotipo de las células troncales en las criptas colónicas. Esta acumulación de células indiferenciadas en las criptas puede conducir a la formación de pólipos. Estos pólipos, junto con la acumulación secuencial de otras mutaciones como *KRAS* o *TP53*, promueven la secuencia adenoma-carcinoma que puede llevar al desarrollo del carcinoma (Armaghany *et al.*, 2012; Powell *et al.*, 1992).

El 30% restante de los casos de CCR espontáneo se desarrolla por la vía serrada. Esta vía se caracteriza por la activación de la vía de las MAP quinastas (mutaciones en *KRAS* o *BRAF*) y la presencia de CIMP. No se necesita MSI en esta vía aunque aparece

en muchos de los casos, demostrando que el grupo serrado es muy heterogéneo, donde tampoco se descarta una secuencia hiperplasia-adenoma-carcinoma inducida por *BRAF* (Betington *et al.*, 2013; Bogaert and Prenen, 2014)

Pese a que el modelo adenoma-adenocarcinoma que implica *APC* está altamente extendido, el CCR desde un punto de vista genético-molecular es bastante diverso. Se han observado diferencias moleculares y fenotípicas según la localización del tumor (lado derecho o izquierdo). Los CCRs del lado derecho, con fenotipo celular más mucinoso, aparecen principalmente en pacientes con predisposición genética y se caracterizan por MSI y CIMP. Por el contrario, los del lado izquierdo se caracterizan por la inestabilidad cromosómica descrita anteriormente y la activación de la vía EGFR (del inglés *epidermal growth factor receptor*) (Bogaert and Prenen, 2014; Molinari *et al.*, 2018).

1.3. Prevención y tratamiento del cáncer colorrectal.

Una de posibles terapias en la quimioprevención del CCR es el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) como la aspirina, el ibuprofeno o el sulindac. La principal actividad antitumoral de los AINEs es la supresión de la síntesis de prostaglandina E₂ por medio de la inhibición de la ciclooxigenasa 2 (COX-2). Esto provoca una disminución de la proliferación celular y de la angiogénesis, así como un aumento de la apoptosis. Las personas que toman AINEs tienen una menor incidencia de CCR por lo que estos fármacos podrían tener un efecto quimiopreventivo a largo plazo, convirtiendo el CCR en una enfermedad crónica que se podría tener bajo control (Maniewska and Jeżewska, 2021; Maxwell, 2012). Además, se ha visto que AINEs como sulindac pueden actuar sobre la vía de Wnt/ β -catenina a través de la degradación de β -catenina y reduciendo su concentración en el núcleo, mediante un mecanismo independiente de COX (Barker and Clevers, 2006).

Otro de los compuestos más utilizados en la quimioprevención del CCR es la molécula de difluorometilornitina (DFMO). El DFMO es un inhibidor suicida de la ornitina descarboxilasa 1 (ODC1), la enzima limitante en la biosíntesis de poliaminas en animales. Se ha visto que esta enzima está sobreexpresada en la mayoría de CCRs y que existe un exceso en la biosíntesis de poliaminas en pacientes con CCR y otros tipos de cáncer. La administración de DFMO solo o en combinación con otros fármacos como

sulindac se ha visto que puede ser un potente inhibidor de la carcinogénesis (Bachmann and Geerts, 2018; Gerner *et al.*, 2018; Gutiérrez *et al.*, 2019). Los estudios relativos a la síntesis de poliaminas y a su inhibición como prevención para el CCR se tratarán más adelante.

En pacientes con CCR de alto riesgo en estadio II o III y pacientes en estadio IV, el principal tratamiento es la escisión quirúrgica para erradicar cualquier residuo de la enfermedad seguido de un tratamiento de quimioterapia. A día de hoy, sería posible atacar el cáncer de manera más específica teniendo en cuenta el componente genético y molecular del paciente, aplicando terapias dirigidas e inmunoterapias o estrategias contra las células troncales del cáncer (CSC del inglés *cancer stem cells*), las cuales presentan un fenotipo de resistencia a fármacos (Tirendi *et al.*, 2023).

2. Homeostasis del calcio intracelular.

2.1. Funciones del Ca^{2+} dentro de la célula.

El calcio (Ca^{2+}) es un ion fundamental dentro de la célula. Actúa como segundo mensajero que puede regular diferentes funciones celulares a través de sistemas de señalización. Estas vías de señalización están basadas en cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular, es decir, en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. Los cambios en la concentración están determinados por un balance entre las reacciones *on*, que introducen Ca^{2+} al citoplasma y las reacciones *off*, que retiran Ca^{2+} del citoplasma por el efecto de tampones o *buffers*, bombas e intercambiadores. En las reacciones *on*, el Ca^{2+} se une a diferentes efectores responsables de la estimulación de numerosos procesos fisiológicos dependientes de Ca^{2+} (Berridge *et al.*, 2003). La capacidad del Ca^{2+} para alterar campos electrostáticos y la conformación de proteínas es una de las claves de la transducción de señales mediada por Ca^{2+} (Clapham, 2007). El ion Ca^{2+} es determinante en procesos a corto plazo como la exocitosis de neurotransmisores y hormonas o la contracción muscular. A largo plazo, la señalización por Ca^{2+} es clave en todos los procesos de la vida de un organismo, desde la fecundación del óvulo en mamíferos y la formación del embrión, hasta la muerte celular por apoptosis. Además, participa en el control de procesos fisiológicos durante el desarrollo y la vida adulta (figura 4), como el ciclo celular y las señales de proliferación y diferenciación celular (Berridge *et al.*, 2000).

La vida en mamíferos comienza con la fecundación, donde el óvulo produce un patrón espaciotemporal característico de ondas de Ca^{2+} que constituyen señales para la fusión de los núcleos masculinos y femeninos que da comienzo al desarrollo embrionario (Miyazaki *et al.*, 1993). Más tarde, las células entrarán en el ciclo celular. Durante el ciclo celular, se producen oscilaciones de calcio basadas en la liberación de Ca^{2+} almacenado de manera que se inician eventos específicos asociados a la mitosis, como la rotura de la envoltura nuclear o la división celular (Ciapa *et al.*, 1994). El Ca^{2+} también está implicado en la inducción de la diferenciación celular en el embrión donde promueve la formación de células somitas que darán lugar a las células que formarán parte de las vértebras y costillas, de la dermis de la piel y los músculos esqueléticos. También se relaciona con la diferenciación de los distintos tipos celulares en la vida adulta (Berridge *et al.*, 2000; Ferrari *et al.*, 1998).

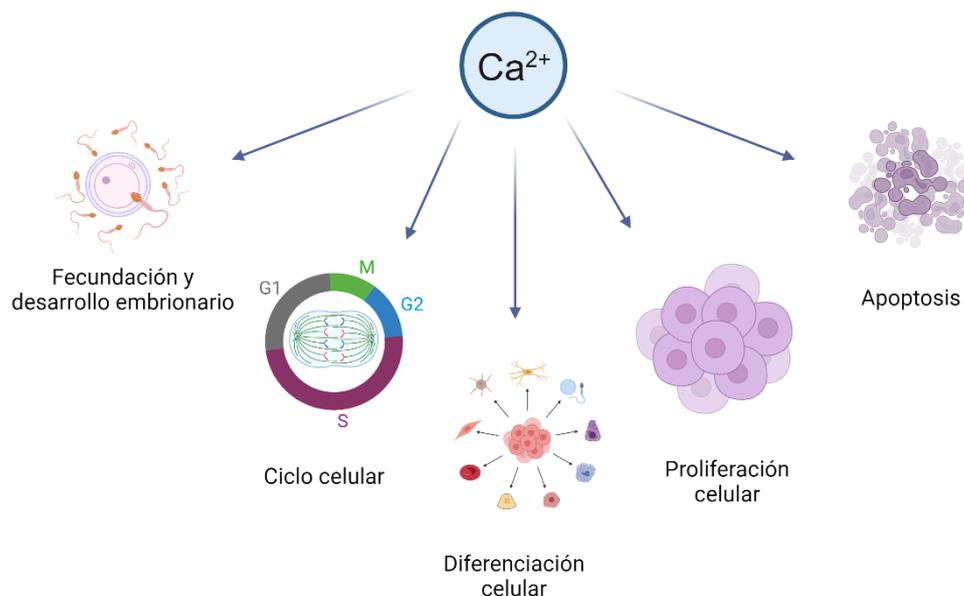


Figura 4. Principales funciones del Ca^{2+} a largo plazo dentro de la célula. El Ca^{2+} actúa como segundo mensajero dentro de la célula y participa en importantes vías de señalización relacionadas con la fisiología celular. Imagen creada con BioRender.com.

En cuanto a la proliferación celular, el Ca^{2+} regula vías de señalización como la ruta de las MAP quinasas (MAPK) o la vía de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K/AKT), donde el Ca^{2+} puede activar factores de transcripción como NF-AT o NF- κ B en el citoplasma o CREB en el núcleo (Berridge *et al.*, 2000; Crabtree, 2001). Por último, el Ca^{2+} también participa en la apoptosis. La función del Ca^{2+} en la apoptosis es realmente compleja ya que implica distintos sistemas y cascadas de señalización. En condiciones patológicas, el Ca^{2+} puede inducir apoptosis a través del flujo entre retículo endoplásmico (RE) y mitocondria. Por ejemplo, la liberación de Ca^{2+} del RE debido a estímulos pro-apoptóticos provoca la activación del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (mPTP, del inglés *mitochondrial permeability transition pore*), de manera que se incrementa la permeabilidad de la mitocondria a Ca^{2+} , se produce una sobrecarga de este ion y se libera citocromo c, iniciando el proceso de apoptosis (Berridge *et al.*, 2000; Szalai *et al.*, 1999). Todos estos procesos celulares controlados por Ca^{2+} se basan en un mecanismo simple: la variación de la concentración de Ca^{2+} dentro de la célula.

2.2. Sistemas de transporte de Ca^{2+} .

Llevando a nuestro terreno la frase de Lavoisier sobre la energía, podríamos decir que el Ca^{2+} ni se crea ni se destruye, solo se transporta. Dentro de la célula, las concentraciones de Ca^{2+} en el citoplasma ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$) se encuentran en torno a 100 nM cuando las células están en reposo, mientras que, en el exterior celular, la concentración de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext.}}$) es 10.000 veces superior, alrededor de 1-2 mM. Esto provoca que haya un enorme gradiente electroquímico que favorece la entrada de Ca^{2+} al citoplasma. Dentro de la célula, el Ca^{2+} se puede almacenar en el RE donde la concentración de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$) está en el rango milimolar, similar a la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext.}}$ (De La Fuente *et al.*, 2013). Debido a la diferencia con la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, el Ca^{2+} puede salir del RE al citoplasma a favor de gradiente de concentración. El aparato de Golgi (AG), aunque de manera menos importante, también puede almacenar Ca^{2+} (Rizzuto and Pozzan, 2006). Otros orgánulos subcelulares, como la mitocondria o el núcleo, presentan una $[\text{Ca}^{2+}]$ similar a las del citoplasma y solo se incrementa después de una estimulación (Chamero *et al.*, 2002; Montero *et al.*, 2000), aunque la situación de la mitocondria es excepcional por el enorme gradiente eléctrico que favorece la entrada de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial y que se describirá en detalle más adelante.

Cuando las células se activan, la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ puede incrementarse desde los 100 nM hasta los 1000 nM (Berridge *et al.*, 2000). Este Ca^{2+} procede del espacio extracelular o de los depósitos intracelulares. Para regular los niveles de Ca^{2+} es necesaria una compleja maquinaria de sistemas transportadores de Ca^{2+} (figura 5). Así, en la membrana plasmática (MP) y en el RE, principalmente, hay canales que promueven el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. Por el contrario, distintas bombas e intercambiadores promueven la eliminación de Ca^{2+} del citoplasma. Estos sistemas serán descritos a continuación en más detalle.

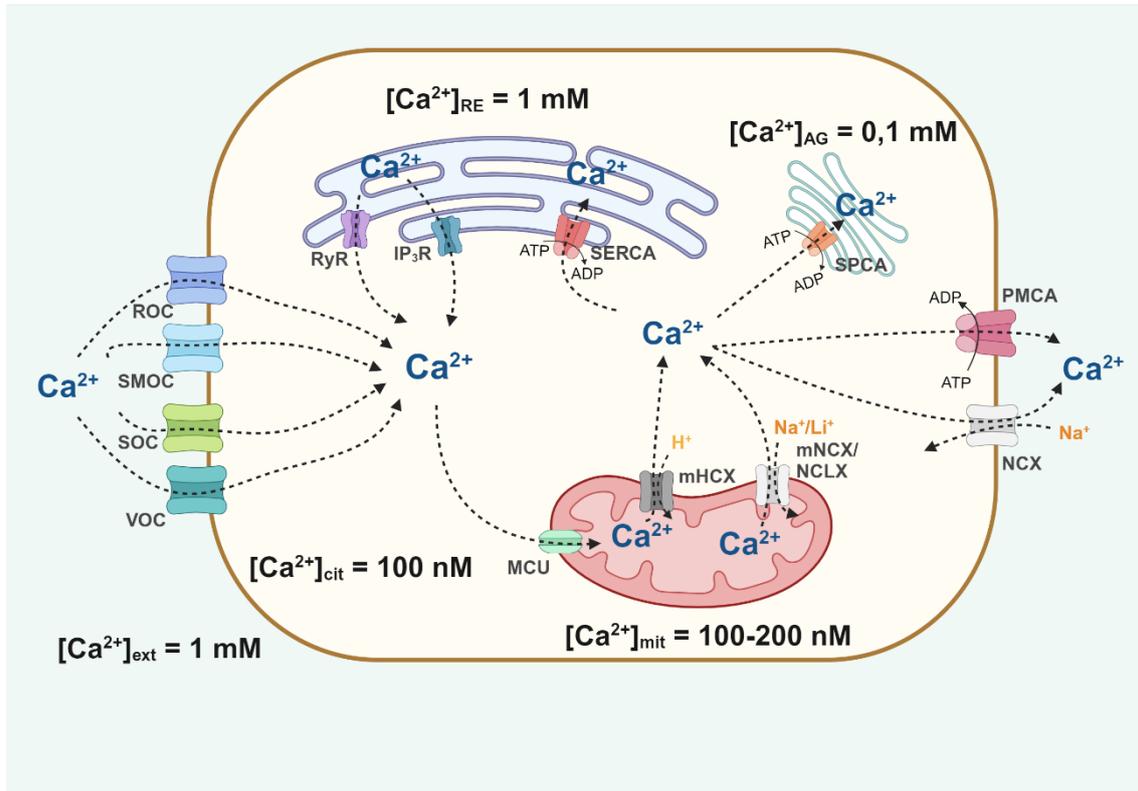


Figura 5. Sistemas de transporte implicados en la homeostasis intracelular de Ca^{2+} . La $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ es cuatro veces menor que la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$. El Ca^{2+} puede entrar a la célula a favor de gradiente a través de canales ROC, SMOC, SOC o VOC. El Ca^{2+} puede salir de la célula a través de la membrana plasmática gracias a la bomba PMCA y al intercambiador NCX. Dentro de la célula, el RE actúa como depósito de Ca^{2+} donde $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ es de 1 mM, y se puede liberar Ca^{2+} al citoplasma a través del receptor de RyR o IP₃R. El Ca^{2+} se introduce al interior del RE a través de la bomba SERCA. El AG también puede retirar Ca^{2+} del citoplasma a través de la bomba SPCA. Por último, la mitocondria donde $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ es similar a la del citoplasma, también puede captar Ca^{2+} del citoplasma. Debido al potencial de membrana tan negativo (-180 mV), el Ca^{2+} puede entrar a la mitocondria a través del uniportador MCU. La mitocondria puede liberar Ca^{2+} al citoplasma a través de los intercambiadores HCX y mNCX/NCLX introduciendo a la matriz iones H^+ o Na^+/Li^+ , respectivamente. Figura creada con BioRender.com.

2.2.1. Sistemas de transporte de Ca^{2+} de la membrana plasmática.

En la MP encontramos tanto canales que permiten la entrada de Ca^{2+} a favor de gradiente cuando se abren, como bombas e intercambiadores que provocan la salida de Ca^{2+} de manera activa (figura 6).

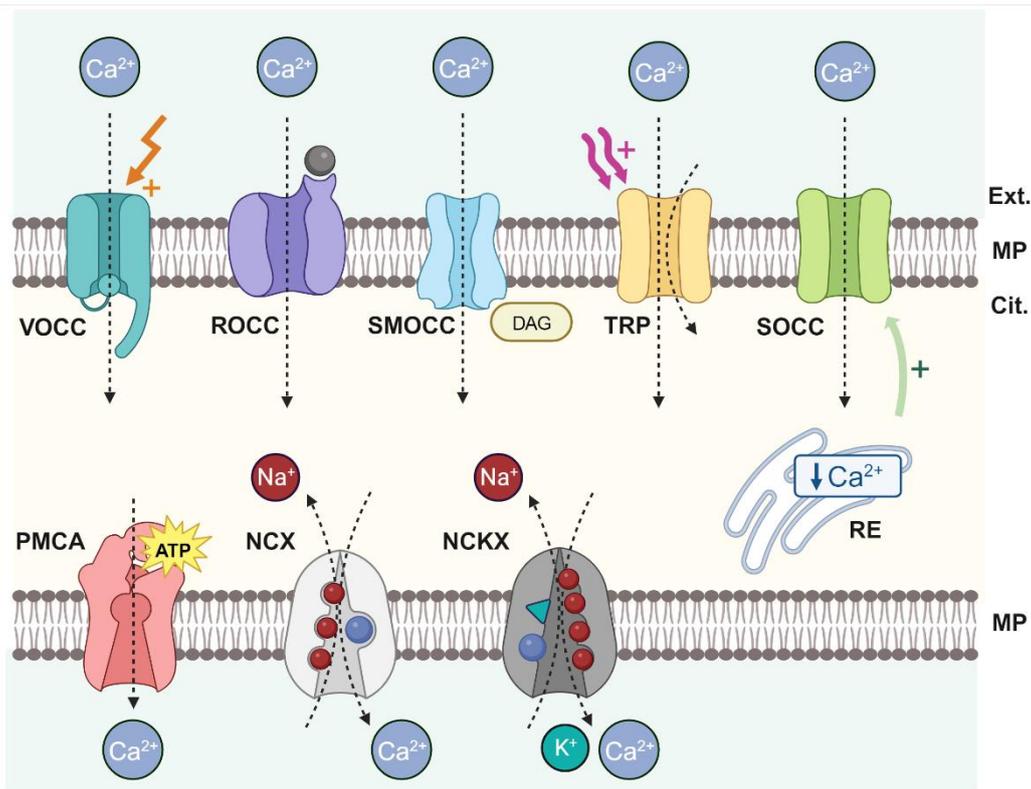


Figura 6. Sistemas de transporte de Ca^{2+} de la membrana plasmática. En la MP existen una serie de canales que permiten la entrada de Ca^{2+} a la célula. Estos canales pueden ser activados por distintos estímulos como cambios en el potencial de membrana (VOCC), la unión de ligandos extracelulares (ROCC) o intracelulares (SMOCC), estímulos del ambiente como calor, fármacos o estrés mecánico (TRP) o por el vaciado de los depósitos intracelulares (SOCC). También existen sistemas de extrusión de Ca^{2+} en contra de gradiente como la bomba PMCA que consume ATP o intercambiadores que sacan Ca^{2+} gracias al flujo a favor de gradiente de otros iones como Na^+ (NCX) o Na^+ y K^+ (NCKX). MP: membrana plasmática; Ext.: espacio extracelular; Cit.: citoplasma; RE: retículo endoplasmático. Figura creada con BioRender.com.

Sistemas de entrada de Ca^{2+} al citoplasma de la membrana plasmática.

En condiciones normales, estos canales permanecen cerrados. Sin embargo, con la llegada de ciertos estímulos, los canales se pueden abrir, de manera que se aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. La diferencia del gradiente de concentración de Ca^{2+} y el potencial de membrana negativo dentro de la célula favorecen la entrada de Ca^{2+} a la célula. Los principales canales de entrada de Ca^{2+} son:

Canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCC, del inglés *voltage-operated Ca^{2+} channels*). Son canales que se activan a través de cambios en el potencial de membrana y permiten la entrada de Ca^{2+} al interior celular. Según sus propiedades fisiológicas y farmacológicas podemos distinguir cinco tipos de corrientes de Ca^{2+} diferentes (L, N,

P/Q, R, T) y se han descrito diez subfamilias diferentes de VOCC (Catterall, 2011). Estos canales adquieren una mayor importancia en las células excitables como neuronas, células musculares, células cardíacas o células endocrinas, entre otras (Berridge, 2014; Tsien, 1983). Los más importantes en el CCR son $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$, $Ca_v2.2$ y $Ca_v3.2$ (Pérez-Riesgo *et al.*, 2017).

Canales de Ca^{2+} operados por receptor (ROCC, del inglés *receptor-operated Ca^{2+} channels*). Los canales ROCC se activan cuando se une un ligando a su receptor, generalmente un neurotransmisor, una hormona, y permiten la entrada de Ca^{2+} a favor de gradiente (Berridge, 2014). Pueden ser receptores ionotrópicos si el receptor y canal forman la misma estructura, como es el caso del receptor nicotínico de acetilcolina, o receptores metabotrópicos donde receptor y canal están en estructuras diferentes, como son los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Muchos de estos canales no son selectivos de Ca^{2+} y dejan pasar otros iones, por lo que se ha sugerido que ROCC haga referencia a canales catiónicos operados por receptor, donde se incluyen, por ejemplo, los canales TRP (McFadzean and Gibson, 2002).

Canales de Ca^{2+} operados por segundos mensajeros (SMOCC, del inglés *second messenger-operated Ca^{2+} channels*). Son canales que se activan a través de una señal intracelular, como nucleótidos cíclicos, diacilglicerol o ácido araquidónico (Parekh and Putney, 2005; Sage, 1992).

Canales receptores de potencial transitorio (TRP, del inglés *transient receptor potential*). Los canales TRP son canales iónicos que se pueden activar por distintos mecanismos como cambios en la osmolaridad, en la temperatura, estímulos mecánicos o cambios en los niveles intracelulares de Ca^{2+} (Montell, 2005). Se clasifican en seis subfamilias basadas en la homología de secuencias: TRPC (canónicos o clásicos); TRPV (sensibles a vaniloides como la capsaicina) estudiados por la sensibilidad al calor; TRPM (melastatina); TRPA (anquirina) principalmente quimioceptores estudiados como dianas de analgésicos; TRPML (mucopolipínicos) encontrados principalmente en compartimentos intracelulares, y TRPP (policistina) un grupo más diverso relacionado con la enfermedad poliquística renal (Samanta *et al.*, 2018). Estos canales se consideran sensores del entorno celular y algunos se han visto relacionados con la homeostasis del Ca^{2+} y la entrada operada por depósitos, por lo que se tratarán más adelante.

Canales de Ca^{2+} operados por depósitos (SOCC, del inglés *store-operated Ca^{2+} channels*). Son canales que se activan por la disminución de Ca^{2+} en los depósitos intracelulares como el RE (Parekh and Putney, 2005). La entrada de Ca^{2+} debido al vaciado de los depósitos es lo que se conoce como SOCE (del inglés *store-operated calcium entry*) o entrada capacitativa de Ca^{2+} y será descrita en profundidad más adelante. SOCE es el mecanismo principal de entrada de Ca^{2+} en las células no excitables como las de colon o CCR. Algunos estudios sugieren que ciertos canales TRP como por ejemplo TRPC1 actúan como SOCC debido a su implicación en SOCE (Lopez *et al.*, 2020b).

Sistemas de salida de Ca^{2+} del citoplasma de la membrana plasmática.

Para mantener los niveles de Ca^{2+} citosólico en su rango fisiológico es necesario que haya mecanismos de extrusión de Ca^{2+} en la MP que saquen Ca^{2+} en contra de gradiente. Los sistemas de salida de Ca^{2+} en la MP son:

Bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA, del inglés *plasma membrane calcium ATPase*). La PMCA es una ATPasa de tipo P que fue descubierta hace más de medio siglo en eritrocitos, pero que está presente en la mayoría de los tipos celulares. La PMCA tiene una alta afinidad por el Ca^{2+} , pero una baja capacidad de transporte y saca una molécula de Ca^{2+} por cada molécula de ATP que hidroliza, a la vez que introduce H^+ (Brini and Carafoli, 2009). Hay cuatro isoformas conocidas de PMCA que están codificadas por genes distintos y presentan distintos patrones de expresión. PMCA1 y PMCA4 están expresadas más o menos en todos los tipos celulares, mientras que PMCA2 y PMCA3 son específicas de algunos tipos celulares, sobre todo del sistema nervioso (Stafford *et al.*, 2017; Strehler and Zacharias, 2001). PMCA1 está relacionada con el desarrollo de los linfocitos B, mientras que PMCA4 se relaciona con los linfocitos T (Korthals *et al.*, 2021). Se ha observado que PMCA4 está disminuida en las células de CCR (Aung *et al.*, 2009; Pérez-Riesgo *et al.*, 2017).

Como se observa en la figura 7, la PMCA tiene diez dominios transmembrana, extremos N-terminal y C-terminal citosólicos y dos grandes bucles intracelulares. En el extremo N-terminal se sitúan la mayor parte de las variaciones entre las isoformas. En el extremo C-terminal se encuentra una región de unión a calmodulina (CaMBD). La calmodulina puede interaccionar específicamente con la bomba y activarla. En el primer

bucle contiene un sitio de unión a fosfolípidos ácidos, lo que incrementa la afinidad de la PMCA por el Ca^{2+} . El segundo bucle contiene el sitio catalítico de la bomba. En ambos bucles existen regiones autoinhibitorias que se pueden unir a CaMBD para mantener la bomba en un estado cerrado y con menor afinidad por el Ca^{2+} (Brini *et al.*, 2010; Brini and Carafoli, 2011; Stafford *et al.*, 2017).

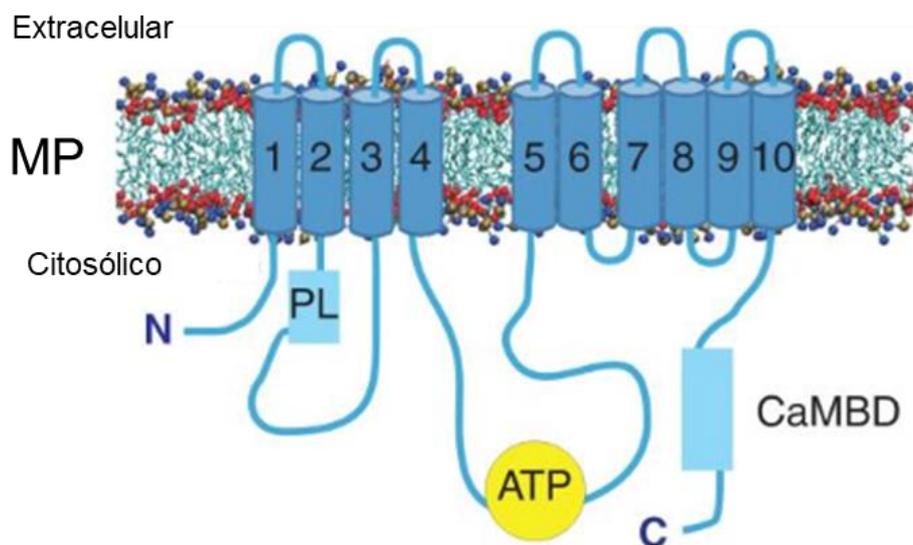


Figura 7. Topología de la PMCA. La bomba PMCA se sitúa en la MP. Consta de 10 dominios transmembrana conectados por bucles pequeños en su lado externo. La porción citosólica contiene el centro catalítico, indicado en amarillo, donde se une e hidroliza el ATP. En la porción citosólica también se encuentra el sitio de unión a fosfolípidos ácidos (PL) y a calmodulina (CaMBD), en azul. MP: membrana plasmática. Figura adaptada de (Brini and Carafoli, 2011).

Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática (NCX, del inglés $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger). NCX es un intercambiador de baja afinidad al Ca^{2+} , pero de alta capacidad, muy importante para la extrusión de Ca^{2+} en tejidos excitables como el cerebro o el corazón. NCX está codificado por tres genes que da lugar a las tres isoformas existentes. Tiene nueve segmentos transmembrana separados en dos porciones por un bucle citosólico. Tiene un dominio de unión a Na^+ y dos dominios de unión a Ca^{2+} (Brini and Carafoli, 2011; Quednau *et al.*, 2004). Generalmente transporta un ion de Ca^{2+} por cada tres iones de Na^+ que introduce a favor de gradiente, pero la estequiometría es variable y puede ser 1:1 o 4:1 según la acumulación o depleción de iones u otros flujos iónicos. NCX también puede introducir Ca^{2+} al interior celular y extraer Na^+ dependiendo del gradiente electroquímico de los iones (Bers and Ginsburg, 2007; Philipson *et al.*, 2002).

Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-K}^+$ de la membrana plasmática (NCKX, del inglés $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-K}^+$ exchanger). NCKX pertenece a la superfamilia de los intercambiadores NCX. Es más común en células excitables. En condiciones normales, NCKX puede mover cuatro iones de Na^+ por cada ion de Ca^{2+} y K^+ en un transporte a favor de gradiente electroquímico de Na^+ y K^+ , aunque esta estequiometría puede cambiar en condiciones patológicas (Al-Khannaq and Lytton, 2023; Brini and Carafoli, 2011; Lytton, 2007).

2.2.2. Sistemas de transporte en los depósitos intracelulares de Ca^{2+} .

Dentro de las células, el mayor depósito de Ca^{2+} que se conoce es el retículo endoplasmático (RE). Este orgánulo está especializado en el depósito y señalización de Ca^{2+} . Tanto el RE como el aparato de Golgi (AG) pueden retirar Ca^{2+} del citoplasma a través de bombas como la SERCA en el RE o la SPCA en AG. Por otra parte, la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ puede aumentar por el Ca^{2+} liberado desde el RE a través del receptor de IP_3 o del receptor de rianodina (figura 8).

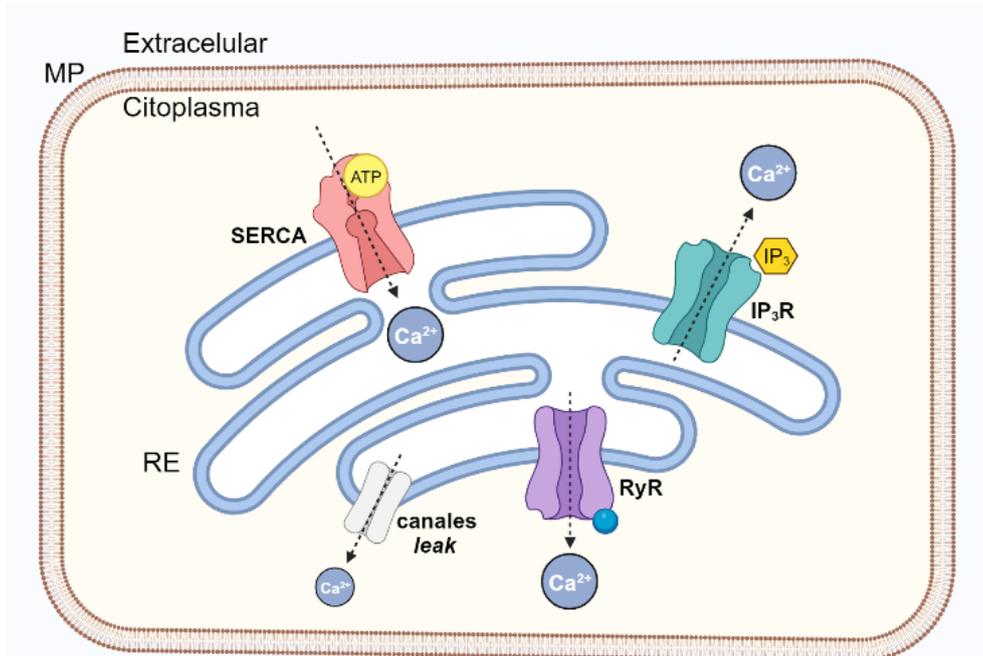


Figura 8. Sistemas de transporte de Ca^{2+} en el retículo endoplasmático. El RE es el mayor almacén de Ca^{2+} dentro de la célula. El Ca^{2+} puede ser liberado al citoplasma a través de los receptores de inositol trifosfato (IP_3R) o de rianodina (RyR). En menor medida también se puede liberar a través de canales de goteo o *leak*. La entrada de Ca^{2+} en el RE se produce a través de SERCA, que consume ATP. Figura creada con BioRender.com.

Sistemas de retirada de Ca^{2+} del citoplasma.

Para mantener los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, el Ca^{2+} puede ser captado a orgánulos intracelulares como el RE y el AG que pueden retirar Ca^{2+} del citoplasma a través de ATPasas, similares a la PMCA de membrana, gracias a la hidrólisis de una molécula de ATP. Estas bombas son SERCA en el RE y SPCA en el AG.

La bomba ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico (SERCA, del inglés *sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*) es el sistema de captación de Ca^{2+} citosólico al interior del RE. SERCA fue descubierta hace más de 65 años en músculo esquelético. La bomba SERCA puede captar Ca^{2+} rápidamente del citoplasma, de manera que se establece un gradiente de concentración de Ca^{2+} entre el RE y el citoplasma de hasta cuatro órdenes de magnitud. Esta diferencia de gradiente hace que el RE actúe como tampón de Ca^{2+} para regular cambios rápidos y transitorios en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ (James W Putney, 1999).

SERCA introduce al RE dos Ca^{2+} por cada molécula de ATP hidrolizada, a la vez que saca H^+ . Como el resto de las ATPasas de tipo P, SERCA es bloqueada por lantano y ortovanadato. Se han descrito inhibidores específicos como la taspigargina (TG), el ácido ciclopiazónico (CPA) o la 2,5-di(tert-butyl) hidroquinona (tBHQ). Estos dos últimos inhibidores tienen una afinidad menor por la SERCA y producen una inhibición reversible que desaparece cuando se retira el CPA o la tBHQ, mientras que la TG, por el contrario, produce una inhibición irreversible (Brini and Carafoli, 2009). Se conocen tres isoformas de SERCA codificadas por tres genes diferentes, pero que tras modificaciones post-transcripcionales pueden dar lugar hasta 14 variantes diferentes con distinta distribución según la especie y el tejido y diferencias en la afinidad por el Ca^{2+} . La primera isoforma es la predominante en músculo esquelético de adultos (SERCA1a) o de fetos (SERCA1b), mientras que SERCA2a se expresa principalmente en tejido cardiaco. La expresión de SERCA2b y SERCA3 es ubicua y se encuentra en una gran variedad de tejidos y células (Zhai *et al.*, 2020). Se ha visto que la expresión de SERCA está disminuida en muchos tipos de cáncer, lo que concuerda con el menor tamaño de los depósitos de Ca^{2+} que se ha observado en CCR. Esto podría hacer que la liberación de Ca^{2+} al citoplasma sea menor y, por lo tanto, disminuye el mPTP, de manera que la mitocondria no se sobrecarga de Ca^{2+} y no libera tanto citocromo c, lo que se traduce en una mayor supervivencia celular (Korosec *et al.*, 2006; Pinton *et al.*, 2008; Villalobos *et al.*, 2017).

La ATPasa de la vía secretora de Ca^{2+} (SPCA, del inglés *secretory pathway Ca^{2+} -ATPase*) es el sistema encargado de retirar Ca^{2+} desde el citoplasma hacia el AG. La primera SPCA fue identificada hace más de 30 años en levaduras y 10 años más tarde en humanos, en relación con la enfermedad de Hailey-Hailey (Hu *et al.*, 2000; Rudolph *et al.*, 1989). Se han descrito dos isoformas de SPCA (SPCA1 y SPCA2), ambas con una alta afinidad por Ca^{2+} . SPCA1 presenta una expresión ubicua, pero sus niveles son especialmente altos en queratinocitos de la piel, mientras que SPCA2 tiene una expresión más restringida, limitada al tracto respiratorio y gastrointestinal, próstata, tiroides y glándulas mamarias y salivares. Se han observado altos niveles de SPCA2 en células de colon y CCR, donde se encuentra sobreexpresada (Brini and Carafoli, 2009; Pérez-Riesgo *et al.*, 2017; Vanoevelen *et al.*, 2005). Al contrario que SPCA1 cuya expresión se limita a Golgi y la vía secretora, SPCA2 puede insertarse también en la MP (Feng *et al.*, 2010).

SPCA presenta una estructura típica de ATPasa de tipo P (figura 9) con 10 hélices transmembrana y tres dominios citosólicos. Los dominios citosólicos se encargan de la actividad ATPasa: un dominio de unión al ATP (N), un dominio de fosforilación (P) y un dominio de activación o desfosforilación (A). El Ca^{2+} se une al dominio transmembrana. En un primer momento, SPCA deja una cavidad hacia el citosol, permitiendo la unión de Ca^{2+} . Cuando entra Ca^{2+} en la estructura, el dominio N une una molécula de ATP que será hidrolizada, provocando la fosforilación de SPCA en el dominio P. Se abre una cavidad hacia el lumen de Golgi y se libera el Ca^{2+} al interior. En ese momento se produce la desfosforilación de SPCA por el dominio A, dejando la molécula disponible para transportar nuevamente Ca^{2+} (Wu *et al.*, 2023). SPCA puede transportar únicamente un ion de Ca^{2+} por cada molécula de ATP que hidroliza. Una peculiaridad de la SPCA es que, además de transportar Ca^{2+} al lumen del AG, transportan manganeso (Mn^{2+}). El Mn^{2+} es muy importante para las enzimas del interior del AG, como las glicosiltransferasas que utilizan en Mn^{2+} como cofactor. El transporte de Mn^{2+} por SPCA es importante para regular la $[\text{Mn}^{2+}]$ en el citosol, ya que la acumulación de este ion es tóxica para las células (Brini and Carafoli, 2009).

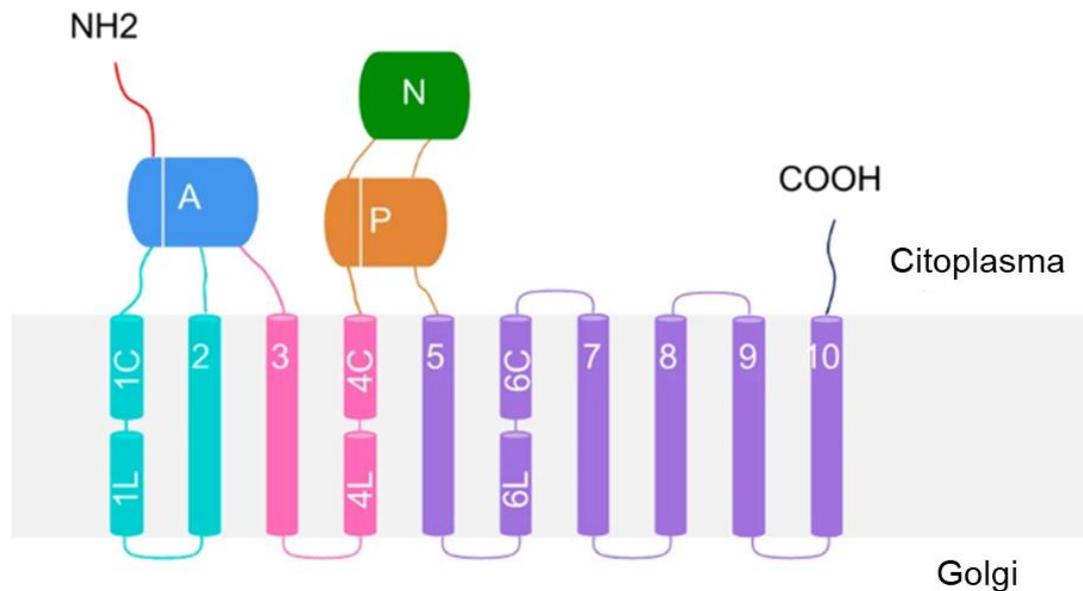


Figura 9. Esquema de la estructura de SPCA. SPCA1 se inserta en la membrana del Aparato de Golgi. Consta de 10 dominios transmembrana (TM) y tres dominios citosólicos altamente conservados: el dominio de activación (A), el dominio de fosforilación (P) y el dominio de unión a nucleótidos (N) donde se une el ATP. Los dominios N y P están conectados mediante dos enlaces o *linkers*. Los dominios TM1, TM4 y TM6 están divididos en dos sub-hélices. La unión a Ca^{2+} se produce en los segmentos TM, en residuos altamente conservados. La estructura es similar en la variante SPCA2. Figura adaptada de (Wu *et al.*, 2023).

SPCA no es la única bomba capaz transportar Ca^{2+} al AG. También se ha visto que hay bombas SERCA en la membrana del AG. Ambas bombas contribuyen a la captación de Ca^{2+} por el AG, aunque la SPCA1 tiene una mayor presencia (Vanoevelen *et al.*, 2005). Por otra parte, SPCA2 juega un papel dual en la homeostasis del Ca^{2+} de las células donde se expresa. Además de su actividad ATPasa para captar Ca^{2+} y Mn^{2+} al interior del AG, SPCA2 funciona como chaperona capaz de activar canales Orai1 en la MP y activar la entrada de Ca^{2+} independientemente de los depósitos (SICE, del inglés *store independent Ca²⁺ entry*) (Makena *et al.*, 2022). SICE se explicará más adelante en relación con el remodelado en cáncer.

Sistemas de liberación de Ca^{2+} del retículo endoplasmático.

El RE puede liberar Ca^{2+} al citoplasma principalmente a través de dos canales: el receptor del inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3R) o el receptor de rianodina (RyR), aunque existen otros canales *leak* que pueden liberar Ca^{2+} al citoplasma desde el RE.

Receptor de inositol trifosfato (IP₃R, del inglés *inositol triphosphate receptor*). El IP₃R es un transportador del RE formado por seis segmentos transmembrana que generalmente funciona como homo o hetero-tetrámero. Existen tres isoformas que comparten el 70% de la secuencia. La isoforma IP₃R1 está ampliamente expresada en todos los tipos celulares y es la más estudiada. La isoforma IP₃R2 es la que tiene mayor afinidad por el IP₃ y está predominantemente expresada en hepatocitos. IP₃R3 está ampliamente expresada en células acinares del páncreas, la saliva y el sistema gástrico (Zhai *et al.*, 2020).

La liberación de Ca²⁺ desde el RE comienza con una señal generada en la MP. La estimulación de GPCRs y receptores de tirosin-quinasa (TKRs, del inglés *tyrosine kinase receptors*) activan la fosfolipasa C (PLC). PLC hidroliza el fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) de la MP dando lugar a dos segundos mensajeros: el diacilglicerol (DAG) y el inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃). El IP₃ puede difundir en el citoplasma y se une a sus receptores situados en la membrana del RE provocando que se abran y liberen Ca²⁺ al citosol (figura 10). Cuando se abren los IP₃R queda expuesta una zona de unión a Ca²⁺ en el citoplasma que, al unirse moléculas de Ca²⁺, facilita la liberación de Ca²⁺ del RE en un proceso que se conoce como liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ (CICR, del inglés *Ca²⁺-induced Ca²⁺ release*) (Banerjee and Hasan, 2005; Endo, 2009; Taylor and Tovey, 2010).

Receptor de rianodina (RyR, del inglés *ryanodine receptor*). Los RyRs se expresan casi de forma exclusiva en el RE y se caracterizan por unirse a la rianodina. Hay tres isoformas que comparten un 65% de homología. La isoforma RyR1 se expresa principalmente en músculo esquelético, cerebelo y linfocitos B, mientras que RyR2 se expresa en músculo cardiaco. RyR3 aparece expresada en variedad de tejidos, pero en menor proporción en comparación con las otras dos isoformas (Hamilton, 2005) .

Los RyRs generalmente se encuentran cerrados cuando los niveles de Ca²⁺ citosólico son bajos (100-200 nM). Sin embargo, cuando la [Ca²⁺]_{cit} alcanza un umbral, el Ca²⁺ actúa sobre los RyRs, que forman homo-tetrámeros y se abren para liberar de forma rápida y masiva Ca²⁺ a través de CICR (figura 10). Por lo tanto, el incremento de la [Ca²⁺]_{cit} a través de los IP₃Rs, hace que se abran los RyR para liberar Ca²⁺ del RE (Endo, 2009; Meissner, 2004).

Canales de goteo o *leak*. Para prevenir la sobrecarga de Ca²⁺ del RE y el estrés del retículo, las proteína TMBIM (del inglés *transmembrane BAX inhibitory motif*) y

TMCO1 (*transmembrane and coiled-coil domain 1*) pueden actuar como canales *leak* de Ca^{2+} . TMBIM6 se localiza en el RE de células de músculo esquelético, hígado, riñón y bazo y puede liberar Ca^{2+} tras cambios en el pH del RE (Chang *et al.*, 2014; Liu, 2017). TMCO1, sin embargo, es un canal de Ca^{2+} activado por carga de Ca^{2+} (CLAC, del inglés *Ca²⁺ load-activated Ca²⁺*) situado en la membrana del RE. TMCO1 homo-tetrameriza tras la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ formando un canal selectivo de Ca^{2+} que permite su salida al citoplasma (Wang *et al.*, 2016).

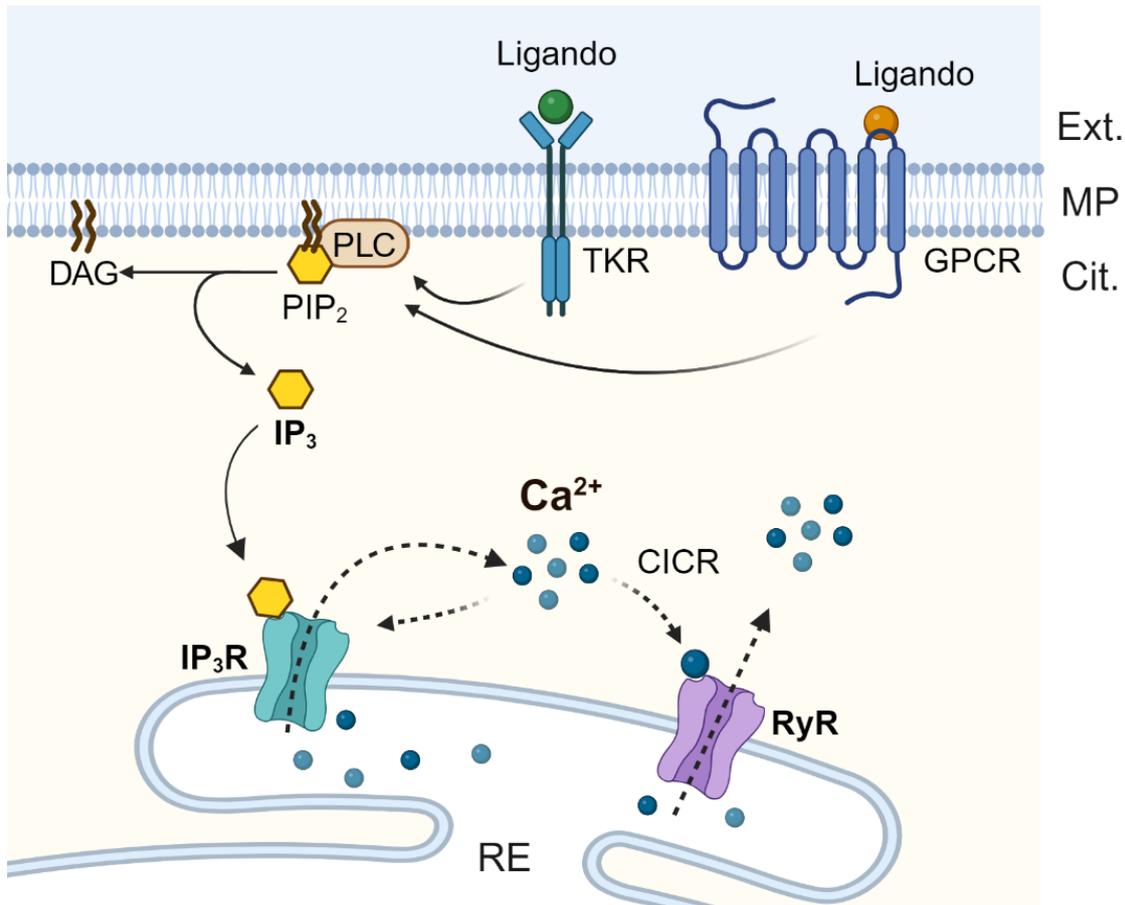


Figura 10. Liberación de Ca^{2+} desde el RE. La estimulación de un GPCR o un TKR por la unión de su ligando, activa la PLC. Como consecuencia, PLC hidroliza el PIP_2 de la membrana dando lugar a DAG e IP_3 . IP_3 se une a su receptor, IP_3R , y se produce la liberación de Ca^{2+} desde el RE. Este Ca^{2+} puede, a su vez, activar RyR y el propio IP_3R , de manera que se libera más Ca^{2+} en un proceso conocido como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR), aumentando $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. GPCR: receptor acoplado a proteína G; TKR: receptor tirosin quinasa; PLC: fosfolipasa C; PIP_2 : fosfatidilinositol bifosfato; DAG: diacilglicerol; IP_3 : inositol trifosfato; IP_3R : receptor de IP_3 ; RyR: receptor de rianodina. Figura creada con BioRender.com.

2.2.3. Sistemas de transporte de Ca^{2+} en la mitocondria.

Además de su papel en proveer de energía a la célula, la mitocondria tiene un rol importante en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. Al igual que el RE, la mitocondria puede almacenar Ca^{2+} en su interior, actuando como tampón o *buffer*, donde la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ puede alcanzar el rango milimolar. El Ca^{2+} puede atravesar fácilmente la membrana mitocondrial externa (MME) a través de grandes poros como los canales VDAC, mientras que para atravesar la membrana mitocondrial interna (MMI) necesita canales y transportadores selectivos.

El Ca^{2+} entra a la mitocondria gracias al gradiente eléctrico que se genera entre el citoplasma y la MMI (Clapham, 2007). La capacidad de tamponamiento de la mitocondria puede controlar alteraciones transitorias en las concentraciones de Ca^{2+} y evitar las sobrecargas de Ca^{2+} asociadas con algunas patologías, así como prevenir acumulaciones de Ca^{2+} cerca de canales SOC y mantener SOCE como veremos más adelante (Romero-Garcia and Prado-Garcia, 2019). El transporte de Ca^{2+} de la mitocondria implica proteínas, canales e intercambiadores situados tanto en la MME como la MMI (figura 11).

Sistemas de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria

Canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC, del inglés *voltage-dependent anion channels*). VDAC es el canal encargado del transporte de Ca^{2+} desde el citoplasma hasta el espacio intermembrana (EIM) a través de la MME. Existen tres isoformas de VDAC, siendo VDAC1 la isoforma más abundante (Shoshan-Barmatz *et al.*, 2010). VDAC tiene dos estados que van a determinar la selectividad de paso de iones y metabolitos: cuando se encuentra en estado abierto es permeable a aniones y metabolitos, siendo el ATP el más importante; en estado cerrado, por el contrario, es más permeable a cationes como el Ca^{2+} . El estado cerrado ocurre cuando aumenta el potencial de membrana mitocondrial o con la unión de proteínas o metabolitos como NADH (Tan and Colombini, 2007). El propio Ca^{2+} puede regular la conductancia de VDAC, de manera que una mayor concentración de Ca^{2+} favorece el estado cerrado del canal (Garbincius and Elrod, 2022). VDAC participa en el flujo de Ca^{2+} entre el RE y la mitocondria ya que aparece en los sitios de contacto entre ambos orgánulos conocidos

como membranas asociadas a la mitocondria (MAMs) del RE. Las MAMs son esenciales en la capacidad de tamponamiento de Ca^{2+} de la mitocondria (Varughese *et al.*, 2021).

El uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU, del inglés *mitochondrial calcium uniporter*) media la entrada de Ca^{2+} a través de la MMI. Esta entrada está favorecida por el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), que es de aproximadamente -180 mV entre la matriz mitocondrial y el EIM. MCU forma parte de un complejo multiproteico que forma el canal uniportador de Ca^{2+} mitocondrial o mtCU (figura 11). Este complejo está formado por cinco proteínas: MCU, la proteína que forma el canal en la MMI; EMRE (del inglés *essential mitochondrial response element*), una proteína integral de andamiaje, y MICU1, MICU2 y MICU3 (del inglés *mitochondrial calcium uptake*), unas proteínas reguladoras que se sitúan en el EIM. En ciertas condiciones también aparece MCUB, un parólogo de MCU. Además, también pueden aparecer otras proteínas reguladoras en la MMI como es el caso de MCUR1 (del inglés *mitochondrial calcium uniporter regulator 1*) (Garbincius and Elrod, 2022).

La entrada de Ca^{2+} a la mitocondria se lleva a cabo por MCU, que funciona como un canal iónico de rectificación interna. El canal es selectivo de Ca^{2+} y presenta una baja afinidad por este catión (Kirichok *et al.*, 2004). MCU forma tetrámeros con la ayuda de MCUR1. En ausencia de EMRE, el tetrámero de MCU no puede transportar Ca^{2+} a través de la MMI. Cuando EMRE se asocia a MCU en canal se vuelve funcional. Entonces MICU1 se une a MCU y EMRE en el EIM. MICU1, junto con MICU2 o MICU3 actúa como controlador de la apertura del mtCU según la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, facilitando el ensamblaje y actividad del complejo mtCU. Por lo tanto, cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ aumenta, MICU1 detecta este cambio, mtCU se abre y permite la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria a favor del $\Delta\Psi_m$. Sin embargo, existe una alternativa, denominada entrada de Ca^{2+} rápida (RaM, del inglés *rapid mode of Ca^{2+} uptake*), que funciona cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ es menor de 200 nM, demasiado baja como para activar mtCU. Este efecto puede ser debido a la regulación de mtCU por parte de MICU1. Cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ es baja, RaM se produce a través de una forma no cerrada de MCU que no está sujeta a la regulación por MICU1. Según aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ por encima de 150 nM, aumenta la unión de Ca^{2+} a MICU1, el cual es capaz de abrir MCU terminando la corriente RaM (Garbincius and Elrod, 2022; Mallilankaraman *et al.*, 2012).

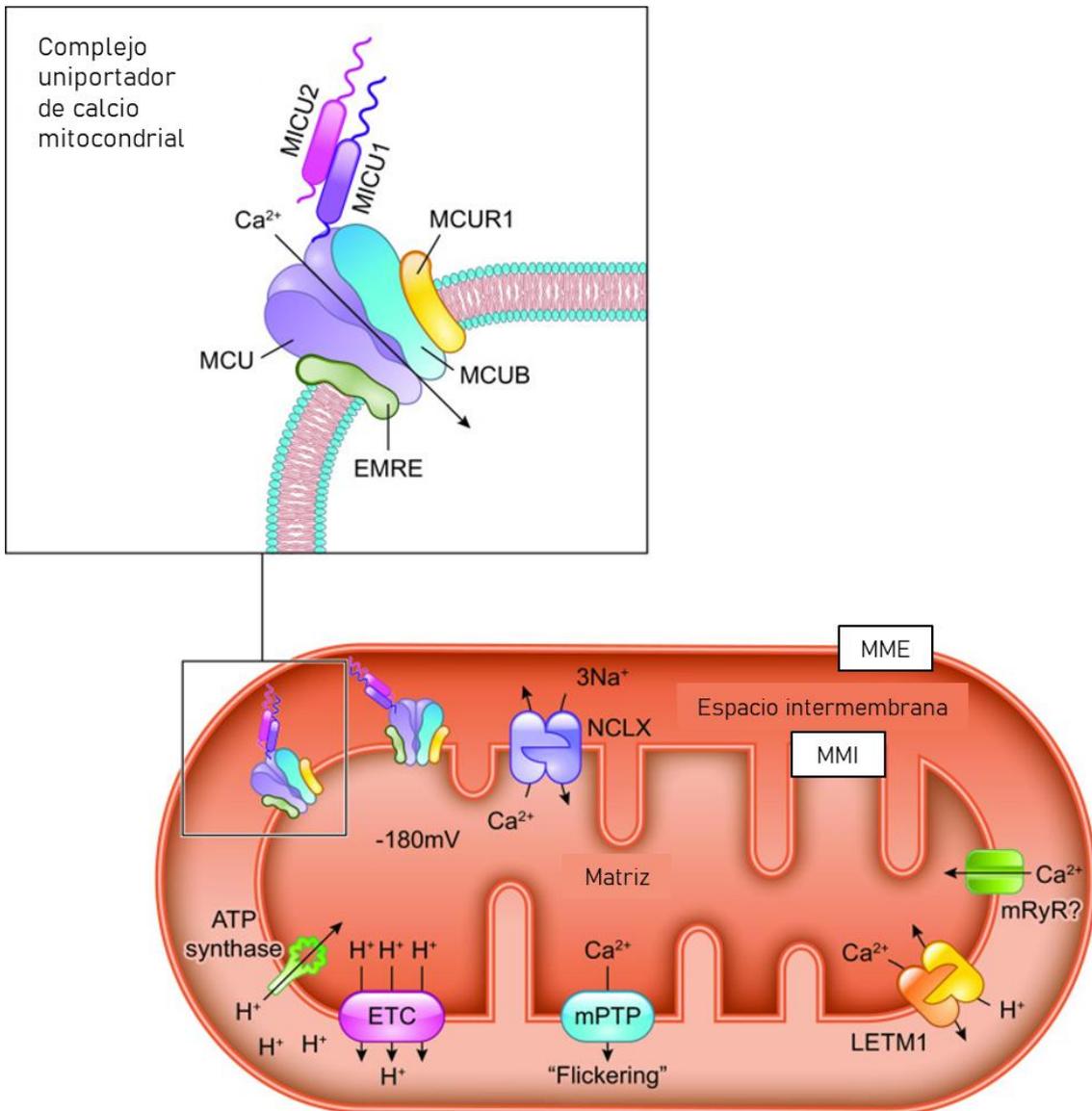


Figura 11. Sistemas de transporte de Ca^{2+} de la mitocondria y complejo uniportador de calcio mitocondrial. El Ca^{2+} entra a la mitocondria por el potencial altamente negativo (-180 mV) que se establece a través de MMI debido a la cadena transportadora de electrones (ETC). Existen vías de entrada de Ca^{2+} como receptores de rianodina y el complejo uniportador de Ca^{2+} (mtCU). El mtCU funciona como canal formado por 4 subunidades de MCU y hasta 4 subunidades EMRE. En algunos casos el parálogo de MCU, MCUB, sustituye subunidades de MCU dentro del complejo. La apertura del canal está controlada por MICU1 que puede formar dímeros MICU1/2 o MICU1/3 según el tejido. La subunidad accesoria MCUR1 también se puede unir y regular el canal. NCLX y LETM1 constituyen las principales vías de salida de Ca^{2+} de la mitocondria. Estos intercambiadores también pueden funcionar en sentido reverso bajo ciertas condiciones. A través del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (mPTP) también puede salir Ca^{2+} de la mitocondria. Figura adaptada de (Garbincius and Elrod, 2022).

También se han identificado receptores de rianodina en la mitocondria (mRyR) en la MMI similares a los RyR1 del retículo. Los mRyR pueden jugar un papel importante en la captación mitocondrial de Ca^{2+} , principalmente en células excitables. La entrada de Ca^{2+} por estos receptores también depende del $\Delta\Psi_m$ y el gradiente de concentración de Ca^{2+} . Se cree que el mRyR es más importante para la captación de Ca^{2+} mitocondrial cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ es baja y pierde relevancia según aumenta, donde la captación de Ca^{2+} a la mitocondria se lleva a cabo principalmente por mtCU. En presencia de rianodina, la captación mitocondrial de Ca^{2+} disminuye y evita la sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria (Beutner *et al.*, 2005, 2001; Jakob *et al.*, 2014).

Sistemas de extrusión de Ca^{2+} de la mitocondria.

Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$ (NCLX), del inglés *$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$ exchanger*). Es el mecanismo principal de extrusión de Ca^{2+} de la mitocondria. NCLX se sitúa en las crestas mitocondriales y es el único intercambiador de la familia NCX que también controla el intercambio de $\text{Li}^+/\text{Ca}^{2+}$. Generalmente NCLX moviliza 3 iones Na^+ por cada Ca^{2+} que extrae. Sin embargo, esta estequiometría no es clara y puede ser 2:1. Independientemente de la relación exacta, la actividad de NCLX resulta en un flujo neto de entrada de protones a la matriz mitocondrial. NCLX se expresa en todos los tejidos, pero sus niveles son mayores en páncreas, musculo esquelético y estómago. Cuanto mayor sea la expresión de NCLX, más rápida será la salida de Ca^{2+} de la mitocondria contrarrestando la entrada de Ca^{2+} , por lo que NCLX podría ser el componente limitante del intercambio de Ca^{2+} en la mitocondria (Boyman *et al.*, 2013; Palty *et al.*, 2010). NCLX puede funcionar de manera reversa en ciertas condiciones patológicas donde la mitocondria se despolariza. Si la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ es muy alta con respecto a la matriz mitocondrial, NCLX puede funcionar de manera reversa e introducir Ca^{2+} a través de la MMI mientras saca Na^+ (Garbincius and Elrod, 2022).

Intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (HCX), del inglés *$\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger*). El intercambiador HCX se encuentra expresado en orgánulos ácidos como la mitocondria. Puede producir la salida de un ion de Ca^{2+} en favor de la entrada de dos o tres H^+ . El HCX mitocondrial se ha identificado como la proteína LETM1 (del inglés *leucine zipper and EF-Hand containing transmembrane protein 1*). Es una proteína que contiene dos motivos EF (dos hélices α perpendiculares unidas por una pequeña región) que se pueden unir a Ca^{2+} . LETM1 se localiza específicamente en la MMI, aunque

también se ha detectado en RE. En condiciones normales, LETM1 es importante en la salida de Ca^{2+} . Cuando se reduce la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ o se acidifica el citoplasma, LETM1 puede sacar Ca^{2+} de la mitocondria a la vez que introduce H^+ . Sin embargo, en ciertas condiciones de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ o gradiente de pH, LETM1 puede captar Ca^{2+} al interior de la mitocondria. Por lo tanto, LETM1 puede introducir y/o sacar Ca^{2+} de la mitocondria a la vez que transporta protones dependiendo de las condiciones del interior celular (Endele *et al.*, 1999; Garbincius and Elrod, 2022; Jiang *et al.*, 2009).

El poro de permabilidad transitoria mitocondrial (mPTP). El mPTP es un canal de alta conductividad que abarca la MME y la MMI. Su papel principal es la inducción de la despolarización mitocondrial tras estímulos de estrés que provoca la ruptura mitocondrial y la necrosis celular. El mPTP también puede limitar la acumulación de Ca^{2+} en la mitocondria promoviendo la liberación a través del poro mediante un término denominado “*flickering*” o parpadeo. Esta salida es debida a un gradiente de concentración de Ca^{2+} entre la matriz mitocondrial y el citoplasma (Bernardi, 1999).

2.3. Entrada de Ca^{2+} operada por depósitos.

La entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE) es el proceso por el cual la disminución de la concentración de Ca^{2+} en el RE induce el aumento de la permeabilidad a este catión a través de la MP. Fue descrita por primera vez en 1986 por James W. Putney, quien propuso un modelo de entrada de Ca^{2+} dependiente del vaciado de los depósitos intracelulares. Esta entrada tenía lugar en dos fases: un vaciado inicial de los depósitos por acción del IP_3 seguido de una entrada rápida de Ca^{2+} a los depósitos y, si se mantenía el IP_3 , al citoplasma. En cuanto se retiraba el IP_3 , ya no se liberaba Ca^{2+} de los depósitos y la entrada desde el exterior se mantenía hasta que los depósitos alcanzaban un nivel de Ca^{2+} suficiente para inactivar esta entrada. Se propuso el término “entrada capacitativa de Ca^{2+} ” para esta entrada de Ca^{2+} directa desde el exterior a los depósitos (Putney, 1986). Más adelante, se demostró que el Ca^{2+} entraba directamente al citoplasma, sin pasar por el RE, de una manera más directa. Para ello se comparó la entrada de Ca^{2+} al citoplasma tras el vaciado de depósitos mediante el aumento de IP_3 a través de un agonista muscarínico, o mediante el uso de la tapsigargina, que liberaba Ca^{2+} de los depósitos sin provocar un aumento de IP_3 (Takemura *et al.*, 1989; Takemura and Putney, 1989).

El canal implicado en esta entrada de Ca^{2+} fue descrito más adelante, caracterizando la corriente operada por depósitos denominada I_{CRAC} (del inglés, *calcium release-activated current*) en mastocitos. La depleción de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} induce la activación de una corriente de entrada altamente selectiva de Ca^{2+} , I_{CRAC} , por la cual las células no excitables mantienen elevados niveles de Ca^{2+} intracelular y rellenan sus depósitos (Hoth and Penner, 1992). Esta corriente no se activa inmediatamente tras el estímulo de vaciado, sino que lo hace de manera lenta y compleja. Además, la corriente es pequeña y altamente selectiva de Ca^{2+} , aunque permite la entrada de Na^+ en ausencia de cationes divalentes, y se inactiva por el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular (Hoth and Penner, 1993).

Con estos descubrimientos se estableció que la depleción de Ca^{2+} del RE activaba canales permeables a Ca^{2+} en la MP. Durante años se llevaron a cabo estudios para identificar los mecanismos para activar estos canales de la MP desde el RE y cuál era la naturaleza de estos canales. Algunos estudios apuntaban a moléculas como el ácido araquidónico o productos del citocromo P450 como mecanismos para activar estos canales. En cuanto a su naturaleza, al inicio se puso el foco en los canales de la subfamilia TRPC (Putney, 2017). No fue hasta 2005 cuando se identificó STIM (del inglés *stromal interaction molecule*) como la molécula crítica para la activación de I_{CRAC} . Se propuso que la depleción de los depósitos causaba la agregación de estas moléculas en sitios cercanos a la MP (Liou *et al.*, 2005; Roos *et al.*, 2005). Un año más tarde se identificó la subunidad que forma el poro de los canales CRAC: Orai, una pequeña proteína que hasta entonces no tenía función asignada. Esta proteína, necesaria en SOCE, se propuso como modulador de los canales CRAC más que como propio canal (Feske *et al.*, 2006; Vig *et al.*, 2006), aunque rápidamente se identificó como el elemento formador del poro del canal (Prakriya *et al.*, 2006; Yeromin *et al.*, 2006).

Actualmente se conoce que la entrada capacitativa o SOCE está mediada por la interacción de las variantes de STIM1 y Orai1, pero que además pueden participar otras moléculas como veremos a continuación. Además, los canales CRAC cuentan con varios mecanismos de inactivación, donde orgánulos como la mitocondria pueden ser muy importantes.

2.3.1. Complejo STIM-Orai1.

En mamíferos, la familia de proteínas STIM tiene dos miembros: STIM1 y STIM2. STIM1 tiene una expresión ubicua y puede regular los canales SOC (Roos *et al.*, 2005). STIM1 se sitúa en la membrana de RE y controla la apertura de los canales CRAC (Liou *et al.*, 2005). STIM1 tiene un extremo N-terminal situado hacia el lumen del RE, un único segmento TM y una porción citoplasmática. La parte situada en el lumen del RE contiene la secuencia de localización, dos motivos mano EF de unión a Ca^{2+} y un dominio SAM (del inglés *sterile- α -motif*) para la interacción proteína-proteína. En la parte citoplasmática se encuentran tres regiones de hélices superenrolladas (*coiled coil* o CC), una región rica en serinas y prolina y una región polibásica rica en lisinas (Hogan *et al.*, 2010; Stathopoulos *et al.*, 2008). En la parte citosólica se encuentra la región para la interacción con los canales SOC. Esta región recibe diferentes nombres y abarca diferentes aminoácidos: región de activación STIM-Orai o SOAR (del inglés *STIM-Orai activating region*), dominio de activación del canal CRAC o CAD (del inglés *CRAC-activating domain*) o pequeño fragmento de activación de Orai1 u OASF (del inglés *Orai1-activating small fragment*) (Muik *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009). En la estructura izquierda de la figura 12 se puede ver la localización de estos dominios. También se ha descrito un dominio de inhibición de C-terminal (CITD, del inglés *C-terminal inhibitory domain*) que puede modular la función de STIM1 a través de la interacción con el modulador SARAF (del inglés *SOCE-associated regulatory factor*), una proteína del RE que responde a altos niveles de Ca^{2+} citosólico tras el relleno de depósitos mediante la inactivación de STIM (Palty *et al.*, 2012). Cuando STIM1 está en reposo, la parte luminal está unida al Ca^{2+} del RE mientras que la parte citosólica aparece plegada, ocultando el dominio SOAR. STIM1 aparece formando dímeros unidos por los motivos CC. Al activarse por el vaciado de los depósitos, la parte citosólica de STIM1 se despliega, dejando descubierto el dominio SOAR, el cual puede interaccionar con los canales Orai1 de la membrana (figura 12). Entonces se produce la entrada de Ca^{2+} por Orai1 (Hogan *et al.*, 2010; Johnstone *et al.*, 2010).

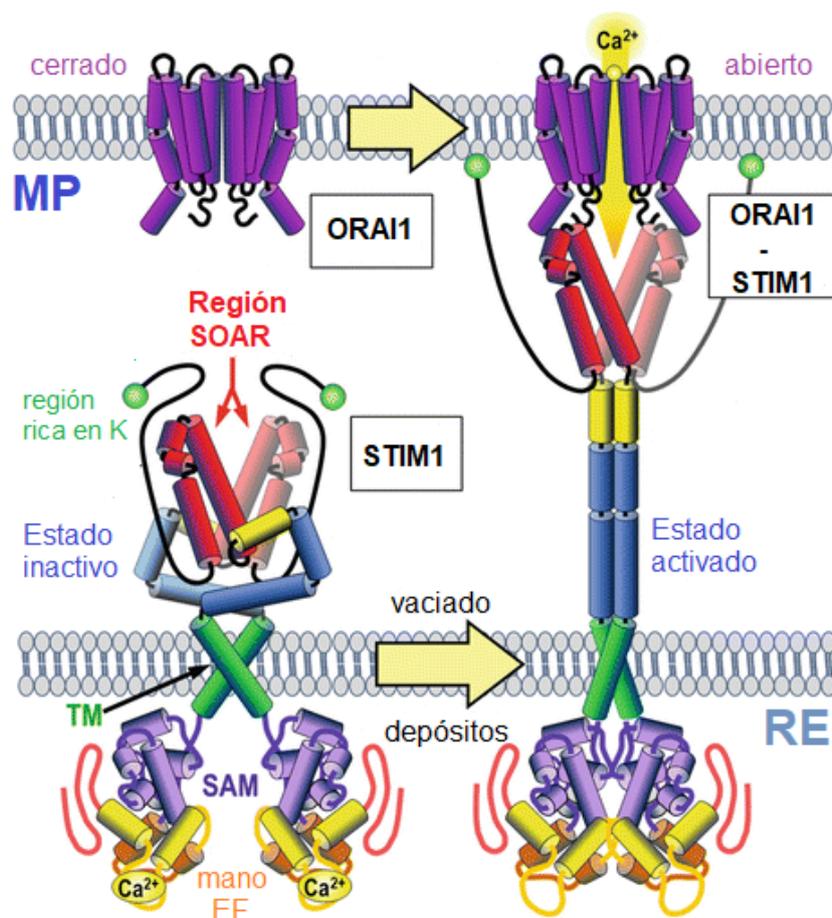


Figura 12. Mecanismo de interacción STIM1-Orai1. La forma inactiva (izquierda) del dímero de STIM1 permanece plegada, ocultando la región SOAR con Ca^{2+} unido en la región luminal del RE. La forma cerrada de Orai1 (izquierda) puede moverse por la MP. Cuando se vacían los depósitos, STIM1 se despliega (derecha) y se une directamente con Orai1 en la MP mediante la región SOAR, activando la entrada de Ca^{2+} . La región rica en lisinas, en verde, ayuda a estabilizar la unión de STIM1 a la MP hasta que los depósitos se rellenan completamente. Figura adaptada de (Nwokonko *et al.*, 2017).

STIM2, el otro miembro de la familia STIM, tiene una mayor afinidad por el Ca^{2+} que STIM1, por lo que se cree que se puede activar en respuesta a disminuciones moderadas de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ (Brandman *et al.*, 2007). STIM2 es exclusivo del RE y se expresa en todos los tejidos, aunque en menor cantidad que STIM1. Su papel en SOCE es diferente dependiendo del tipo celular. También es capaz de activar Orai1 independientemente del vaciado de los depósitos (Gilio *et al.*, 2010).

La otra parte del complejo la forman las proteínas Orai. La familia de proteínas Orai consta de tres proteínas homologas (Orai1, Orai2, Orai3). Todas ellas constan de cuatro hélices TM y las regiones N y C terminal orientadas hacia el citosol celular. El

poro del canal se encuentra en el TM1 y el resto de dominios TM se encuentran compactados alrededor del poro (Hou *et al.*, 2012). Orai1 se identificó como la subunidad clave que forma el poro en los canales CRAC o moduladora de los canales CRAC (CRACM1). Orai1 es una proteína de la superficie celular ampliamente expresada, pero que no comparte homología de secuencia con otros canales iónicos previamente identificados (Prakriya, 2009). Orai1 aparece predominantemente como un dímero en la MP en condiciones basales. Tras la interacción con STIM1, los dímeros de Orai1 dimerizan, formando tetrameros (Penna *et al.*, 2008). Otros estudios sugieren que Orai1 puede aparecer formando hexámeros o estructuras hexaméricas como trímeros de dímeros (Cai *et al.*, 2016; Yen *et al.*, 2016). Parece ser que la forma hexamérica de Orai1 es permeable a Ca^{2+} y a otros cationes monovalentes, mientras que la forma tetramérica es la encargada de la conductancia selectiva de Ca^{2+} característica de los canales CRAC (Thompson and Shuttleworth, 2013). El dominio C-terminal de Orai1 es necesario para la interacción con STIM1, concretamente una zona de hélice superenrollada (CC), que sirve tanto para la interacción entre proteínas ORAI1 como para la unión ORAI1-STIM1. Durante la unión con STIM1, los dos dominios CC se abren y permiten la interacción con el dominio SOAR de STIM1. El extremo C-terminal es importante en la apertura del canal, mientras que el extremo N-terminal contribuye a estabilizar la unión ORAI1-STIM1 (Prakriya, 2013).

En las células de mamíferos se expresan otras dos proteínas de esta familia: Orai2 y Orai3. Se diferencian en el extremo C-terminal y en el bucle formado entre los segmentos TM3 y TM4. Las tres isoformas participan en SOCE cuando aparece STIM1 y se expresan en todos los tejidos. Sin embargo, ORAI1 es la forma predominante en procesos de SOCE en la mayoría de tipos celulares (Gwack *et al.*, 2007; Lis *et al.*, 2007).

En situación basal, cuando los depósitos están llenos, STIM1 se encuentra inactivo formando dímeros a lo largo de la membrana del RE. Mediante los motivos mano EF, STIM1 mantiene unido Ca^{2+} dentro del RE. La porción citosólica permanece plegada, como se ve en la figura 12, ocultando la región SOAR. Cuando disminuye la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ por debajo de 300-500 μM por la síntesis de IP_3 o estímulos farmacológicos, las moléculas de Ca^{2+} unidas a STIM1 se liberan, permitiendo el cambio conformacional de STIM1. Entonces STIM1 se transloca a regiones del RE cercanas a la MP llamadas *puncta* donde oligomeriza. El cambio conformacional en la parte luminal de STIM1 provoca un giro en los dominios TM que deriva en el despliegue de la parte citosólica de la proteína STIM1, de manera que queda expuesto el dominio SOAR. Este dominio

puede interactuar físicamente con los extremos N y C-terminales de Orai1, abriendo el canal y permitiendo la entrada de Ca^{2+} . La interacción STIM1-Orai1 activa SOCE y la corriente I_{CRAC} en las regiones punta y todo el proceso se revierte cuando los depósitos de Ca^{2+} se llenan de nuevo (Noble *et al.*, 2020; Putney, 2017). Un esquema de SOCE se muestra en la figura 13.

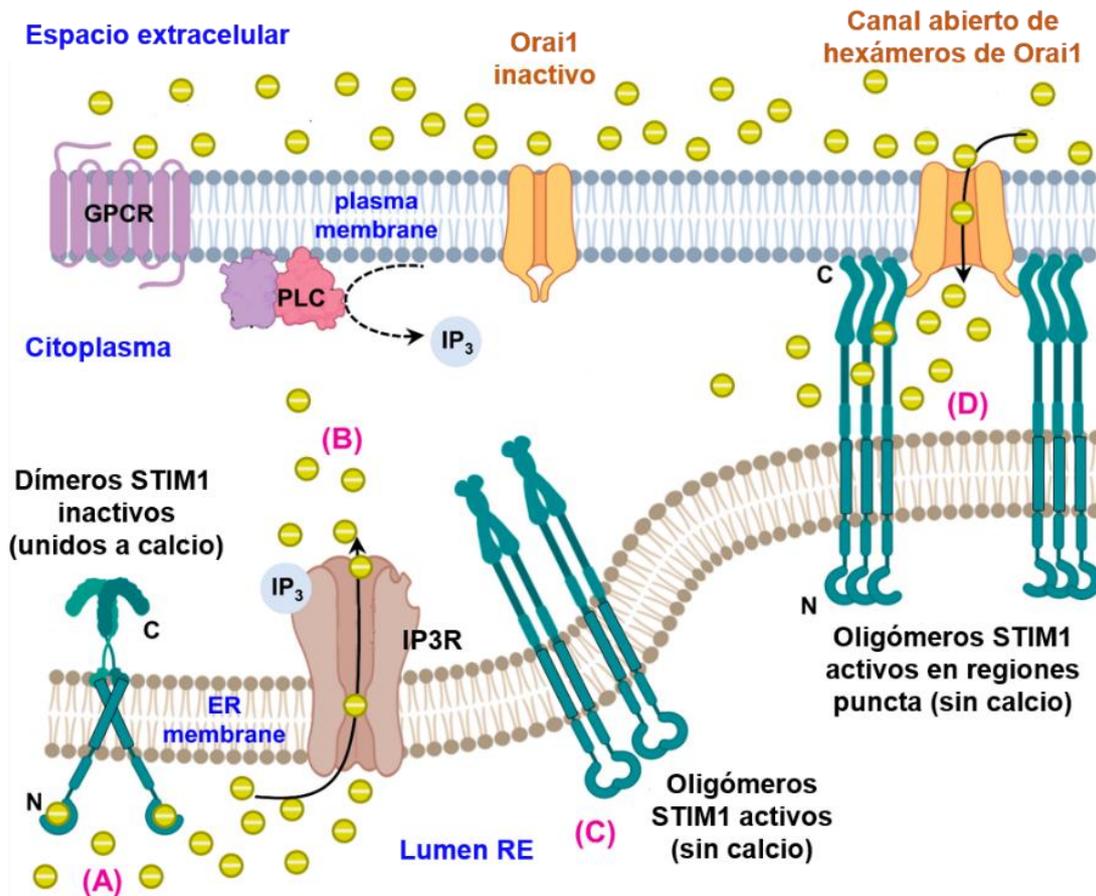


Figura 13. Entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE). (A) Cuando el RE está lleno, STIM1 permanece inactivo formando dímeros en una conformación compacta unida a Ca^{2+} . (B) Tras la estimulación celular, se produce IP_3 , que se une a su receptor y provoca la liberación de Ca^{2+} al citoplasma, vaciando los depósitos. (C) La separación del Ca^{2+} de STIM1 provoca un cambio de conformación que da lugar a la oligomerización de moléculas STIM1 y la extensión de la parte citoplasmática de la proteína. (D) Los oligómeros de STIM1 desplegados se colocan en las zonas punta del RE cercanas a la MP donde interactúan con Orai1. Los hexámeros de Orai1 forman los canales CRAC que se abren y permiten la entrada de Ca^{2+} al citoplasma. Figura adaptada de (Noble *et al.*, 2020).

2.3.2. Canales TRPC y SOCE: papel de TRPC1.

Los primeros estudios en busca de los canales responsables de las corrientes I_{CRAC} ponían su foco en la subfamilia de canales TRPC debido a su interacción con la fosfolipasa C o los receptores de IP_3R . Sin embargo, diferentes estudios mostraron que las corrientes de TRPC son mayores que las corrientes I_{CRAC} y, además, no son selectivas de Ca^{2+} . Estas corrientes, denominadas I_{SOC} (del inglés *store-operated currents*), permiten la entrada de otros cationes además de Ca^{2+} y presentan una mayor conductancia que las corrientes I_{CRAC} (Parekh and Putney, 2005).

Las proteínas TRPC, como el resto de las proteínas TRP, tienen 6 dominios TM, regiones N y C-terminal citosólicas y un bucle que forma el poro entre los segmentos TM5 y TM6. En la región C-terminal se incluye un motivo característico de los canales TRP implicado en la activación del canal y una región CIRB (del inglés *calmodulin/IP₃ receptor-binding*) implicada en la regulación de la apertura del canal (Lopez *et al.*, 2020a). Se ha visto que TRPC1 puede formar un complejo con STIM1 y Orai1, responsable de la corriente I_{SOC} . Esta corriente puede ser la suma de la corriente I_{CRAC} y la corriente a través de TRPC (Cheng *et al.*, 2011), o bien la corriente I_{SOC} implica complejos canales que incluyen TRPC1 y Orai1 (Ong *et al.*, 2013).

TRPC1 fue el primer canal TRPC identificado en mamíferos (Wes *et al.*, 1995). El gen que codifica TRPC1 en humanos consta de 13 intrones y 13 exones y se localiza en el cromosoma 3. El gen *TRPC1* da lugar al menos a 4 variantes en humanos. TRPC1 se expresa en la membrana plasmática de células de numerosos tejidos y líneas celulares. La estructura de TRPC1 es similar al resto de miembros de la familia TRP (figura 14). Tiene 6 segmentos TM y el poro se sitúa entre los segmentos TM5 y TM6 (Dohke *et al.*, 2004). Tanto los extremos N-terminal como C-terminal son citosólicos. En el extremo C-terminal, además del motivo característico de TRP y la región CIRB se encuentran dos aminoácidos cargados negativamente que permiten la interacción proteína-proteína con STIM1 (Dohke *et al.*, 2004). TRPC1 puede formar multímeros a través de uniones por los dominios denominados repeticiones de anquirina, por su similitud con esta proteína, también presentes en otros TRPC (Lepage *et al.*, 2006; Nesin and Tsiokas, 2014).

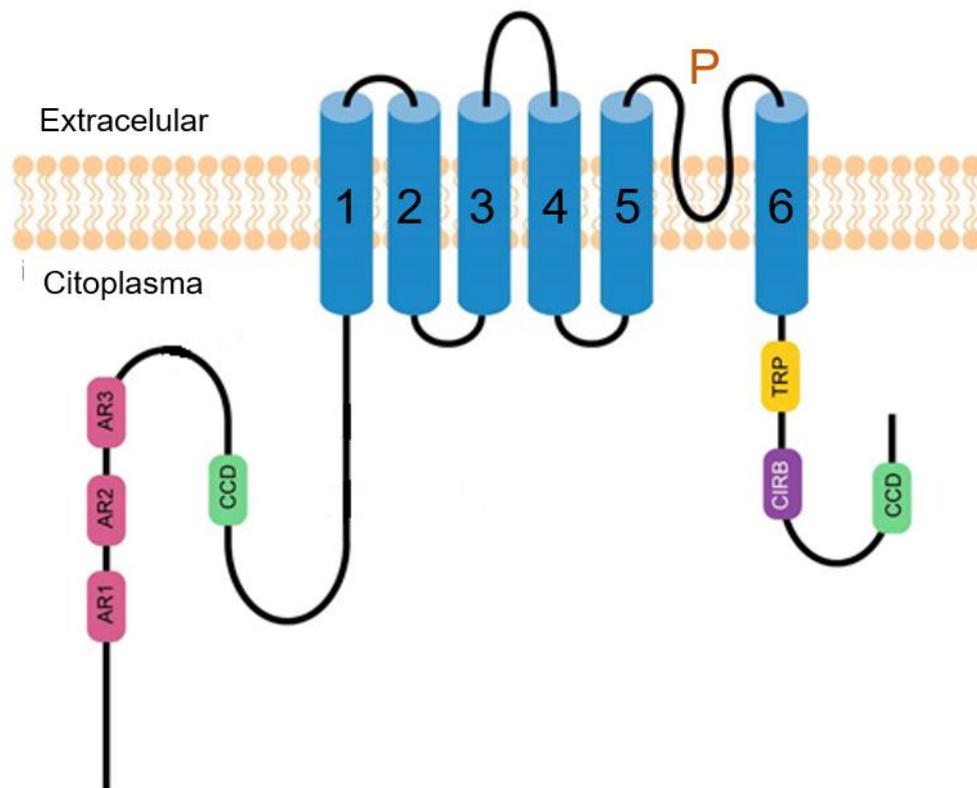


Figura 14. Esquema de la estructura de TRPC1. TRPC1 se inserta en la membrana plasmática a través de 6 segmentos transmembrana, en azul. La región del poro (P) se sitúa entre los dos últimos segmentos. El extremo N-terminal consta de los dominios llamados repeticiones de anquirina (AR, en rosa) que permiten la multimerización del canal. Encontramos dominios de hélice superenrollada (CCD, en verde) tanto en la parte N-terminal como C-terminal del citosol. En el C-terminal también podemos encontrar la región de unión a calmodulina o IP3R (CIRB, en morado) y la caja TRP, en amarillo, común a la superfamilia de canales TRP. Ambas regiones están relacionadas con la apertura y actividad del canal. Figura adaptada de (Liu *et al.*, 2020).

TRPC1 puede contribuir a SOCE en un amplio rango de células y la entrada de Ca^{2+} mediada por TRPC1 está asociada con la regulación de diferentes procesos como la migración o la proliferación celular (Ambudkar *et al.*, 2017). STIM1, Orai1 y TRPC1 pueden formar un complejo dinámico que media la corriente I_{SOC} . En condiciones basales, STIM1 se distribuye por todo el RE y TRPC1 se sitúa en la MP co-localizando con Orai1, pero también en el citosol. Tras el vaciado de los depósitos, STIM1 se activa, oligomeriza y se transloca hacia zonas más cercanas a la MP donde, a través de su dominio SOAR, puede interactuar con Orai1 y TRPC1.

Mediante esta interacción, Orai1 se abre y permite la entrada de Ca^{2+} . Sin embargo, la activación de TRPC1 requiere la interacción de lisinas del dominio rico en este aminoácido de STIM1 con residuos de carga negativa del canal TRPC1. No se

conocen dominios de interacción directa entre Orai1-TRPC1, por lo que ésta podría estar mediada por STIM1 u otras proteínas (Lopez *et al.*, 2020b). Uno de los modelos propuestos sugiere que el vaciado de los depósitos provoca la entrada de Ca^{2+} a través del complejo STIM1-Orai1, lo que promueve un aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en esa región. Este aumento es el que provoca la translocación de TRPC1 hacia el complejo, permitiendo su unión y la entrada de Ca^{2+} (figura 15 izquierda). Por lo tanto, la corriente I_{SOC} estaría mediada por el complejo STIM1-Orai1-TRPC1 (Cheng *et al.*, 2011). Por otro lado, estudios sugieren que la corriente I_{SOC} se debe a una asociación entre STIM1-TRPC1, sin Orai1 (figura 15 derecha). Esta interacción también puede incluir otras proteínas como TRPC4 y la corriente es mayor si se integra Orai1 en el complejo (Antigny *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2017).

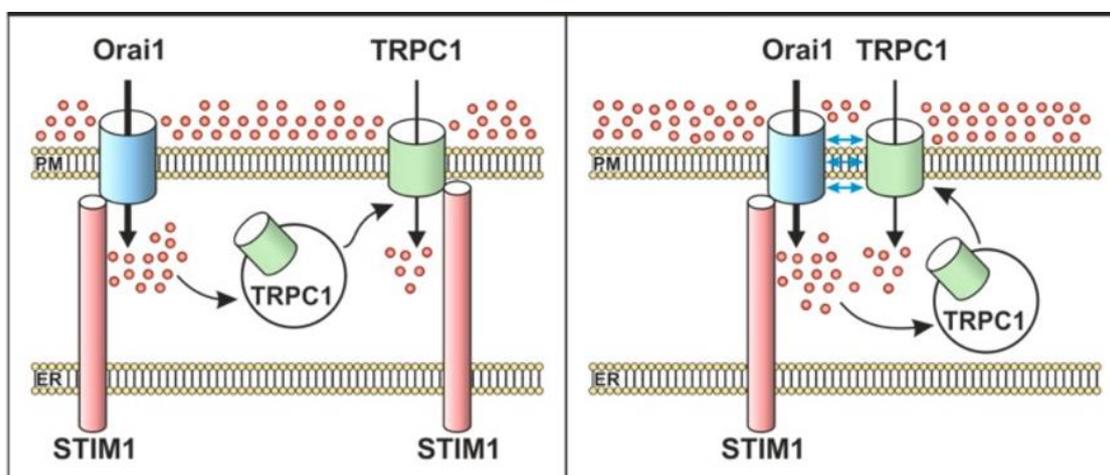


Figura 15. Activación de los canales TRPC1 tras el vaciado de depósitos. En estado de reposo, TRPC1 está distribuido a lo largo de la membrana plasmática o en el citosol. Tras el vaciado de los depósitos, se produce una entrada de Ca^{2+} a través de Orai1 que puede inducir la translocación de TRPC1 a la MP donde es activado por STIM1 y permite la entrada de Ca^{2+} (panel izquierdo), o bien Orai1 participa activamente en la activación de TRPC1, el cual forma un complejo con Orai1 y STIM1 por el que se produce la entrada de Ca^{2+} (panel derecho). Figura adaptada de (Lopez *et al.*, 2020b).

Si las proteínas TRPC forman un canal con Orai1 y STIM1 para permitir la entrada de Ca^{2+} o bien lo transportan por ellas mismas no está del todo claro. Sin embargo, cada vez hay más evidencias de que los canales TRPC juegan un papel en la conformación de señales de Ca^{2+} a través de Orai1. Los canales TRPC permiten la entrada de Ca^{2+} y de Na^{+} con diferente selectividad según la isoforma. La entrada de estos cationes se realiza a favor de gradiente y puede atenuar la entrada de Ca^{2+} a través de Orai1 de dos maneras: induciendo la inactivación de Orai1 dependiente de Ca^{2+} o bien disminuyendo

la fuerza de entrada de Ca^{2+} por una despolarización de la membrana (Lopez *et al.*, 2020b). Además, la entrada de Na^+ a través de TRPC podría favorecer la extrusión de Ca^{2+} de la mitocondria a través del intercambiador NCLX resultando en una mayor inactivación dependiente de Ca^{2+} (Villalobos *et al.*, 2018).

2.3.3. Regulación de SOCE.

Debido a la relevancia funcional que tiene SOCE en las células, este mecanismo se encuentra regulado de manera muy precisa, ya sea a través de diferentes moléculas moduladoras, cambios en las condiciones fisicoquímicas o por el propio Ca^{2+} .

La inactivación de la corriente I_{CRAC} dependiente de Ca^{2+} se puede producir de dos maneras: una inactivación rápida, producida en milisegundos, o una inactivación lenta que ocurre segundos más tarde. La inactivación rápida se debe a la acumulación de Ca^{2+} en microdominios citosólicos cercanos a los canales CRAC. No está muy claro este mecanismo, pero se cree que el Ca^{2+} se puede unir a ciertos residuos de Orai1 y/o STIM1 provocando un cambio conformacional en el complejo STIM1-Orai1 que bloquea el poro del canal CRAC (Parekh, 2017). La inactivación lenta dependiente de Ca^{2+} , por el contrario, depende de aumentos globales de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ e implica otras moléculas o compartimentos celulares como SARAF o la mitocondria. El papel de la mitocondria en la regulación de SOCE será discutido en el siguiente punto.

SARAF es una proteína transmembrana de tipo I que se localiza en la membrana del RE o en la MP donde su expresión es regulada por STIM1. La región N-terminal de SARAF es esencial para su actividad, mientras que la región C-terminal se encarga de la interacción con STIM1 y la migración hacia las uniones PM-RE. SARAF puede interactuar con STIM1 modulando los flujos de Ca^{2+} . En condiciones basales, SARAF interactúa con la región SOAR de STIM1 para prevenir la activación espontánea de SOCE. Cuando se produce el vaciado de los depósitos, el cambio conformacional de STIM1 induce la disociación de SARAF del dominio SOAR y facilita la activación de SOCE (figura 16). Tras la activación de SOCE, SARAF puede volver a interactuar con STIM1, dando lugar a la inactivación lenta dependiente de Ca^{2+} (Palty *et al.*, 2012). También se ha visto que SARAF puede interactuar con Orai1 y TRPC1, modulando su actividad. En ausencia de STIM1, es SARAF quien aumenta la activación de Orai1

mientras que disminuye la de TRPC1, probablemente como mecanismo de atenuación de la entrada de otros cationes en favor del Ca^{2+} (Albarran *et al.*, 2017).

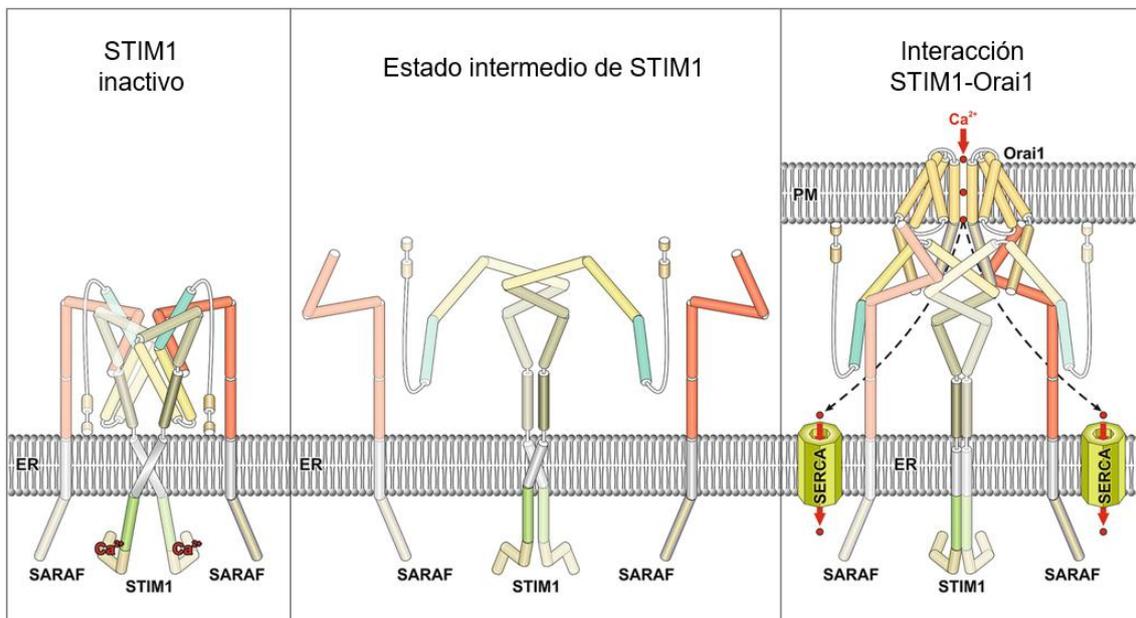


Figura 16. Interacción STIM1-SARAF. En estado de reposo (panel izquierdo), STIM1 aparece como dímero unido Ca^{2+} en el extremo del lumen del RE. Su extremo citosólico aparece plegado, ocultando la región SOAR. En este estado, SARAF se une a la región SOAR de STIM1. Según se vacían los depósitos, STIM1 se activa (panel central) por la disociación del Ca^{2+} del motivo EF y comienza el cambio conformacional de STIM1 desplegando la parte citoplasmática, provocando la separación de SARAF. Cuando STIM1 se estira completamente interacciona con el canal Orai1 de la MP (panel derecho) y, unos segundos después de la entrada de Ca^{2+} , SARAF se une nuevamente a STIM1, iniciando la inactivación lenta dependiente de Ca^{2+} . El Ca^{2+} que entra al citoplasma se bombea dentro del RE a través de SERCA. PM: membrana plasmática; ER: retículo endoplásmico. Figura adaptada de (Lopez *et al.*, 2020a).

Además de SARAF, existen otros moduladores de SOCE como las proteínas ORMDL3 (del inglés *orosomucoid-like 3*) o CRACR2A (del inglés *CRAC regulator 2A*). ORMDL3 es una proteína que se encuentra en la membrana del RE que puede modular la corriente I_{CRAC} y, por lo tanto, SOCE. Para ello, ORMDL3 inhibe el mecanismo de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, de manera que disminuye la captación mitocondrial de Ca^{2+} lo que resulta en una inactivación lenta de SOCE (Carreras-Sureda *et al.*, 2013). CRACR2A es una proteína que contiene un motivo mano-EF y que funciona como regulador de la interacción Orai1-STIM1. CRACR2A interacciona directamente con las regiones citoplasmáticas de Orai1 y STIM1 formando un complejo. CRACR2A actúa como sensor de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ y modula la translocación y formación de los complejos Orai1-STIM1 (Srikanth *et al.*, 2010).

2.3.4. Control mitocondrial de SOCE.

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos, en continuos procesos de fusión y fisión según el entorno celular (Archer, 2013). También se ha visto que las mitocondrias pueden moverse por la célula, establecer interacciones con la MP e incluso moverse entre diferentes células adyacentes (Montes de Oca Balderas, 2021). De hecho, en los últimos años, se están desarrollando nuevas estrategias terapéuticas que consisten en el trasplante o la transferencia mitocondriales. Se ha visto que el trasplante de mitocondrias puede promover la regeneración y restauración muscular tras un daño (Alway *et al.*, 2023). Estas nuevas estrategias terapéuticas enfocadas en la transferencia de mitocondrias pueden ser una herramienta prometedora para el tratamiento enfermedades mitocondriales (Zhang and Miao, 2023) u otras patologías como el Parkinson (Jain *et al.*, 2023).

El enorme dinamismo es consistente con una gran importancia de la mitocondria en funciones celulares incluyendo un papel central en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. El papel de la mitocondria en el control de SOCE y los canales SOCs se debe a la capacidad de este orgánulo de captar Ca^{2+} . Esta captación de Ca^{2+} sucede gracias a la combinación del potencial negativo tan alto a través de la MMI por el bombeo de protones junto con la presencia del canal MCU selectivo de Ca^{2+} (Gilabert and Parekh, 2000; Hoth *et al.*, 1997).

La mitocondria puede regular SOCE de diferentes maneras: previniendo la inactivación de los canales CRAC dependiente de Ca^{2+} o promoviendo directamente la inactivación de Orai1 (figura 17). Tras la activación de SOCE, se produce una entrada de Ca^{2+} a través de los canales CRAC. Esto propicia que se formen microdominios de Ca^{2+} cercanos a estos canales que pueden promover la inactivación rápida de los canales CRAC dependiente de Ca^{2+} . Las mitocondrias pueden captar Ca^{2+} de esos microdominios, de manera que previenen la inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} de estos canales, lo que promueve el mantenimiento de SOCE (Hoth *et al.*, 2000).

Las mitocondrias activas también pueden controlar la inactivación lenta dependiente de Ca^{2+} de los canales CRAC. Al retirar Ca^{2+} del citoplasma, las mitocondrias favorecen que se ralentice el relleno de los depósitos, lo que mantiene SOCE, a través de la captación de Ca^{2+} en el citosol, lo cual previene la inactivación lenta de los canales CRAC (Gilabert and Parekh, 2000). Estos mecanismos van a prevenir la inactivación de los canales CRAC dependiente de Ca^{2+} , lo que mantiene la

actividad de estos canales, la entrada de Ca^{2+} a través de ellos y, por ende, la señalización por Ca^{2+} (Villalobos *et al.*, 2018).

El vaciado de los depósitos también propicia la entrada de Na^+ a la célula. Este Na^+ es necesario para el funcionamiento de NCLX, el sistema principal de extrusión de Ca^{2+} de la mitocondria. La salida de Ca^{2+} de la mitocondria es muy importante para el control de la actividad de Orai1. Un aumento de Ca^{2+} en este orgánulo promueve la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales pueden salir de la célula y oxidar la cisteína 195 del tercer segmento TM de Orai1, lo que provoca la inactivación del canal (Ben-Kasus Nissim *et al.*, 2017).

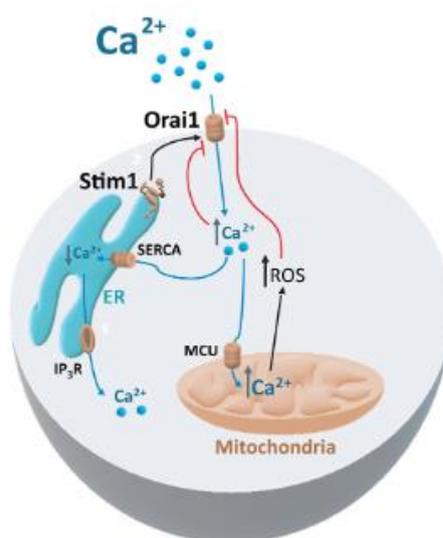


Figura 17. Control mitocondrial de SOCE. Tras el vaciado de los depósitos, se activa la entrada de Ca^{2+} . Esta entrada se puede inactivar por el propio Ca^{2+} , o bien por la generación de ROS en la mitocondria, que inactivan el canal Orai1. La mitocondria puede retirar Ca^{2+} del citoplasma a través de manera que previene la inactivación dependiente de Ca^{2+} (Villalobos *et al.*, 2018).

2.4. Entrada de Ca^{2+} mediada por el canal Orai1 independiente de depósitos.

En los últimos años se ha descrito una entrada de Ca^{2+} independiente de depósitos que puede regular procesos tumorales. Esta entrada, que implica al canal Orai1, se conoce como SICE (del inglés *store-independent Ca²⁺ entry*). SICE puede ser inducida por el ácido araquidónico o su metabolito el leucotrieno C4 y regulada a través de los canales Orai1 y Orai3, o puede activarse mediante el emparejamiento funcional de Orai1

y SPCA2. Además de estos dos mecanismos, SICE también puede ser mediada por canales dependientes de voltaje o canales de potasio como el canal SK3 o $K_{Ca2.3}$, o el canal $K_v10.1$ (Cantonero *et al.*, 2019; Chamli *et al.*, 2021). Nos centraremos en los mecanismos de SICE que implican la participación de SPCA2, ya que hemos visto que esta ATPasa se encuentra sobreexpresada en las células de CCR (Villalobos *et al.*, 2017).

Se ha visto que SPCA2 puede activar la entrada de Ca^{2+} mediada por Orai1 en células de tumores mamarios (figura 18). Esta entrada es independiente de la actividad ATPasa de SPCA2 y requiere la interacción de SPCA2 y Orai1. La asociación SPCA2-Orai1 implica ambos extremos de SPCA2: el extremo N-terminal interacciona físicamente con Orai1, facilitando la accesibilidad de la región C-terminal de SPCA2 al canal de Ca^{2+} . En ese momento, Orai1 se activa y permite la entrada de Ca^{2+} a la célula promoviendo el desarrollo tumoral a través de la activación de la vía Ras-ERK (Feng *et al.*, 2010).

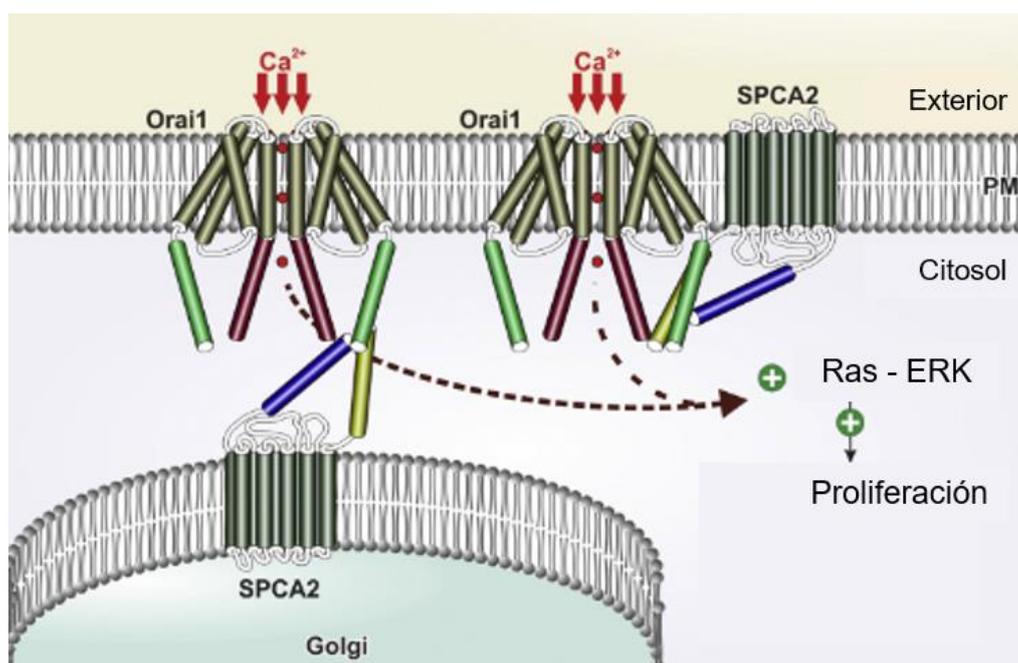


Figura 18. Entrada de Ca^{2+} favorecida por la interacción Orai1-SPCA2. SPCA2, localizada en la MP o en la membrana de Golgi puede interactuar físicamente con Orai1 a través de sus extremos N y C terminal. El canal Orai1 se activa y entra Ca^{2+} a la célula, el cual favorece la proliferación a través de la activación de la vía Ras-ERK. Figura adaptada de (Cantonero *et al.*, 2019).

También se ha visto que SPCA2 puede formar un complejo con el canal de K⁺ dependiente de voltaje K_v10.1 o EAG1. Este canal pertenece a la familia de canales EAG (*ether-à-go-go*) y está sobreexpresado en varios tipos de cáncer, como el cáncer de mama o el CCR (Ding *et al.*, 2007; Hammadi *et al.*, 2012). La función de K_v10.1 se puede ver aumentada tras la unión del colágeno 1 a su receptor. Esta unión provoca la interacción de K_v10.1 con Orai1 en la membrana plasmática y activa SICE Orai1 (Badaoui *et al.*, 2017). En este proceso, SPCA2 puede aumentar la expresión de K_v10.1 y Orai1 en la membrana y, por lo tanto, aumenta SICE. La actividad de las tres proteínas es necesaria para mediar SICE en este contexto y esta entrada de Ca²⁺ es fundamental para mantener la localización de los dos canales en la membrana y, consecuentemente, su actividad. La entrada de Ca²⁺ SICE a través de estos canales promueve la supervivencia tumoral y regula la migración celular (Peretti *et al.*, 2019).

3. Remodelado del calcio intracelular en cáncer de colon.

3.1. Remodelado de SOCE en cáncer colorrectal.

En el proceso del cáncer se dan modificaciones o características conocidas como *hallmarks* del cáncer que confieren a las células una serie de ventajas como la resistencia a la muerte celular o la proliferación descontrolada (Hanahan and Weinberg, 2000). Muchos de estos procesos están relacionados con la señalización por Ca^{2+} . En el proceso de carcinogénesis se producen cambios en la homeostasis de Ca^{2+} , es decir, se produce un remodelado del Ca^{2+} (Roderick and Cook, 2008; Villalobos *et al.*, 2016). Algunos de estos cambios están relacionados con SOCE y consisten en cambios en la expresión de moléculas relacionadas con el transporte de Ca^{2+} . Estudios previos del grupo con células normales y de adenocarcinoma de colon han descrito cambios relacionados con la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en el CCR, como es la sobreexpresión de moléculas implicadas en SOCE y de canales SOC (Pérez-Riesgo *et al.*, 2017; Sobradillo *et al.*, 2014; Villalobos *et al.*, 2017).

En las células de CCR se producen cambios en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. Por un lado, las células de CCR muestran una mayor entrada de Ca^{2+} vía SOCE que es mantenida durante más tiempo. Por otro lado, las células de CCR presentan menores niveles de Ca^{2+} en los depósitos. No solo eso, si no que en las células de CCR se observan dos tipos de corrientes de Ca^{2+} inducidas por el vaciado de los depósitos: por un lado, una corriente similar a I_{CRAC} , selectiva de Ca^{2+} , que aparece en células normales y tumorales, pero es mayor en las células de CCR. Por otro lado, aparece una corriente I_{SOC} no selectiva, permeable también a Na^+ que se observa en las células de CCR, pero no en las células normales y que presenta tanto un componente de entrada como de salida (Sobradillo *et al.*, 2014). Estos cambios se asocian a una expresión diferencial de canales, bombas y otros sistemas transportadores entre células normales y tumorales (Pérez-Riesgo *et al.*, 2017). A nivel molecular, se ha visto que la mayor corriente I_{CRAC} en células de CCR se debe a la sobreexpresión de las moléculas clásicas relacionadas con SOCE: STIM1 y Orai1. También se ha observado una mayor expresión de TRPC1. TRPC1 actúa como canal SOC el cual contribuye, por un lado, al aumento de la corriente I_{CRAC} y, por otro, a la aparición de esa corriente I_{SOC} no selectiva. Además, en las células de CCR se observa una disminución de STIM2 (Sobradillo *et al.*, 2014). Es decir, durante el proceso de carcinogénesis del CCR, se produce una mayor

expresión de las moléculas clásicas implicadas en SOCE, STIM1 y Orai1, y del canal TRPC1 que promueven una mayor entrada de Ca^{2+} vía SOCE (figura 19).

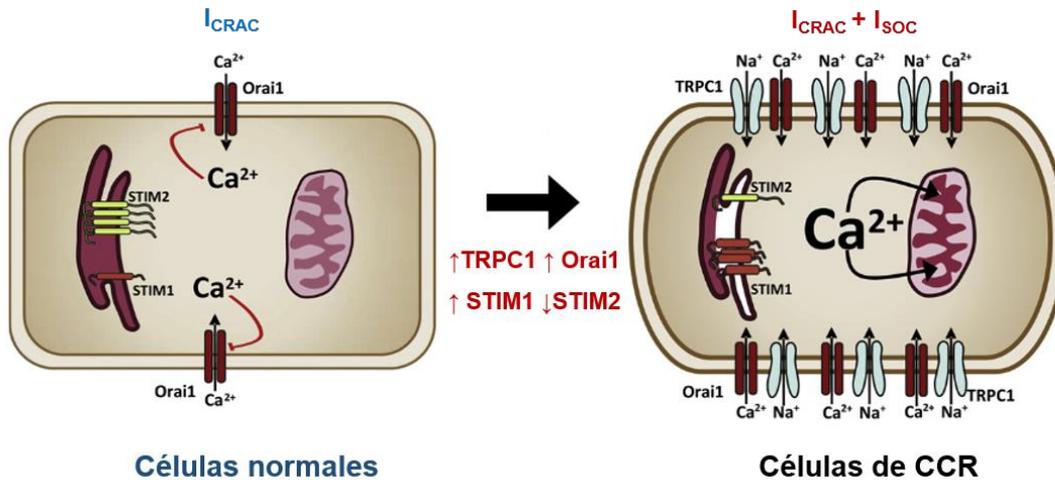


Figura 19. Remodelado de SOCE en CCR. En colonocitos normales, la entrada de Ca^{2+} vía SOCE es pequeña y los depósitos de Ca^{2+} en el RE están llenos. SOCE en estas células está mediada por Orai1 y la interacción con STIM1/STIM2. En las células de CCR, SOCE está aumentada y los depósitos de Ca^{2+} están parcialmente vacíos. En estas células SOCE está mediada por Orai1 y TRPC1, que interaccionan con STIM1. En las células de CCR se observa una corriente I_{SOC} mediada por TRPC1 que no aparece en las células normales. Figura modificada de (Villalobos *et al.*, 2019).

El remodelado del Ca^{2+} en cáncer no solo afecta a SOCE a través de la sobreexpresión de Orai1 y TRPC1, sino que también incluye cambios en otras moléculas implicadas en la homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial, en la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos y en los sistemas de liberación de Ca^{2+} al exterior. En un estudio transcriptómico llevado a cabo por nuestro grupo, se analizaron más de 100 genes y proteínas implicados en el transporte de Ca^{2+} . Este estudio reveló una expresión diferencial en VOCCs (aumento de la expresión de Cav1.3 y disminución en Cav1.2, Cav2.2 y Cav3.2 en CCR), en TRPs (aumento de la expresión TRPV6 y disminución de TRPM5, TRPP2 y TRPML2 en CCR) y en las moléculas relacionadas con SOCE (aumento de Orai2 y STIM1 en CCR y disminución del modulador de SOCE, CRACR2A, en células tumorales de CCR). También se observaron cambios en algunos sistemas de transporte de las endomembranas: $\text{IP}_3\text{R1}$ e $\text{IP}_3\text{R3}$ aparecían sobreexpresados en células de CCR mientras que $\text{IP}_3\text{R2}$ disminuía su expresión en el proceso tumoral. En la mitocondria aparecía una mayor expresión de MCU, MICU1, MICU2, VDAC2 y NCX2

en las células tumorales, mientras que VDAC1 y VDAC3 aparecían disminuidos en estas células (Pérez-Riesgo *et al.*, 2017).

3.2. Control mitocondrial de SOCE en cáncer.

La reprogramación metabólica es un rasgo característico de las células tumorales para hacer frente a la mayor proliferación celular y supervivencia. La mayor expresión de esta reprogramación es lo que se conoce como efecto Warburg, por el cual la mayoría de tumores optan por una vía metabólica glicolítica, incluso en presencia de oxígeno, asociada a deficiencias en la síntesis de ATP por la mitocondria (Warburg, 1925). La deficiencia en la síntesis de ATP aumenta el $\Delta\Psi_m$, la principal fuerza motriz para la captación de Ca^{2+} por la mitocondria a través de MCU (Bernardi, 1999; Kirichok *et al.*, 2004). Además, cambios en el $\Delta\Psi_m$ pueden hacer que el intercambiador NCLX funcione en sentido inverso introduciendo Ca^{2+} a la mitocondria (Garbincius and Elrod, 2022). Por lo tanto, cambios en el $\Delta\Psi_m$ pueden favorecer la capacidad de tamponamiento de Ca^{2+} de la mitocondria.

La capacidad de tamponamiento de Ca^{2+} de la mitocondria puede tener un impacto en la inactivación dependiente de Ca^{2+} de los canales implicados en SOCE (Gilbert and Parekh, 2000). Estudios previos del grupo han demostrado que las células de CCR tienen un $\Delta\Psi_m$ mayor que se asocia a una mayor captación de Ca^{2+} mitocondrial (Hernández-Morales *et al.*, 2017). Además, en las células de CCR hay una mayor expresión de MCU, MICU1 y MICU2, entre otros, lo que promueve la captación de Ca^{2+} por la mitocondria (Pérez-Riesgo *et al.*, 2017), aunque estas diferencias no se observasen a nivel de proteína (Hernández-Morales *et al.*, 2017). La consecuencia de la mayor captación de Ca^{2+} por la mitocondria es que aumenta su capacidad de *buffer* y puede prevenir la inactivación dependiente de Ca^{2+} de los canales CRAC (figura 20), manteniendo la entrada de Ca^{2+} vía SOCE durante más tiempo (Villalobos *et al.*, 2018).

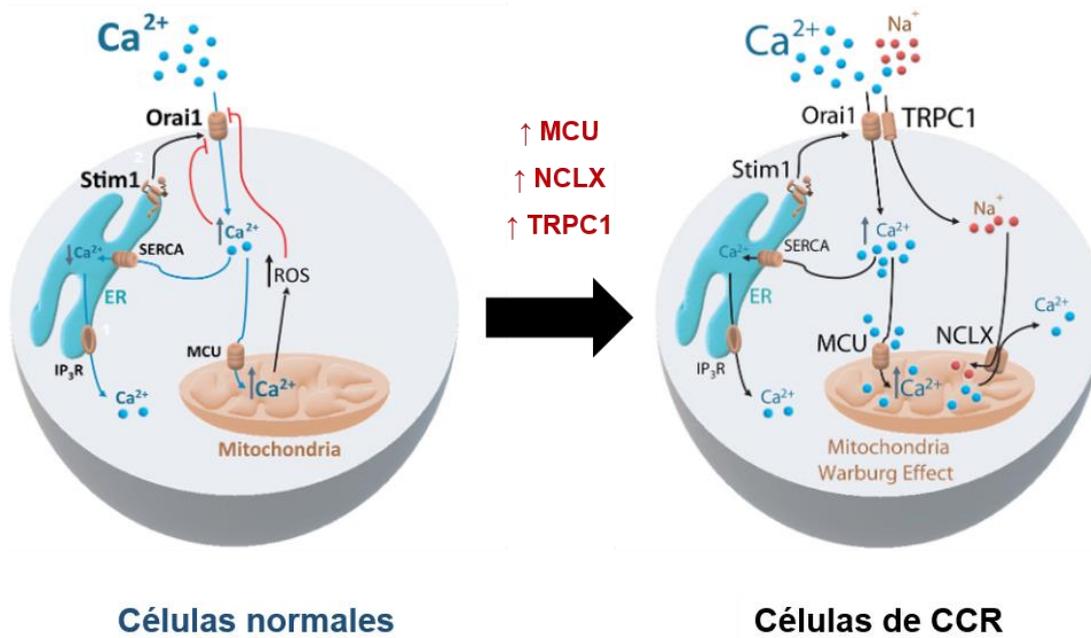


Figura 20. Control mitocondrial de SOCE. En células normales de colon, el propio Ca^{2+} favorece la inactivación de los canales SOCs. En las células de CCR donde hay una mayor expresión de MCU, la mitocondria puede captar Ca^{2+} del citosol, previniendo la inactivación de los canales SOC dependiente de Ca^{2+} . Por otro lado, la mayor expresión de NCLX y TRPC1 favorece la entrada de Na^+ a la mitocondria y el aclarado de Ca^{2+} en este orgánulo, evitando la formación de ROS y la inactivación por oxidación del canal Orai1. Figura adaptada de (Villalobos *et al.*, 2018).

Como ya hemos visto, el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ promueve la generación de ROS que pueden salir de la célula e inactivar el canal Orai1 mediante oxidación de un residuo de cisteína (Ben-Kasus Nissim *et al.*, 2017). La mayor entrada de Na^+ en las células de CCR favorecida por la sobreexpresión de TRPC1, junto con una mayor expresión del intercambiador NCLX, puede favorecer la extrusión de Ca^{2+} mitocondrial hacia el citoplasma, de manera que se evita la sobrecarga de este catión (figura 20). Por ende, la producción de ROS sería menor en las células de CCR lo que retrasaría la inactivación de Orai1 y mantendría la entrada de Ca^{2+} vía SOCE durante más tiempo (Villalobos *et al.*, 2018). Este mecanismo de eliminación de Ca^{2+} mitocondrial no sólo sería importante en la regulación de SOCE si no que podría explicar la resistencia de las células tumorales a la apoptosis ya que, si no se produce sobrecarga de Ca^{2+} , no se libera citocromo c y no se comienza el proceso de apoptosis (Berridge *et al.*, 2000).

3.3. Remodelado de otros sistemas de transporte en CCR.

Pese a que SOCE constituye la mayor vía de entrada de Ca^{2+} en células de CCR, se ha visto que en estas células hay otros sistemas de transporte de Ca^{2+} que tienen una expresión diferente a la de las células normales y pueden contribuir a la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. Algunos de estos sistemas de transporte diferencialmente expresados incluyen canales TRP que pueden introducir Ca^{2+} al citoplasma como TRPV6, TRPC5, TRPP1 y TRPP2 y sistemas de retirada de Ca^{2+} del citosol como SPCA2 o PMCA4, entre otras moléculas relacionadas con el transporte de Ca^{2+} (Pérez-Riesgo *et al.*, 2017).

El canal TRPV6 es un canal altamente selectivo de Ca^{2+} que se encarga de la absorción de Ca^{2+} en el intestino y el riñón (Clapham *et al.*, 2001). Este canal se encuentra sobreexpresado en células de cáncer de próstata, de cáncer de colon y de otros tipos de cáncer (Khattar *et al.*, 2022; Pérez-Riesgo *et al.*, 2017; Wissenbach *et al.*, 2001). TRPV6 puede aumentar la entrada de Ca^{2+} mediante un mecanismo que provoca la translocación de TRPV6 a la membrana a través de la entrada de Ca^{2+} que se produce por Orai1/TRPC1 (Raphaël *et al.*, 2014).

Otro transportador que aparece diferencialmente expresado en CCR es la ATPasa SPCA2 del aparato de Golgi (Jenkins *et al.*, 2016). SPCA2, además de retirar Ca^{2+} del citoplasma hacia Golgi, también es importante en la entrada de Ca^{2+} por activar el canal Orai1 independiente de depósitos o SICE (Feng *et al.*, 2010). SPCA2 puede aumentar la entrada de Ca^{2+} a través de la activación de las vías de SICE.

Los resultados transcriptómicos no han sido confirmados a nivel de qPCR o a nivel funcional. El papel de estos, y otros, transportadores sobre la homeostasis del Ca^{2+} y el remodelado en procesos de cáncer todavía no se conoce con certeza, por lo que es un campo con muchas posibilidades que puede poner el foco en las moléculas transportadoras de Ca^{2+} como diana terapéutica en el cáncer. Para mayor claridad, en este documento, se han agrupado bajo el término sistemas de transporte de Ca^{2+} a todas aquellas moléculas relacionadas con el transporte de Ca^{2+} , independientemente de que sean canales iónicos, proteínas intracelulares o sensores.

4. Poliaminas en cáncer de colon.

Las poliaminas son moléculas policatiónicas que contienen dos o más grupos amino y aparecen tanto en células eucariotas como procariotas. Las poliaminas están relacionadas con la estimulación de la proliferación celular, la diferenciación celular, la expresión de genes, la síntesis de proteínas y ADN, la supervivencia celular y la interacción entre células (Lenis *et al.*, 2017).

De forma resumida, la síntesis de poliaminas se produce a partir de la arginina. La arginasa puede transformar la arginina en ornitina. El paso limitante en la síntesis de poliaminas es la producción de putrescina a partir de ornitina por acción de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC). A partir de la putrescina, la primera de las poliaminas, se pueden formar la espermidina y la espermina de forma secuencial por medio de la espermidina sintasa y la espermina sintasa, respectivamente (figura 21). Estas enzimas requieren la acción de la S-adenosilmetionina descarboxilasa (AdoMetDC), otra enzima limitante en el proceso de biosíntesis. AdoMetDC se encarga de proporcionar el grupo aminopropilo necesario para la síntesis de poliaminas a partir de la descarboxilación de la S-adenilmetionina (SAM o AdoMet). La espermidina y la espermina pueden ser catabolizadas por la acción de la enzima espermidina/espermina N-acetiltransferasa (SSAT) o la acetilpoliamina oxidasa (APAO). En mamíferos existe un sistema de transporte de poliaminas selectivo (Casero and Marton, 2007). La enzima ODC es una enzima clave del proceso de síntesis de poliaminas por lo que en mamíferos se encuentra altamente regulada y su vida media no supera los 30 minutos (Lenis *et al.*, 2017), la vida media más corta de todas las enzimas conocidas.

Uno de los compuestos de quimioprevención más utilizados en cáncer es la difluorometilornitina (DFMO) o eflornitina. DFMO es un inhibidor suicida de la enzima ODC1, la enzima limitante en la biosíntesis de poliaminas (Mamont *et al.*, 1978). Desde su síntesis, DFMO ha sido utilizado como agente quimioterápico para controlar la proliferación celular exacerbada en procesos como el cáncer.

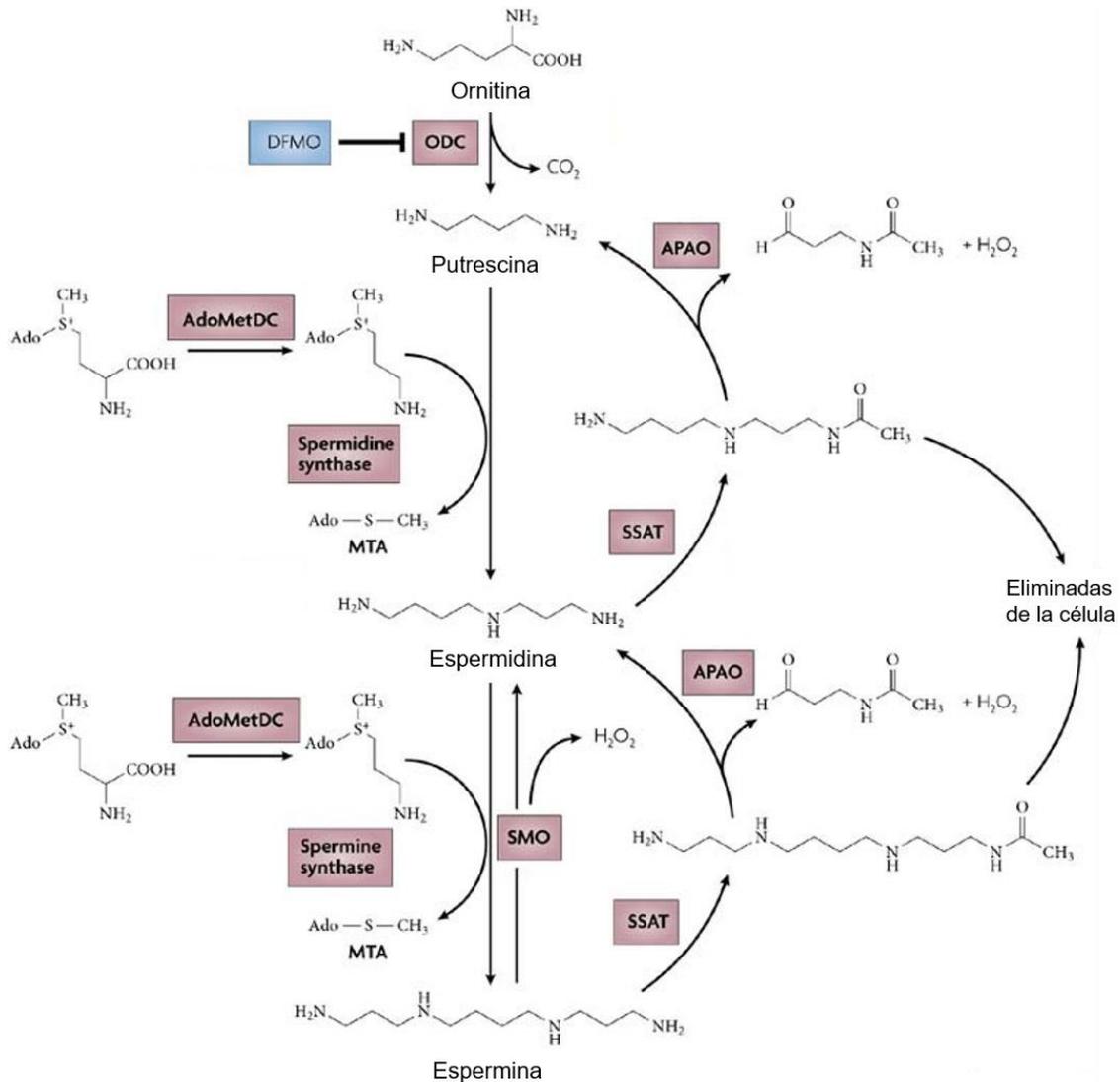


Figura 21. Metabolismo de poliaminas. El primer paso limitante en la síntesis de poliaminas es la generación de putrescina a partir de la ornitina por acción de la ornitina descarboxilasa (ODC). Esta enzima puede ser inhibida por el compuesto difluorometilornitina (DFMO). Otra enzima limitante es la S-adenosilmetionina descarboxilasa (AdoMetDC) que proporciona el grupo aminopropilo para la síntesis de espermidina y espermina. Estas dos poliaminas se sintetizan en cadena por medio de la espermidina y espermina sintasa, respectivamente. La enzima SSAT (espermidina/espermina acetiltransferasa) se encarga del catabolismo de la espermina y la espermidina, lo que permite mantener la homeostasis de poliaminas. En situaciones de estrés celular, se pueden activar la espermina oxidasa (SMO) o la N-acetilpoliamina oxidasa (APAO) que degradan la espermina o espermidina y producen H_2O_2 y moléculas que serán liberadas al exterior celular. Figura adaptada de (Casero and Marton, 2007).

En cáncer se ha visto un exceso de biosíntesis de poliaminas, particularmente en CCR, donde la ODC se encuentra sobreexpresada en la mayoría de los casos. Una mayor actividad de ODC se relaciona con una mayor proliferación e induce el crecimiento tisular. Además, se ha visto que promotores tumorales como *c-Myc*

aumentan la actividad de ODC y la formación de tumores (Bachmann and Geerts, 2018). En todo caso, las poliaminas también pueden proceder de una dieta alta en poliaminas o de la microbiota. De hecho, se conoce que algunos alimentos con cantidades notables de poliaminas están asociados con un mayor riesgo de cáncer (Huang *et al.*, 2020).

En pacientes con poliposis adenomatosa familiar (FAP) se han observado un incremento en los niveles de poliaminas y de ODC. Esta enfermedad se caracteriza por mutaciones en el gen *APC*, el cual causa una desregulación de la vía Wnt/ β -catenina. Esta vía de señalización puede activar el oncogen *c-Myc*, el cual, a su vez, aumenta la expresión y actividad de ODC (Bachmann and Geerts, 2018; Half *et al.*, 2009). Alteraciones en *APC* resultan en la desregulación de la biosíntesis de poliaminas (figura 22).

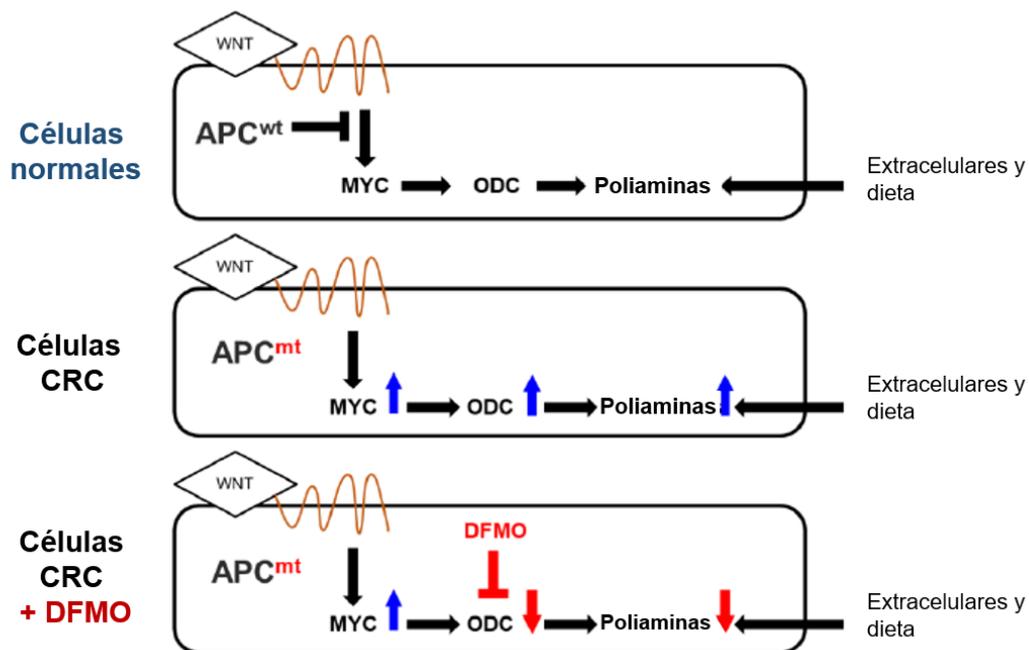


Figura 22. Papel de las poliaminas en el CCR. En células normales, la vía Wnt/ β -catenina controla la expresión de MYC regulada por la forma *wild type* de MYC quien puede controlar la síntesis de poliaminas a través de la regulación del gen de la ODC. En células de CCR donde APC aparece mutado, se produce una sobreexpresión de MYC y se observan altos niveles de la enzima ODC y de poliaminas. A través de la administración de DFMO, se pueden reducir los niveles de ODC y, por lo tanto, de poliaminas en células de CCR donde el oncogén MYC aparece sobreexpresado. Figura modificada de (Gerner *et al.*, 2018).

La utilización de DFMO, solo o en combinación con AINEs, puede inhibir la carcinogénesis en el tracto intestinal mediante la reducción de los niveles de poliaminas (Gerner *et al.*, 2018).

Se cree que el papel fisiológico de las poliaminas es estimular la restitución epitelial del intestino tras un daño. Esta estimulación puede ser consecuencia de un proceso de señalización por Ca^{2+} . Concretamente, las poliaminas inducen la translocación de STIM1 a la MP donde activa la entrada de Ca^{2+} mediada por TRPC1. La depleción de poliaminas por DFMO disminuye la formación de complejos STIM1/TRPC1 y, en consecuencia, la entrada de Ca^{2+} por esta vía (Rao *et al.*, 2012). Estos resultados indican que las poliaminas pueden modular los niveles de STIM1 y la entrada de Ca^{2+} mediada por TRPC1. Resultados previos del grupo sugieren que la inhibición de la síntesis de poliaminas con DFMO tiene efectos sobre el remodelado del Ca^{2+} en las células de CCR, donde ODC se encuentra sobreexpresada (Gutiérrez *et al.*, 2019). La inhibición de la síntesis de poliaminas en células de CCR reduce características del fenotipo tumoral como la proliferación celular y la resistencia a la muerte. Además, la inhibición de la síntesis de poliaminas afecta a la homeostasis del Ca^{2+} intracelular: DFMO aumenta el contenido de Ca^{2+} en los depósitos, disminuye la entrada de Ca^{2+} que se activa tras su vaciado y elimina el componente de la corriente I_{SOC} mediado por TRPC1 (figura 23). Este efecto es revertido con la adición de putrescina. A nivel molecular, DFMO reduce la expresión de TRPC1 y STIM1 en las células de CCR (Gutiérrez *et al.*, 2019).

En los últimos estudios del grupo se llevó a cabo un análisis transcriptómico para buscar las bases moleculares del remodelado del Ca^{2+} como consecuencia de la depleción de poliaminas en células de CCR. El tratamiento con DFMO afecta a genes del transporte de Ca^{2+} en células de CCR, pero no en células normales. Concretamente, DFMO aumenta la expresión de genes de moduladores de SOCE como *CRACR2A* y *ORMDL3*, mientras que disminuye los genes que codifican para proteínas relacionadas directamente con la entrada de Ca^{2+} como los que codifican las proteínas *SPCA2*, *TRPV6* o *TRPC1*. La inhibición de síntesis de poliaminas también afecta a transportadores de Ca^{2+} mitocondriales (Pérez-Riesgo *et al.*, 2023).

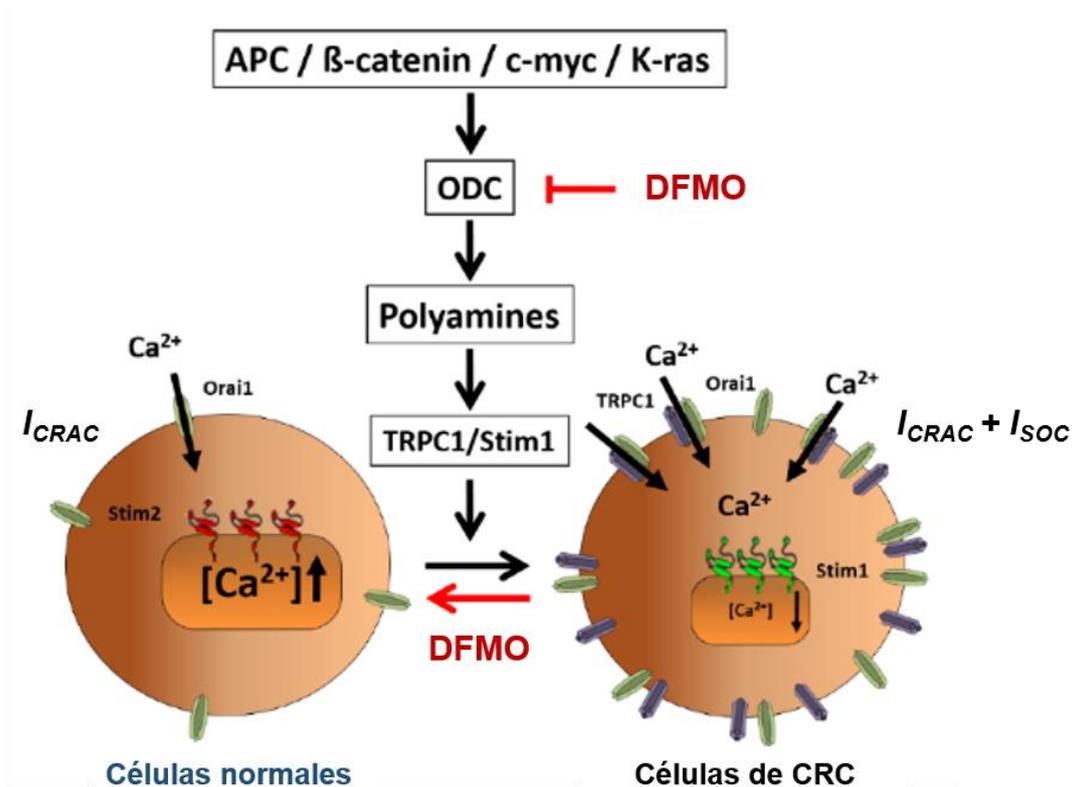


Figura 23. Reversión del remodelado de Ca²⁺ en CCR con DFMO. La inhibición de la síntesis de poliaminas con DFMO revierte el remodelado de la homeostasis del Ca²⁺ intracelular hacia un fenotipo menos tumoral: aumenta el tamaño de los depósitos de Ca²⁺ y reduce SOCE mediante la disminución de la expresión de STIM1 y TRPC1. Figura modificada de (Gutiérrez *et al.*, 2019).

Los resultados a nivel molecular, transcriptómico y funcional sugieren un papel relevante de las poliaminas en el remodelado de la homeostasis del Ca²⁺ intracelular en cáncer colorrectal.

5. Homeostasis del potasio en cáncer.

La homeostasis iónica es importante para la mayoría de las funciones celulares. Los iones se distribuyen de manera asimétrica a través de la membrana plasmática (y de endomembranas), dando lugar a gradientes electroquímicos. Estos gradientes generan un potencial de membrana que se utiliza en la transducción de señales para el transporte de moléculas. Este transporte establece una homeostasis iónica. Como ya hemos visto, alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} puede desembocar en la modificación de características celulares relacionadas con patologías como el cáncer. Esto también ocurre con otros iones como el K^+ .

Los canales de K^+ son proteínas transmembrana que forman poros que permiten el transporte de K^+ a través de la MP, principalmente su salida a favor de gradiente electroquímico. Los canales de K^+ están codificados por 77 genes y se dividen en 4 clases: canales de K^+ operados por voltaje, canales de K^+ activados por Ca^{2+} , canales de K^+ de rectificación interna y canales de K^+ con dos dominios de poro (Fnu and Weber, 2021):

- Canales de K^+ operados por voltaje (Kv). Son el subgrupo mayor de canales de K^+ . Su apertura está controlada por cambios en el potencial de membrana.
- Canales activados por Ca^{2+} . Se puede diferenciar entre canales de gran conductancia (BK), de conductancia intermedia (IK) y de conductancia pequeña (SK).
- Canales de rectificación interna (Kir). Tienen dos segmentos transmembrana que flanquean un poro que permite la entrada de K^+ .
- Canales con dos dominios de poro (K2P). Tienen dos dominios de poro y, generalmente, están abiertos como canales *leak* para mantener el potencial de membrana negativo.

5.1. Alteración iónica del K⁺ en cáncer.

Los canales de K⁺ son importantes en los procesos de metástasis ya que están implicados en la migración celular y la angiogénesis, así como la transición epitelio-mesénquima y otras propiedades asociadas con el fenotipo tumoral (Comes *et al.*, 2015). La actividad de los canales de K⁺ puede regular la señalización por Ca²⁺ a través de cambios en el potencial de membrana que favorecen la entrada de Ca²⁺. Estas señales de Ca²⁺ pueden regular procesos de proliferación celular y apoptosis, por lo que el K⁺ podría regularlos de manera indirecta (Santellal and Risol, 1998; Wang, 2004; Yang and Brackenbury, 2013). Además, los canales de K⁺ pueden promover la angiogénesis y migración tumoral, concretamente los canales hEAG1 y hERG1 en los que se profundizará más adelante (Becchetti and Arcangeli, 2010).

Existen evidencias de que los canales de K⁺ están involucrados en procesos fisiopatológicos relacionados con los procesos tumorales (figura 24), pero es difícil asignar un rol a cada canal concreto, aunque destacan los procesos de crecimiento tumoral, angiogénesis y metástasis (Fnu and Weber, 2021). La expresión de diferentes canales de K⁺ puede estar alterada en algunos tipos de cáncer y, en algunos casos, correlacionada con la malignidad tumoral, por lo que estos canales iónicos se han propuesto como dianas para terapia del cáncer.

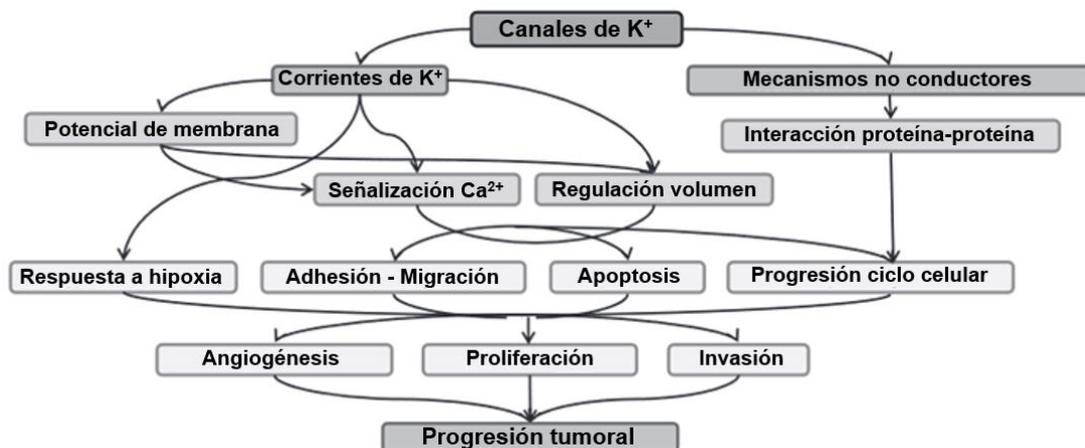


Figura 24. Mecanismos implicados en la progresión tumoral regulados por canales de K⁺. La participación de los canales de K⁺ en los procesos de progresión tumoral es muy compleja e incluye mecanismos dependientes de la permeabilidad de los canales, así como mecanismos no relacionados con la conducción iónica. Imagen adaptada de Comes *et al.*, 2015.

Muchos de los procesos tumorales implican la alteración en la expresión de canales del grupo Kv. Dentro de este grupo destaca la expresión diferencial de canales Kv1.3 y Kv1.5, cuya expresión se puede correlacionar con la malignidad del tumor (Bielanska *et al.*, 2012). Otro grupo altamente implicado en cáncer son los canales Kv de la familia EAG (Kv10-12) de los que hablaremos a continuación.

5.2. Canales hERG1 y hEAG1 en cáncer.

Los canales EAG o *ether-á-go-go* son una subfamilia de canales de K⁺ operados por voltaje codificados por el gen *KCNH*. Esta familia incluye tres subtipos: Kv10, Kv11 y Kv12. El subgrupo Kv10 o EAG incluye dos miembros, Kv10.1 (EAG1) y Kv10.2 (EAG2), codificados por los genes *KCNH1* y *KCNH5* respectivamente. El subgrupo Kv11 o ERG (del inglés *eag-related gene*) tiene tres miembros, Kv11.1 (ERG1), Kv11.2 (ERG2) y Kv11.3 (ERG3), codificados por los genes *KCNH2*, *KCNH6* y *KCNH7* respectivamente. El último subgrupo, Kv12 o ELK (del inglés *eag-like K⁺ channel*) incluye tres miembros, Kv12.1 (ELK1), Kv12.2 (ELK2) y Kv12.3 (ELK3), codificados por los genes *KCNH8*, *KCNH3* y *KCNH4*. Todos ellos aparecen formando tetrámeros, donde cada subunidad está compuesta por 6 segmentos TM (figura 25). Los primeros cuatro segmentos TM forman el dominio sensible a voltaje (VSD, del inglés *voltage-sensing domain*). Los segmentos TM5 y TM6 junto con el bucle que une las cuatro subunidades se asocian para formar el poro del canal. Los módulos citoplasmáticos influyen en la apertura de los canales. En el segmento N-terminal se encuentra el dominio PAS común a los canales EAG. En el extremo C-terminal se encuentra la región CNBHD, homóloga a dominios de unión a nucleótidos cíclicos. (Barros *et al.*, 2020).

La expresión de estos canales se ha observado en una variedad de tejidos y, por ejemplo, se ha visto que todos ellos están sobreexpresados en el sistema nervioso donde regulan la excitabilidad celular (Bauer and Schwarz, 2018).

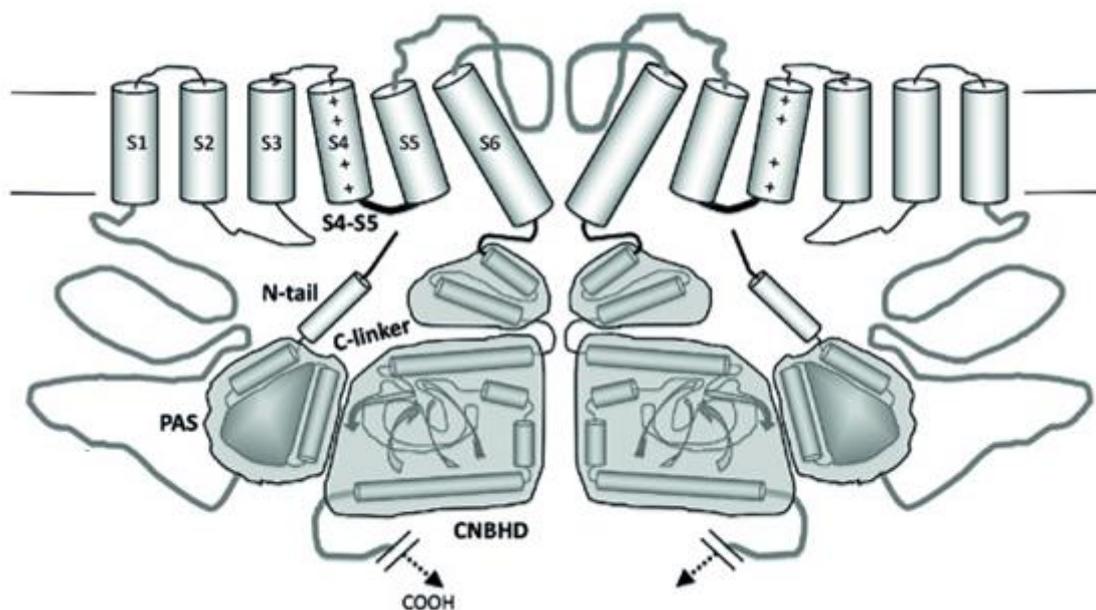


Figura 25. Esquema de la estructura del canal hERG1 o Kv11.1. Se representan dos de las subunidades que aparecen formando el tetrámero. Consta de 6 segmentos transmembrana, donde los los segmentos S5 y S6, junto con el bucle que une las subunidades, forman el poro del canal. Tanto las regiones N-terminal como C-terminal son intracelulares. En el extremo N-terminal (*N-tail*) se encuentra la región PAS y en el C-terminal la región CNBHD. Figura adaptada de Barros *et al.*, 2020.

La expresión de canales hEAG1 y hERG1 en células de cáncer contribuye a la migración celular y la angiogénesis. Concretamente, la expresión de Kv10.1 induce la expresión de *HIF1* (del inglés *hypoxia-inducible factor 1*) y aumenta la respuesta de las células a hipoxia. HIF1 además promueve la activación del factor de crecimiento endotelial vascular VEGF, induciendo la vascularización (Downie *et al.*, 2008). Por su parte, Kv11.1 tiene un papel más complejo en la progresión tumoral. En células de cáncer de mama, cuando Kv11.1 permanece cerrado, el canal aparece asociado a la integrina $\beta 1$, resultando en un aumento de la metástasis. Sin embargo, cuando se abre, se reduce la asociación con la integrina $\beta 1$, disminuyendo la metástasis en cáncer de mama (Becchetti *et al.*, 2017). EAG1 o Kv10.1 se encuentra sobreexpresado en CCR y se asocia con el estadio tumoral (Ding *et al.*, 2007). ERG1 o Kv11.1 también presenta una mayor expresión en CCRs metastatizados. Su mayor expresión y actividad se correlaciona con la capacidad de invasión y neovascularización (Lastraioli *et al.*, 2004).

La patofisiología de los flujos de K^+ y la accesibilidad de los canales ha puesto el foco en estas proteínas como diana terapéutica para cáncer. Esto ha supuesto el

desarrollo de bloqueantes como el astemizol, capaz de bloquear tanto los canales EAG como los canales ERG (Toplak *et al.*, 2022).

El papel de las poliaminas en el control de la actividad de los canales de K⁺ se ha estudiado en el contexto del proceso de restitución epitelial. Las poliaminas son esenciales para la migración celular durante la restitución temprana de la mucosa después de una herida en el tracto gastrointestinal. Se ha descrito que DFMO inhibe selectivamente la expresión del canal Kv1.1 y despolariza la membrana de células epiteliales del tracto gastrointestinal, lo que reduce la fuerza electromotriz para la entrada de Ca²⁺ y la migración celular. La espermidina exógena revierte estos efectos. Los resultados sugieren que las poliaminas podrían controlar los procesos de migración celular durante la restitución epitelial a través del control de la expresión de canales de K⁺ como Kv1.1 (Wang *et al.*, 2000).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En el cáncer colorrectal existe un remodelado de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular que contribuye al fenotipo tumoral. Las células tumorales tienen una entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE) aumentada y niveles bajos de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares con respecto a las células normales. Esto promueve la proliferación y migración celulares mientras previene la muerte celular. La SOCE se inactiva en las células normales por el propio Ca^{2+} que entra. Sin embargo, en las células tumorales, las mitocondrias remueven el exceso de Ca^{2+} citosólico previniendo su inactivación. Además, las células tumorales sobreexpresan canales TRPC1 y algunos sistemas de transporte de Ca^{2+} y K^+ que podrían contribuir a aumentar la SOCE. El remodelado de Ca^{2+} podría deberse a un exceso de poliaminas asociadas a mutaciones en *APC* y la sobreexpresión de ODC. La inhibición de la síntesis de poliaminas con DFMO revierte parcialmente el remodelado de Ca^{2+} y el fenotipo tumoral. Por tanto, la hipótesis de este trabajo es que en las células tumorales se producen cambios en los responsables moleculares de SOCE, específicamente la mitocondria, y canales TRPC1, de Ca^{2+} y de K^+ . Estos cambios están relacionados con el exceso de poliaminas en las células tumorales y, por tanto, son reversibles mediante la inhibición de la síntesis de poliaminas con DFMO.

Para probar la hipótesis, se abordaron los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la contribución de la mitocondria a la SOCE mediante la transferencia de mitocondrias aisladas de células normales NCM460 a células tumorales HT29.
2. Determinar el papel del canal TRPC1 en la SOCE en células de cáncer de colon.
3. Determinar los sistemas de transporte de Ca^{2+} modulados por poliaminas que contribuyen al remodelado de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en las células de cáncer colorrectal.
4. Caracterizar los cambios en las corrientes de K^+ en células de cáncer colorrectal y su modulación por poliaminas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares.

Las **células NCM460** se utilizaron como modelo de célula normal de colon humana. Se trata de una línea celular epitelial de mucosa normal de colon. Se estableció a partir de tejido sano de un varón hispano de 68 años sometido a una gastrectomía. Estas células presentan marcadores como citoqueratinas o villina que indican su naturaleza de células epiteliales normales o no tumorigénicas (Moyer *et al.*, 1996). Son células adherentes que crecen en monocapa y se duplican cada 32-38 horas. Pueden sufrir transformaciones si se cultivan durante largos periodos de tiempo, por lo que no se mantuvieron más de 12 pases celulares.

Las **células HT29** se utilizaron como modelo de célula tumoral de colon humana. Se trata de una línea celular epitelial de carcinoma colorrectal humano. Se estableció a partir de tejido de un tumor primario de colon de una mujer caucásica de 44 años (Fogh and Trempe, 1975). Estas células presentan mutaciones en los genes *BRAF*, *PIK3CA*, *SMAD4* y *TP53*, además de tener una forma truncada de *APC* (Ahmed *et al.*, 2013; Brocardo *et al.*, 2005). Son células adherentes que crecen en monocapa cuyo tiempo de duplicación es 22-24 horas.

Las **células SW480** se utilizaron como modelo celular adicional tumoral. Se trata de una línea celular epitelial de adenocarcinoma colorrectal humano. Se aislaron del colon de un varón caucásico de 50 años con cáncer colorrectal en estadio B-C según la clasificación de Dukes (Leibovitz *et al.*, 1976). Presenta mutaciones en el oncogén *KRAS* y los genes supresores tumorales *TP53* y *APC* (Ahmed *et al.*, 2013; Nishisho *et al.*, 1991). Son células adherentes que se duplican cada 20-25 horas.

Tanto las células NCM460 como las células HT29 y las SW480 son adherentes y se cultivaron en matraces Nunc EasYFlasks de 25 o 75 cm² con medio de cultivo DMEM (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) con 1 g/l de glucosa suplementado con 1% de antibióticos penicilina/estreptomicina (100 U/ml), L-glutamina 2 mM y 10% de suero fetal bovino (FBS, del inglés *fetal bovine serum*). Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 10% de CO₂. Cuando las células alcanzaron el 70-80% de confluencia, se subcultivaron. Para el subcultivo, las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate-buffered saline*) y se mantuvieron durante 5 minutos a 37 °C con tripsina-EDTA para levantar las células del matraz. Se inactivó la tripsina con medio de cultivo completo y se recogieron en un tubo cónico. Las células

se centrifugaron a 290 g durante 4 minutos y se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en un volumen conocido de medio DMEM. Posteriormente, se contaron las células en una cámara de Neubauer y se subcultivaron a la densidad deseada. Ambos tipos celulares se mantuvieron en cultivo en paralelo hasta un máximo de 12 pases. Para mantener siempre un stock celular, las células se congelaron en los pases iniciales (1-3 pases) en medio DMEM completo (60%), FBS (30%) y DMSO (10%).

Las células NCM460 se obtuvieron de INCELL Corporation (San Antonio, TX, EE. UU.). Las células HT29 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC HTB-38, EE. UU.). Las células SW480 fueron cedidas amablemente por el Dr. Alberto Muñoz (CSIC, Madrid, España). Los medios y reactivos utilizados para los cultivos celulares (DMEM, antibióticos, FBS, L-glutamina, PBS, Tripsina y DMSO) fueron obtenidos de Lonza (Basilea, Suiza). Los matraces y placas de cultivos, así como los crioviales para la congelación de células, fueron obtenidos de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.). La cámara de Neubauer es de Marienfeld GmbH (Lauda-Königshofen, Alemania)

2. Medida de calcio citosólico.

Para estudiar la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y la entrada de Ca^{2+} se llevaron a cabo experimentos de imagen de fluorescencia donde se monitorizó el Ca^{2+} intracelular en tiempo real a nivel de célula única utilizando la sonda fluorescente fura-2/AM (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Se utiliza el derivado acetoximetil éster (AM) del fura-2 para que la sonda atraviese las membranas celulares y penetre en las células vivas donde, por medio de las esterasas intracelulares, se libera la molécula de fura-2 impermeable a la membrana celular (figura 26A). La sonda fluorescente fura-2 es un quelante de Ca^{2+} unido a una molécula fluorescente. Esta molécula se une al Ca^{2+} con alta afinidad ($K_D = 0,14 \mu\text{M}$) lo que nos permite detectar pequeños cambios en la concentración de Ca^{2+} citosólico (Grynkiewicz *et al.*, 1985). El espectro de excitación del fura-2 depende de la unión a Ca^{2+} . Así, la fluorescencia emitida a 510 nm cuando se excita a 340 nm aumenta cuanto mayor es la cantidad de Ca^{2+} mientras que disminuye cuando se excita a 380 nm (figura 26B). Por lo tanto, para ver los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} , se estudió el cociente o ratio de intensidad de fluorescencia cuando se excita a 340 y 380 nm (ratio F340/F380) y se

recoge en 510 nm. Al tratarse de una medida ratiométrica, se aumenta la sensibilidad y se disminuyen los errores en la medida debidos a artefactos o a diferencias en la carga del colorante dentro de las células.

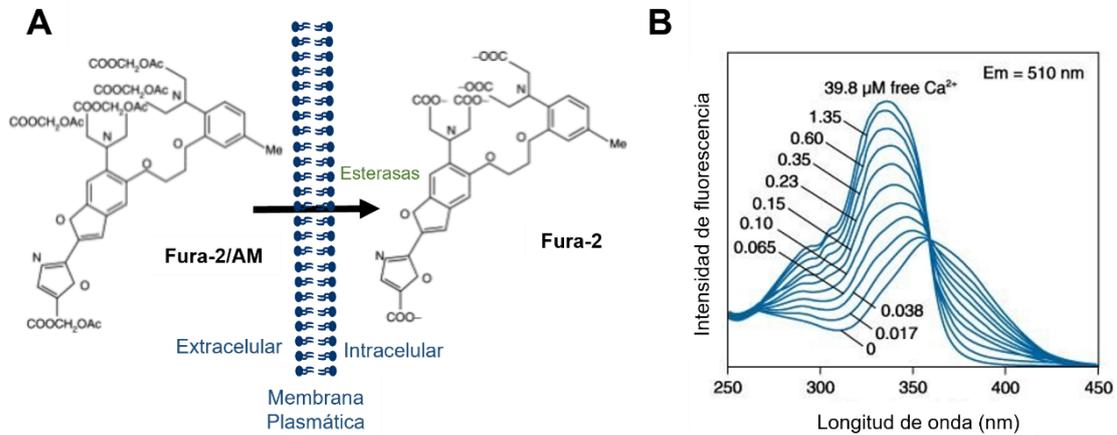


Figura 26. Estructura química del Fura-2 y espectro de fluorescencia de la sonda unida a Ca^{2+} . A. El Fura-2/AM difunde a través de la membrana plasmática hacia el interior celular donde las esterasas intracelulares lo hidrolizan y liberan el Fura-2 ácido que, por estar cargado, no puede salir de la célula. B. Espectro de fluorescencia recogida a 510 nm de una solución con diferentes concentraciones (en μM) de Ca^{2+} y excitando a diferentes longitudes de onda. A 340 nm se produce el máximo de emisión con altas concentraciones de Ca^{2+} mientras que a 380 nm el máximo de emisión coincide con bajas concentraciones de Ca^{2+} . Imágenes obtenidas de ThermoFisher Scientific.

Para monitorizar el Ca^{2+} intracelular en células vivas, las células se sembraron en cubreobjetos de 12 mm de diámetro tratados con poli-L-lisina (Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Alemania), al menos, 3 horas antes del experimento. Para poder monitorizar el Ca^{2+} intracelular, las células se cargaron durante 45-60 minutos con fura-2/AM 4 μM en medio externo completo (MEC) con Ca^{2+} (MEC Ca1) en oscuridad. Este medio MEC Ca1 contiene, en mM: 145 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl_2 , 10 D-glucosa, 10 HEPES, 1 CaCl_2 ; pH=7,4. La concentración final de Ca^{2+} es 1 mM. Una vez tratadas las células, se montaron los cubreobjetos en una cámara de perfusión. Esta cámara se llevó a un microscopio invertido Zeiss Axiovert S100TV (Zeiss, Oberkochen, Alemania) equipado con una cámara digital Orca-ER (Hamamatsu Photonics, Japón) para registrar las imágenes cada 5 segundos. Se utilizó una lámpara de fluorescencia para iluminar las células alternativamente a 340 y 380 nm gracias a una rueda de filtros de excitación (Sutter Instruments, Novoa, CA, EE. UU.). La fluorescencia emitida se recogió a través de un objetivo 40X de inmersión en aceite (1.4 NA, Olympus, Nueva Zelanda) y se filtró para recoger únicamente la emisión a 510-520 nm. El equipo lleva acoplado un sistema

de perfusión (Warner Instruments, Hamden, CT, EE. UU.) que nos permitió añadir de forma controlada medio externo a las células. Con este sistema de perfusión se pudo variar el medio externo que llega a las células para ver el efecto de distintos compuestos sobre el Ca^{2+} intracelular.

Para medir la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos, como se resume en la figura 27, las células cargadas con Fura-2 se lavaron y se trataron en oscuridad con tapsigargina $1\ \mu\text{M}$ durante 10 minutos en medio extracelular libre de Ca^{2+} (MEC Ca0). Este medio contiene, en mM: 145 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl_2 , 10 D-glucosa, 10 HEPES, 0,5 EGTA; pH=7,4. Después, las células se colocaron en la cámara de perfusión y se llevaron al microscopio de fluorescencia como se ha descrito anteriormente. Para estimar el contenido de Ca^{2+} en los depósitos, las células cargadas con Fura-2 se trataron con ácido ciclopiazónico (CPA) en MEC Ca0 durante 20 minutos mientras se monitorizó el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico, procedente del RE. Posteriormente, se activó SOCE añadiendo Ca^{2+} extracelular (MEC Ca1) en presencia de CPA. Tanto la tapsigargina como el CPA son inhibidores específicos de la SERCA, de manera que provocan un vaciado de los depósitos de Ca^{2+} dentro de la célula. Tras este vaciado, añadiendo Ca^{2+} al medio extracelular, se activa SOCE. La diferencia entre ambos es que la tapsigargina es un inhibidor irreversible, mientras que el CPA permite la reversión de la inhibición.

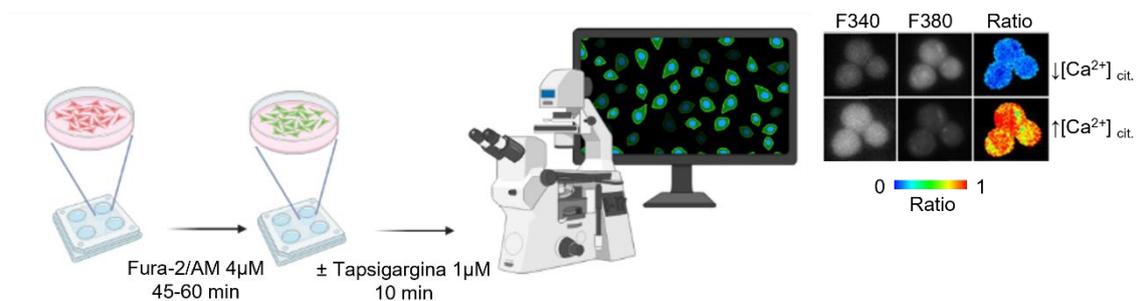


Figura 27. Esquema de un experimento de imagen de Ca^{2+} citosólico. Las células, sembradas al menos 3 horas antes del experimento en cristales de 12 mm de diámetro tratados con poly-L-lisina, se incuban durante 45-60 minutos con Fura-2/AM $4\ \mu\text{M}$ en oscuridad. Después, se tratan con tapsigargina si queremos activar SOCE, o bien se llevan directamente al microscopio de fluorescencia invertida. Allí se registran las imágenes de fluorescencia excitando a 340 y 380 nm alternativamente y se hace el ratio de ambas que nos da una idea de la concentración de Ca^{2+} intracelular. Creada con BioRender.com.

En cada experimento se realizaron registros individuales de unas 10-30 células dentro del mismo campo microscópico. Las imágenes resultantes fueron analizadas utilizando el software Aquacosmos 2.6 (Hamamatsu Photonics, Japón) para obtener el

ratio F340/F380. Posteriormente, los resultados de las curvas obtenidas fueron analizados con el software OriginPro 2019 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EE. UU.). Todos los reactivos utilizados para preparar los medios externos, así como la tapsigargina y el CPA fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt, Alemania).

3. Mitocepción o transferencia de mitocondrias.

El proceso de mitocepción, término acuñado de la traducción directa de *MitoCeption* en inglés, consiste en transferir una cantidad conocida de mitocondrias aisladas a células receptoras de interés (Caicedo *et al.*, 2015). En este estudio, las células donantes y receptoras fueron las células normales NCM460 y las células tumorales HT29. El protocolo, resumido en la figura 28, consta de tres pasos, que serán descritos con mayor detalle a continuación y en el apartado de resultados.

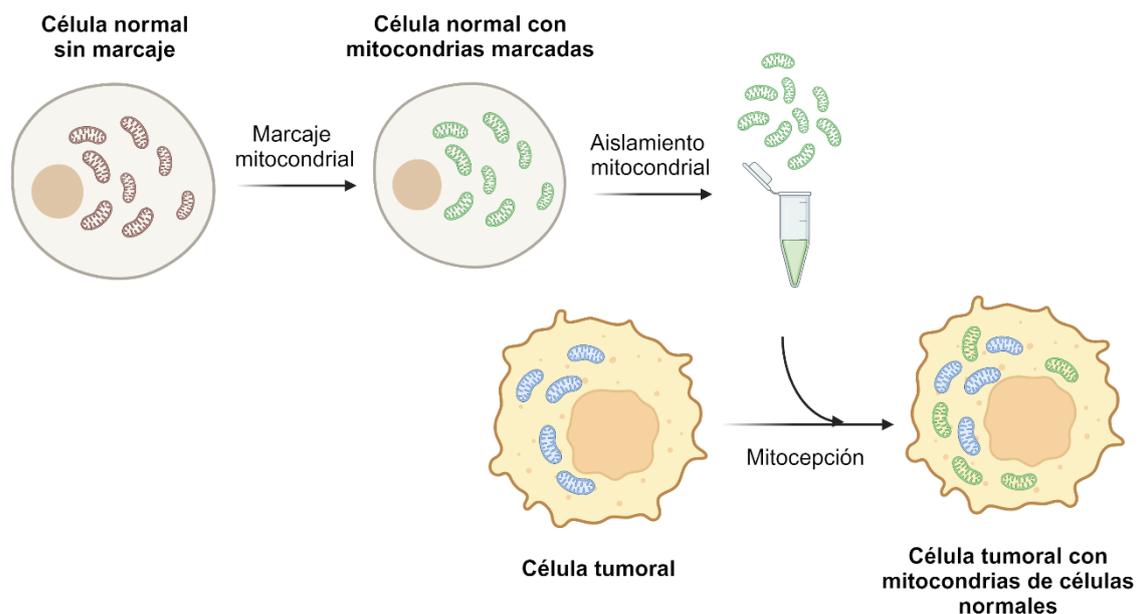


Figura 28. Esquema del protocolo de mitocepción. El primer paso es realizar el marcaje de las mitocondrias de las células donadoras. Posteriormente se aíslan las mitocondrias marcadas. Por último, las mitocondrias aisladas se transfieren a las células receptoras. Es decir, se produce la mitocepción. Figura creada con BioRender.com.

3.1. Marcaje mitocondrial.

Para el marcaje mitocondrial de las células donadoras se utilizó MitoTracker Green 250 nM (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) o MitoView Green 200 nM (Biotium, CA, EE. UU.). Los dos marcadores fluorescentes verdes son capaces de penetrar en las mitocondrias de células vivas donde son retenidos. Son dependientes de la masa mitocondrial, no del potencial mitocondrial, y no afectan a ninguna función celular.

Las células donadoras se cultivaron en matraces de 75 cm² hasta alcanzar una alta confluencia. El día previo al aislamiento, las células donadoras se lavaron tres veces con PBS y se incubaron a 37 °C en oscuridad con el marcador durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron nuevamente con PBS y se mantuvieron en cultivo a 37 °C, 10% CO₂ hasta su uso.

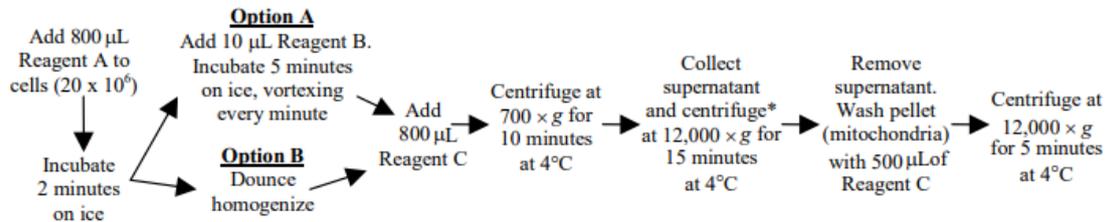
3.2. Aislamiento de mitocondrias.

Para el aislamiento mitocondrial de células en cultivo se utilizó el kit comercial *Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Este protocolo se basa en centrifugaciones y choques térmicos para separar los diferentes componentes celulares. Todo el proceso se realizó en frío, manteniendo en hielo tanto los reactivos como el diferente material utilizado. El material utilizado fue el siguiente:

- Reactivos A, B y C incluidos en el kit de aislamiento.
- Cóctel inhibidor de proteasas Halt™ sin EDTA 100X.
- PBS.
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y 2 ml.
- Agitador vórtex.
- Microcentrífuga refrigerada (4 °C) con velocidad variable.
- Hielo.

Fue necesario realizar todo el proceso en hielo para mantener una baja temperatura. El protocolo seguido fue el indicado por el comerciante y se indica en la figura 29. Las células NCM460 de donde aislamos las mitocondrias se levantaron de los

matraces de 75 cm² donde estaban sembradas utilizando Tripsina sin EDTA. Añadimos el cóctel inhibidor de proteasas (dilución 1:100) únicamente a la cantidad de reactivos A y C que utilizamos. El cóctel inhibidor de proteasas se obtuvo de ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.).



*To obtain a more purified preparation of mitochondria, this step may be performed at 3,000 × g.

Figura 29. Protocolo de aislamiento mitocondrial. Esquema del protocolo descrito por el comerciante para el aislamiento de mitocondrias de células en cultivo. Está basado en una secuencia de centrifugaciones y choque térmico utilizando los tres reactivos incluidos en el kit. En nuestro caso se siguió la opción A y se centrifugó a 3.000 g para obtener el pellet mitocondrial. Protocolo sacado de ThermoFisher Scientific.

Se partió del pellet de 20 millones de células donantes, donde se añadieron 800 µl de reactivo A y se incubó 2 minutos exactos en hielo. Después, se añadieron 10 µl de reactivo B, se agitó en el vórtex y se incubó en hielo, agitando el tubo cada minuto. Transcurridos los 5 minutos, se añadieron 800 µl de reactivo C y se mezcló mediante inversión, sin vórtex. Una vez mezclado, se centrifugó a 4 °C, durante 10 minutos a una velocidad de 700 g. El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo y se centrifugó nuevamente a 4 °C durante 15 minutos a 3.000 g para obtener una fracción mitocondrial más purificada. En los casos donde no se observó pellet, se repitió este último paso. Una vez obtenida la fracción mitocondrial, se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet con las mitocondrias. Para ello se añadieron 500 µl de reactivo C y se centrifugó nuevamente a 4 °C durante 5 minutos a una velocidad de 12.000 g. Se repitió el paso de centrifugación en los casos donde no se observó pellet mitocondrial. Por último, se eliminó el sobrenadante y se mantuvo el pellet que contiene las mitocondrias en hielo.

Para conocer la cantidad de mitocondrias obtenidas, se midió la concentración de proteína en el tubo. Se asumió que la cantidad de proteína obtenida se correspondía a la cantidad de mitocondrias aisladas. Para ello, se resuspendió el pellet con las mitocondrias en un volumen conocido de PBS frío. La cantidad de PBS puede variar según el pellet observado entre de 20-40 µl de PBS. Para medir la concentración de proteínas en la muestra se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop (ThermoFisher

Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Los tubos con las mitocondrias se mantuvieron en hielo hasta su uso.

3.3. Transferencia mitocondrial o mitocepción.

Para la transferencia de las mitocondrias aisladas a las células receptoras tumorales, usamos protocolos descritos en la literatura donde se realiza una centrifugación conjunta de las células receptoras con las mitocondrias mediante el proceso descrito como *Mitoception* (Cabrera *et al.*, 2019; Caicedo *et al.*, 2015). También se realizó la transferencia mitocondrial mediante co-incubación con las células receptoras, lo que se conoce como transformación mitocondrial y se describe en otros estudios (Kesner *et al.*, 2016).

Para este estudio utilizamos tanto mitocepción por centrifugación como por co-incubación para la transferencia mitocondrial. Ambos procesos se describen a continuación y se resumen en la figura 30.

Mitocepción por centrifugación

Levantamos las células HT29 con tripsina sin EDTA y separamos volúmenes equivalentes a 100.000 células en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml. El pellet celular se lavó en 100 µl de PBS frío. Obtuvimos la fracción celular mediante una centrifugación de 2 minutos a 700 g. Añadimos suavemente la cantidad deseada de mitocondrias aisladas al depósito de células del tubo. En los tubos control, añadimos el mismo volumen de PBS sin contener mitocondrias. Centrifugamos los tubos control y experimental con las células receptoras más las mitocondrias aisladas (o solo PBS en control) durante 5 minutos, a 4 °C, a una velocidad de 1.500 g. Tras la centrifugación, sembramos las células con medio DMEM completo y mantuvimos en el incubador hasta su uso.

Mitocepción por co-incubación

24 horas antes del aislamiento y transferencia mitocondrial, se sembraron las células HT29 en cubreobjetos tratados con poli-L-lisina o en placas de cultivo dependiendo de los experimentos posteriores. Las mantuvimos en el incubador con medio completo hasta el momento de la mitocepción. Calculamos la cantidad de

mitocondrias a transferir (expresado en μg por cada 100.000 células). Las mitocondrias aisladas, resuspendidas en PBS, se añadieron lenta y suavemente sobre las células adheridas a las placas o cristales de cultivo. En las células control se añadió el mismo volumen de PBS, pero sin mitocondrias. Mantuvimos las células adheridas junto con las mitocondrias exógenas en el incubador hasta su uso.

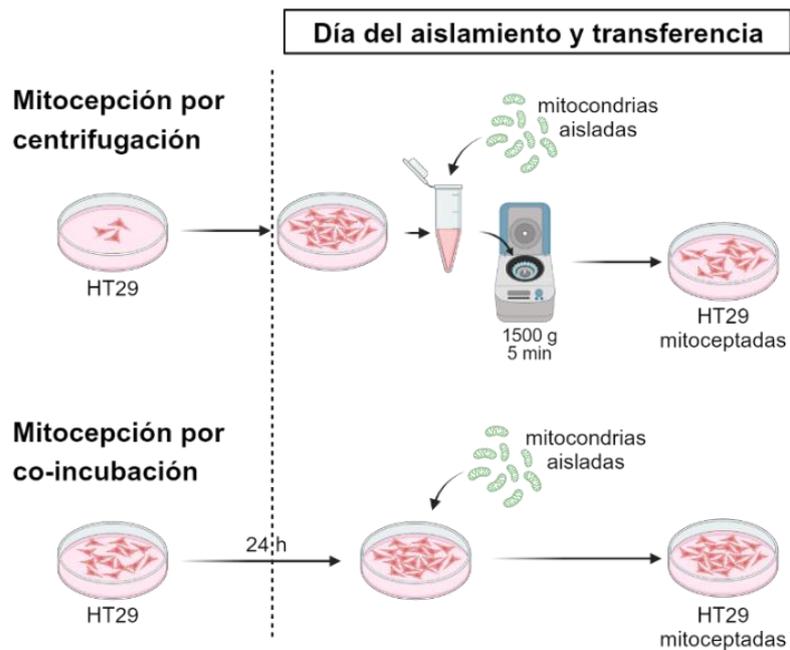


Figura 30. Métodos de transferencia de mitocondrias aisladas. Esquema que resume los dos métodos utilizados para la transferencia de mitocondrias aisladas. En la parte superior, la mitocepción por centrifugación, donde se levantan las células receptoras HT29 y se centrifugan junto con las mitocondrias aisladas, tras lo cual se siembran. En la parte inferior, la mitocepción por co-incubación donde, a las células HT29 sembradas el día antes, se añaden las mitocondrias aisladas y se mantienen en cultivo. Figura creada con BioRender.com.

4. Validación de la mitocepción.

La validación del proceso de mitocepción en las células receptoras se llevó a cabo por dos métodos: citometría de flujo y microscopía confocal. En ambos métodos se valoró la fluorescencia verde en las células mitoceptadas.

4.1. Citometría de flujo.

El análisis de la intensidad de fluorescencia verde de las células mitoceptadas fue llevado a cabo mediante citometría de flujo. La citometría de flujo es una técnica que analiza de manera rápida células o partículas individuales en suspensión en una solución salina cuando pasan por uno o varios láseres. Cada célula o partícula se analiza en función de la dispersión de la luz visible y de uno o varios parámetros de fluorescencia. La dispersión de la luz visible se mide en dos direcciones: dirección frontal (FSC, del inglés *forward scatter*) que nos da información sobre el tamaño relativo de la célula, y a 90° (SSC, del inglés *side scatter*) que nos informa acerca de la complejidad o granularidad de la célula (McKinnon, 2018). Estos dos parámetros nos permiten identificar nuestra población de células según su tamaño y complejidad. El citómetro también nos permite detectar fluorescencia gracias a los láseres que excitan los fluoróforos utilizados en las células y a una serie de detectores y amplificadores que recogen la señal óptica recibida, la amplifican y la digitalizan enviándola a un ordenador.

En los ensayos de validación de la mitocepción, tras la transferencia de mitocondrias, las células mitoceptadas se sembraron en placas de 6 pocillos y se mantuvieron 24 horas en cultivo a 37 °C y 10% CO₂ en oscuridad. Después, las células se lavaron con PBS, se levantaron con tripsina sin EDTA, se centrifugaron a 290 g durante 4 minutos y el pellet celular se resuspendió en 200-300 µl de PBS. Las células se analizaron utilizando un citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter, CA, EE. UU.). Para detectar la fluorescencia verde, las células se excitaron con un láser a 488 nm y se detectó la luz a 525 nm (FL1). Los resultados se procesaron y analizaron con el software de análisis Kaluza (Beckman Coulter, CA, EE. UU.).

4.2. Microscopía confocal.

Las mitocondrias exógenas de las células mitoceptadas se observaron mediante microscopía confocal. Para ello, se realizó la mitocepción de las células HT29 con mitocondrias marcadas aisladas de células NCM460 mediante co-incubación. Las células HT29 se sembraron en cubreobjetos de 22 mm de diámetro el día anterior a la mitocepción, momento en el que añadimos 50 µg de mitocondrias aisladas lentamente sobre 10⁵ células tumorales y las mantenemos en cultivo 20-24 horas. En ese momento lavamos las células con PBS y las ponemos en un portaobjetos con cavidad de 18 mm

(Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Alemania) que nos permiten trabajar con células vivas. Ponemos las células en PBS, sellamos el cubreobjetos con Picodent Twinsil (Picodent GmbH, Wipperfürth, Alemania) y las llevamos al microscopio confocal Leica TCS SP5X (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania). Para detectar la fluorescencia verde procedente de las mitocondrias exógenas se utilizó un láser para excitar las células a 488 nm. Se recogió la luz emitida entre 500 y 525 nm. Las imágenes fueron analizadas con el software LAS AF Lite (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania).

5. Estudio del potencial mitocondrial.

Para estudiar las diferencias en el potencial mitocondrial se utilizó la sonda fluorescente de éster metílico tetrametilrodamina (TMRM). El TMRM es un colorante catiónico de color rojizo capaz de atravesar las membranas y acumularse en las mitocondrias. TMRM, con carga positiva, se acumula en la mitocondria de acuerdo con su potencial mitocondrial: las mitocondrias más polarizadas, donde el interior es más negativo, acumularán más TMRM, por lo tanto la fluorescencia de la sonda será mayor (Perry *et al.*, 2011).

Las células HT29 y NCM460, tanto control como mitoceptadas, se sembraron tras la transferencia mitocondrial en cubreobjetos de 12 mm de diámetro tratados con poli-L-lisina a una densidad de 10.000 células/cristal. A las 20-24 horas, las células se lavaron con MEC Ca1 (el mismo utilizado para los experimentos de imagen de Ca^{2+}) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en MEC Ca1 con TMRM 50 nM (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Transcurrido ese tiempo, el cristal con las células se trasladó a una cámara de perfusión con medio MEC Ca1 y se llevó al microscopio invertido Zeiss Axiovert S100TV equipado con una cámara digital Hamamatsu Orca ER. La fluorescencia roja se registró gracias a un filtro de rodamina. Se adquirieron imágenes de al menos tres campos al azar de cada cristal de las diferentes condiciones, por triplicado, además de imágenes del fondo. Las imágenes se analizaron con el software Aquacosmos 2.6. La intensidad de fluorescencia se calculó para cada cristal restando los valores del fondo.

6. Edición génica de TRPC1 en células HT29 mediante CRISPR/Cas9.

Para la eliminación del canal TRPC1 en las células tumorales HT29 se realizó la edición génica del mismo utilizando la herramienta de ingeniería genética CRISPR/Cas9. Para ello se contó con la colaboración del Dr. Miguel Ángel de la Fuente, experto en modificación génica dirigida del IBGM de Valladolid.

El sistema de edición CRISPR (del inglés *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) asociado a la proteína Cas9 (CRISPR/Cas9) se propuso como un mecanismo de defensa de las bacterias a las infecciones por fagos y transferencia de plásmidos natural (Mojica *et al.*, 2005). Este mecanismo se ha adaptado para la manipulación precisa de secuencias genómicas específicas. De forma muy resumida, el sistema CRISPR consiste en una secuencia guía corta no codificante de ARN (gRNA) de 20 nucleótidos de longitud que aparea con una secuencia específica del ADN (secuencia diana). El gRNA formará una doble hebra con la secuencia diana y atraerá a la endonucleasa Cas9. Para que Cas9 produzca un corte es necesario que en el ADN diana exista una secuencia PAM (del inglés *protospacer-adjacent motif*) formada por tres nucleótidos (NGG, donde N es cualquier nucleótido y G corresponde con guanina) situada inmediatamente después en el extremo 3'. La nucleasa Cas9 producirá cortes en la secuencia diana de ADN de doble cadena. Los cortes en la doble cadena de ADN se pueden reparar de manera natural por reparación de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés *non-homologous end-joining*) o por reparación dirigida por homología (HDR, del inglés *homology-directed repair*). Generalmente, NHEJ da lugar a errores de inserciones y deleciones que pueden desembocar en roturas del marco de lectura, mientras que con HDR se pueden generar inserciones (Cong *et al.*, 2013; Jinek *et al.*, 2012). La herramienta CRISPR/Cas9 se puede utilizar para eliminar secuencias del genoma (KO o *knock-out*), insertar secuencias (KI o *knock-in*) o hacer sustituciones (figura 31).

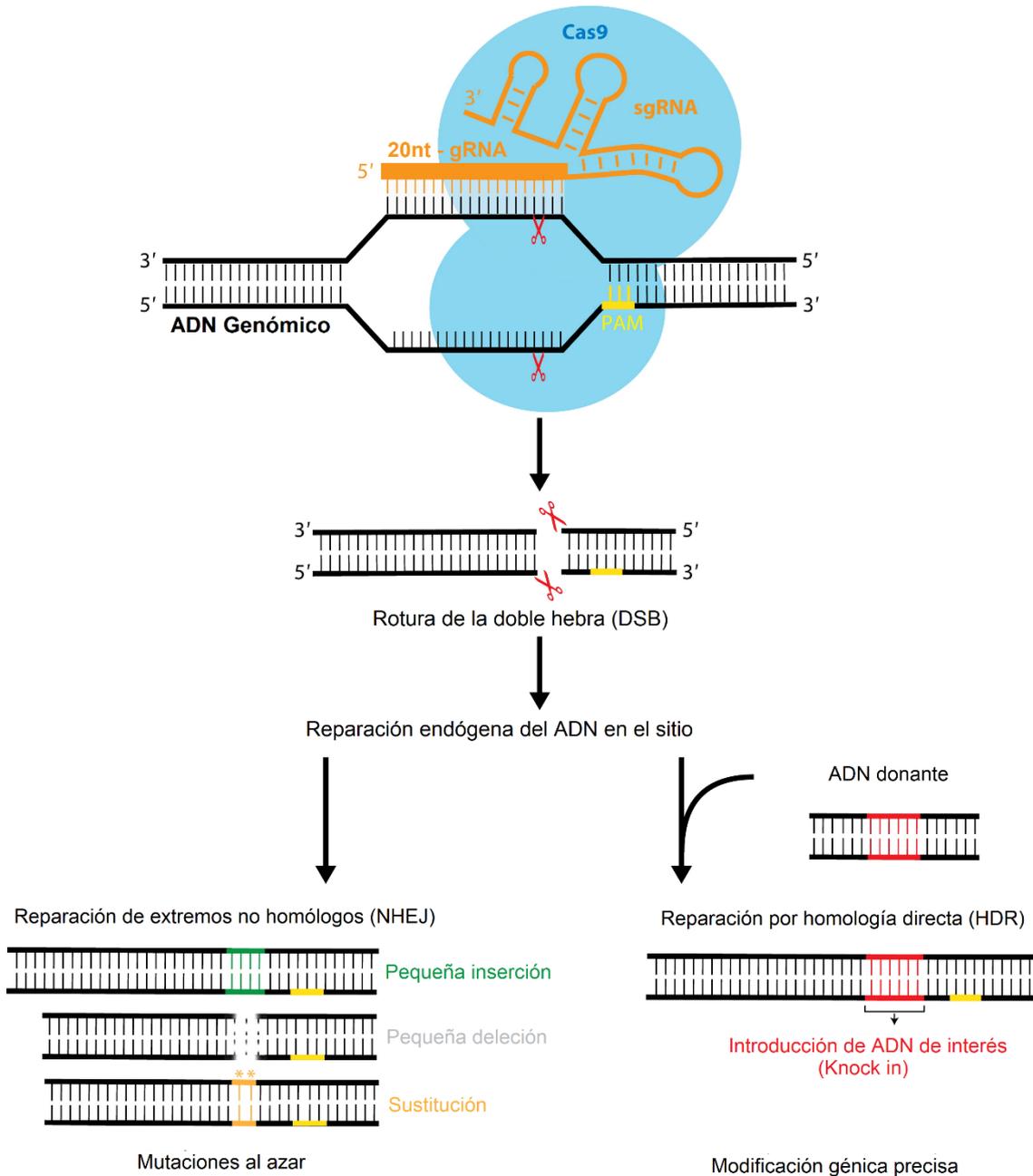


Figura 31. Mecanismo del sistema de edición génica dirigida CRISPR/Cas9. El sistema sgRNA dirige la endonucleasa Cas9 a la secuencia de ADN genómico diana reconocida por los 20nt del gRNA. Entonces, Cas9 introduce un corte en la doble hebra del ADN diana (DSB, *double-strand break*). El DSB generado se repara por los sistemas de reparación de la célula. Si no hay un molde, se produce reparación por extremos no homólogos (NHEJ) y puede provocar inserciones y deleciones al azar, o incluso sustituciones que generalmente desembocan en la rotura del marco de lectura y la disfunción del gen (*knock-out*). Sin embargo, si hay un molde de reparación (por ejemplo, un plásmido donante) flanqueado por brazos de homología, se puede producir la reparación por homología directa (HDR) que da lugar a una modificación génica precisa. Figura modificada de (Jiang and Doudna, 2017).

Para eliminar el canal TRPC1 de las células HT29 se utilizó el sistema de edición CRISPR/Cas9. Se diseñaron dos guías de ARN (gRNA) para producir dos cortes en el ADN en los exones 10 y 13 respectivamente. La reparación se hizo a través de HDR con un plásmido de ADN donante que contenía un gen de resistencia a antibiótico. Para la edición se siguieron los siguientes pasos:

1. Diseño y síntesis de los ARN guía.
2. Diseño y generación de un plásmido donante.
3. Transfección de las células HT29 con la nucleasa Cas9, los ARN guías y el plásmido donante.
4. Selección de clones editados.
5. Análisis de la edición mediante PCR.

6.1. Diseño y síntesis de los ARN guía.

Se utilizó el programa CRISPOR (Concordet and Haeussler, 2018) para diseñar las dos guías de ARN (gRNA). Estas guías son adyacentes a una secuencia PAM en 3', y están localizadas en el exón 10 y en el último exón del canal. De esta manera, la zona a eliminar incluyó el poro del canal y los últimos segmentos transmembrana (figura 32).

Los gRNA se sintetizaron utilizando el kit *GeneArt Precision gRNA Synthesis kit* (Invitrogen, ThermoFisher, Waltham, MA, EE. UU.). Este kit permite sintetizar y purificar gRNA para utilizar con la nucleasa Cas9 utilizando *primers* personalizados para la zona de corte (tabla 1). Primero se identificaron las secuencias de reconocimiento del gRNA con secuencias PAM en su extremo 3', tras lo cual se diseñaron unos *primers* específicos para el gen diana que además incluyen la secuencia promotora T7 para la amplificación por PCR y la región constante de crRNA/tracRNA necesaria para la edición con CRISPR/Cas9. Con estos *primers* se realizó una PCR para generar un ADN molde. Este ADN molde sirvió para generar mediante transcripción *in vitro* el gRNA. Se eliminó el ADN restante mediante un tratamiento con DNAsa y se purificó el gRNA con las columnas incluidas en el kit. Por último, se determinó la concentración del gRNA purificado en el NanoDrop. Los *primers* son de Invitrogen (ThermoFisher, Waltham, MA, EE. UU.).

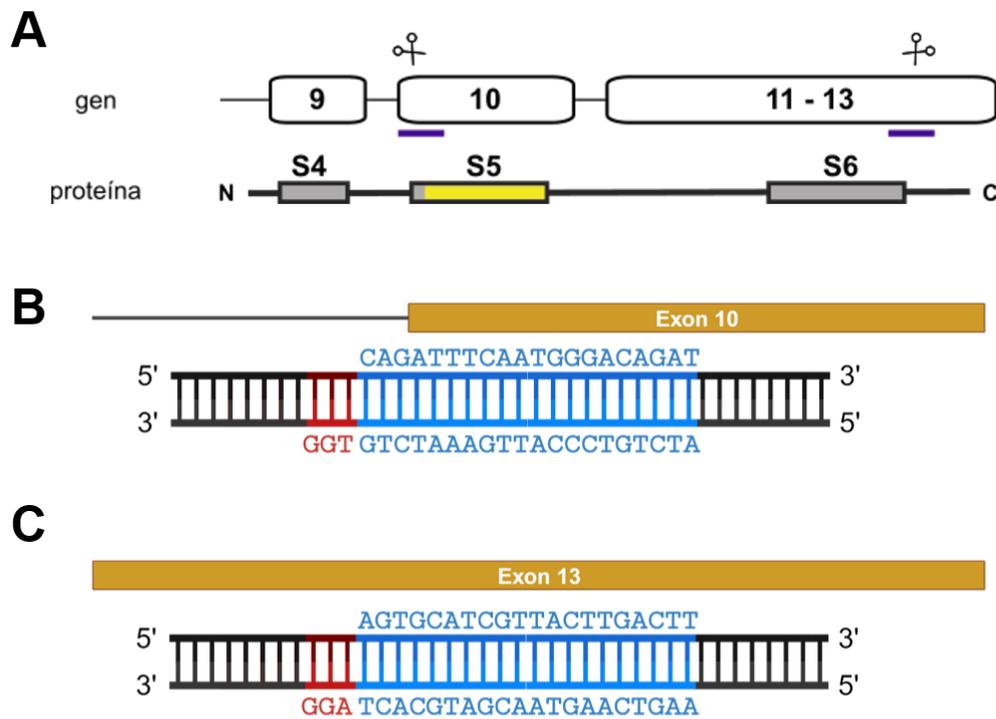


Figura 32. Localización y secuencias de las gRNA para la edición de TRPC1. A. Esquema de la distribución de los últimos exones del gen de TRPC1 y su traducción a proteína. S4, S5 y S6 se corresponden con segmentos transmembrana. En amarillo se indica el poro del canal. Las líneas azules indican la localización de los gRNA diseñados. B. C. Secuencia y localización de los gRNA para el corte en el exón 10 (A) y 13 (B). En rojo se indican las secuencias PAM en el extremo 3' de las guías.

Nombre	Secuencia
gRNA1	F: TAATACGACTCACTATAGATCTGTCCCATTGAAATCTG R: TTCTAGCTCTAAAACCAGATTTCAATGGGACAGAT
gRNA2	F: TAATACGACTCACTATAGAAGTCAAGTAACGATGCACT R: TTCTAGCTCTAAAACAGTGCATCGTTACTTGACTT

Tabla 1. Secuencias de los gRNA. *Primers* utilizados para generar los gRNA con el kit GeneArt. En azul se resaltan los pares de bases que coinciden con la secuencia de ADN. Los *primers* directos o *forward* (F) contienen sin resaltar la secuencia promotora T7, mientras que los *primers* reverso o *reverse* (R) contienen sin resaltar la secuencia 5' del final de la secuencia constante del crRNA/tracrRNA necesaria para el reconocimiento de la maquinaria CRISPR/Cas9.

6.2. Diseño del plásmido donante.

Se diseñó un plásmido con un casete de resistencia al antibiótico blasticidina para la reparación de los cortes de la nucleasa Cas9. La secuencia del gen de resistencia estaba flanqueada por dos brazos de homología: brazo 1 o *arm 1*, homóloga al extremo 5' de la secuencia de ADN reconocida por la primera guía (exón 10), y brazo 2 o *arm 2*, homóloga al extremo 3' de la secuencia de ADN reconocida por la segunda guía (exón 13). De esta manera, tras el doble corte producido por la Cas9 en los dos lugares reconocidos por los gRNA, se produjo recombinación con el plásmido donante y se insertó el gen de resistencia en las células editadas (figura 33).

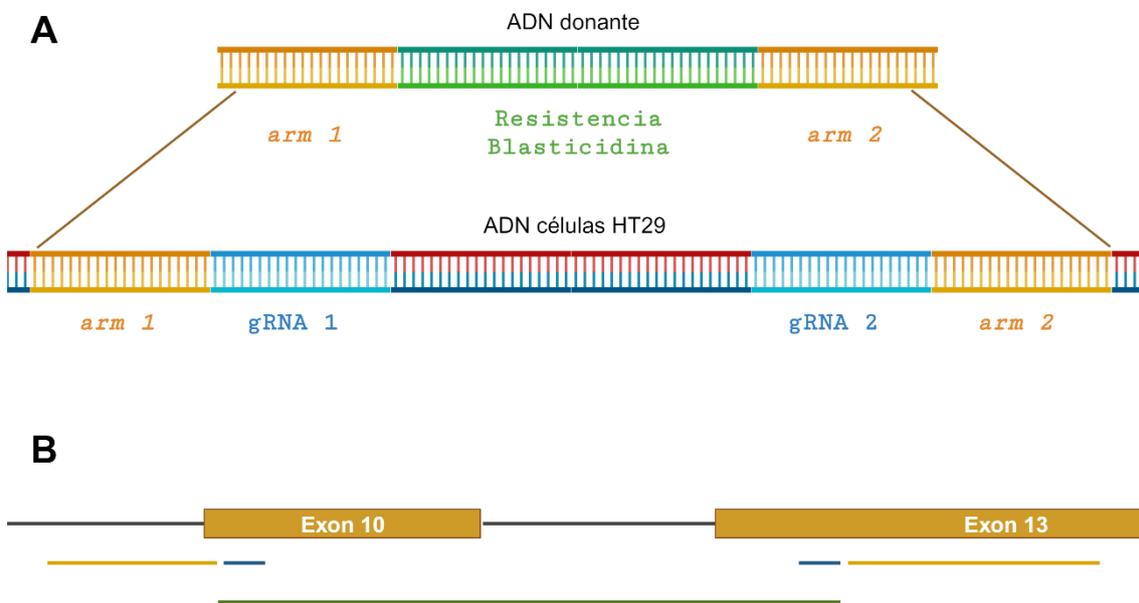


Figura 33. Esquema del ADN donante y la reparación por homología. El ADN donante contiene un casete de resistencia a blasticidina y dos regiones de homología que flanquean la zona de corte para que se produzca la reparación. En la parte inferior se indica de forma esquemática dónde están las zonas que reconocen las gRNA (azul), los brazos de homología (naranja) y dónde se insertaría el casete de resistencia (verde) en la secuencia de exones.

6.3. Transfección de las células HT29.

Las células HT29 se transfectaron con las dos secuencias gRNA, el ADN donante y la proteína Cas9. La transfección se realizó mediante electroporación utilizando el Neon Transfection System (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Se utilizó un programa específico para células HT29: 3 pulsos de 10 ms de 1600 V con una pipeta

de 100 μl . Concretamente, por cada 10^6 células HT29 se añadieron 2 μg de cada gRNA y 1 μg de ADN donante. Se utilizó la proteína Cas9 v2 TrueCut para generar el corte del ADN (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

Las células HT29 se levantaron con tripsina, se lavaron con PBS para eliminar el medio y se contaron. Se preparó el complejo ribonucleoproteico (RNP) añadiendo, por cada 10^6 células, 50 μl de buffer R, 1 μl de Cas9 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y 2 μg de cada una de las guías. El complejo RNP se dejó 15 minutos a temperatura ambiente. Mientras tanto, se preparó el equipo. Las células HT29 se resuspendieron en 70 μl de buffer R por cada 10^6 células utilizadas. Se mezcló la suspensión de células con el complejo RNP y se añadió 1 μg de ADN donante. Se cogieron 100 μl de la mezcla con una pipeta especial para el Neon. La pipeta se introdujo en el Neon y se realizó la electroporación. Las células electroporadas se sembraron en una placa de 6 pocillos con medio DMEM 1 g/L glucosa, a una densidad de 10^6 células/pocillo. A las 24-48 horas se cambió el medio de las células para retirar las células muertas. En cada experimento de electroporación se utilizaron, al menos, 3×10^6 células.

6.4. Selección de clones editados.

Tras la transfección, las células se sembraron para obtener clones únicos, es decir, colonias de célula que procedan de una única célula y, por lo tanto, sean iguales genéticamente. Para ello, fue necesario realizar una dilución límite. Esta dilución consiste en sembrar las células a concentraciones tan bajas que podamos asegurar que hayan crecido a partir de una única célula.

Las células HT29 electroporadas se mantuvieron 72-96 horas en cultivo tras la transfección. Las células se levantaron con tripsina y se contaron. Se sembraron en placas de 96 pocillos, realizando diluciones seriadas, para conseguir una densidad desde 10 células/pocillo hasta 0,1 células/pocillo, es decir, una célula cada 10 pocillos. Las células restantes se congelaron con DMEM y 10% DMSO. Las placas se incubaron a 37 °C, 10% CO₂ y a las 48 horas se añadió al medio el antibiótico blasticidina (Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) a una concentración de 14 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Esta concentración es letal para las células HT29, por lo que eliminará aquellas células que no hubiesen incorporado el casete de resistencia del ADN donante. Por lo tanto, las células donde se produjo el corte y se repararon por homología con el ADN donante,

resistieron el antibiótico (figura 34). De esta manera se realizó una selección de los clones editados.

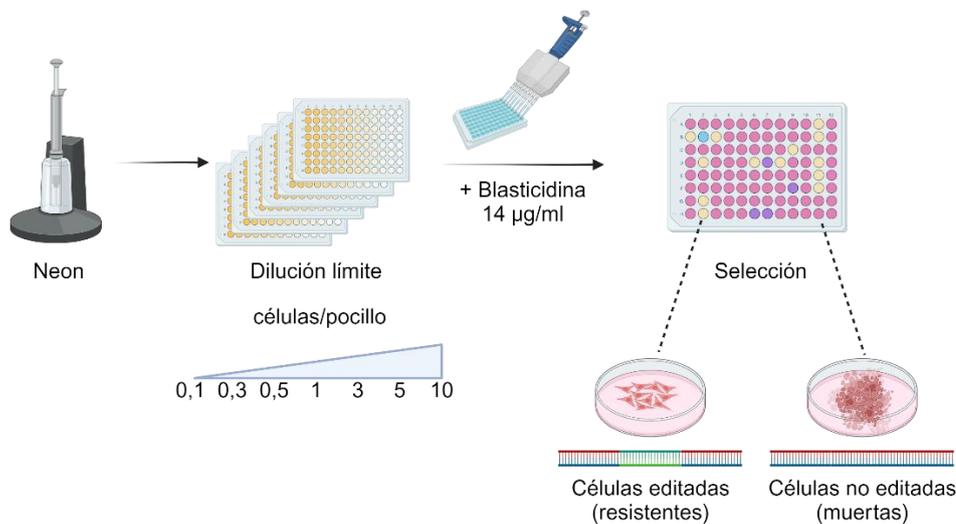


Figura 34. Dilución límite y selección de clones con el antibiótico blasticidina.

6.5. Análisis de los clones.

Una vez hecha la selección por resistencia a antibiótico, se analizaron las células para comprobar si la edición había tenido lugar de forma correcta. El análisis se realizó a nivel genético mediante PCR. En resumen, se analizaron tres parámetros:

- Presencia o ausencia del fragmento eliminado. Para ello, se diseñaron unos *primers* que reconocían los exones 11 y 12 y, por lo tanto, amplificaban parte del fragmento eliminado. Si la edición se había producido en ambos alelos, esta banda no aparecía.
- Deleción del fragmento. Se diseñaron unos *primers* externos a la zona eliminada y a la zona de homología. Si se había producido el corte y eliminado el fragmento, la banda resultante era mayor que la banda de las células sin editar o WT.
- Inserción correcta del gen de resistencia. Para ver si el casete de blasticidina se había insertado correctamente en las zonas de homología, se utilizaron los *primers* externos y *primers* internos al casete de resistencia para los extremos 3' y 5'. Si se había producido el corte y la reparación por homología, estas bandas aparecerían del tamaño esperado.

Los *primers* que se utilizaron para la comprobación de la edición se muestran en la tabla 2. En la figura 35 se indican de manera esquemática las zonas de apareamiento de los diferentes *primers* utilizados (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

Comprobación	<i>Primers</i> 5' → 3' (Nombre identificativo)	Tamaño esperado (pb)
Fragmento interno	F: GGCAATCTTTGTCACAAGATTTAG (Ex.11) R: CCACTTACTGAGGCTACTAATCAT (EX.12)	~ 550 (WT)
Fragmento externo	F: TAGGGATAGAATTGCTGGGTCA (Ext. 5P) R: GTACCTTGGGAGATAAGCTCAA (Ext. 3P)	~ 3800 (WT) ~ 5200 (KO)
Casete de resistencia	Ext. 5' F: TAGGGATAGAATTGCTGGGTCA (Ext. 5P) R: GCAGGCGTTACATAACTTACGG (Blast. 5P)	~ 920 (KO)
	Ext. 3' F: TAAGGCATAGGCATCAGGGG (Blast. 3P) R: GTACCTTGGGAGATAAGCTCAA (Ext. 3P)	~1300 (KO)

Tabla 2. Listado de *primers* utilizado para la de la edición de TRPC1 en células HT29. Se señalan los pares de *primers* y el tamaño de banda esperado para cada una de las reacciones de comprobación de la edición. Entre paréntesis se indica el nombre identificativo dado a cada uno de los *primers*. pb: pares de bases; WT: *wild type*; KO: *knock-out*.

7. Extracción de ADN y PCR

La extracción del ADN genómico de las células editadas se realizó en las placas de 96 pocillos. En los pocillos donde tenemos cultivos a partir de un único clon (clones únicos) se añadieron 200 µl de buffer de lisis (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,5% SDS) con de proteinasa K (200 µg/ml). Se incubó durante toda la noche y al día siguiente se extrajo el ADN genómico. Al lisado se añadió etanol absoluto (600 µl), 5M NaCl (20 µl) y glucógeno (2 µl) y se incubó a -20 °C para precipitar el ADN durante al menos 20 minutos. Se centrifugó la mezcla a 10.000 g durante 15 minutos y el pellet de ADN se lavó con etanol 70% dos veces. El pellet de ADN se resuspendió en tampón TE con RNAsa 80 µg/ml y se determinó la concentración de ADN utilizando el NanoDrop.

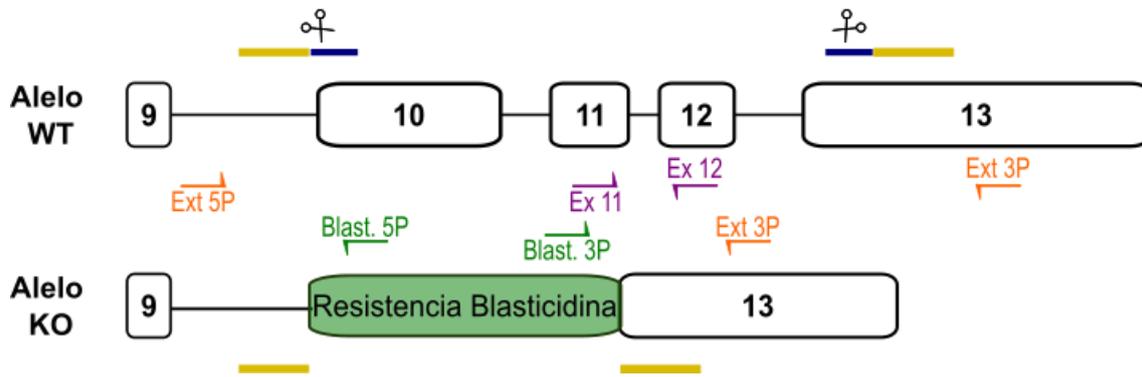


Figura 35. Zonas de reconocimiento de los *primers* para la comprobación de la edición. En la parte superior se muestra un alelo WT y en la parte inferior un alelo editado donde se ha producido la recombinación y se ha insertado el casete de resistencia. En azul se señalan las zonas de corte reconocidas por los gRNA. En amarillo se señalan los brazos de homología, presentes en el alelo WT y en el alelo KO. Los *primers* en morado, correspondientes a los exones 11 y 12 sirven para comprobar si se ha producido el corte y se ha eliminado el fragmento. Las células KO no presentarán esta banda. Sin embargo, las células WT y HZ sí presentarán banda. Los *primers* en naranja sirven para la comprobación de la edición con el inserto y están situados fuera de los brazos de homología. Las células KO presentaran una banda de menor tamaño que las células WT. En cambio, las células HZ presentarán las dos bandas, una de cada alelo. Los *primers* en verde sirven para comprobar si el casete de resistencia se ha insertado en el lugar correspondiente. Se miró el extremo 5P y el extremo 3P del casete, con los *primers* de dentro del casete y los *primers* externos. Las células KO y HZ presentarán las bandas correspondientes al casete si éste se ha insertado en el lugar correcto, mientras que las células WT no presentarán estas bandas.

El análisis de los clones se realizó mediante PCR en gel de agarosa al 1%. Se utilizaron los *primers* específicos para cada una de las combinaciones de comprobación indicados en la tabla 1. La PCR se realizó en un termociclador TGradient (Biometra, Gotinga, Alemania) utilizando la ADN polimerasa Phusion™ Hot Start I, nucleótidos dNTPs, los *primers* y el ADN genómico extraído. Las condiciones de PCR se indican a continuación en la tabla 3. Por último, el producto de la PCR se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

	Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización	1	98	240
Alineamiento	40	98	10
		63	20
		72	45
Extensión	1	72	600

Tabla 3. Protocolo de amplificación de PCR.

La proteinasa K, el glucógeno, la ADN polimerasa y los dNTPs se obtuvieron de ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.), los *primers* se obtuvieron de Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y los reactivos para el tampón de lisis se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt, Alemania).

8. Extracción de ARN y RT-qPCR.

La extracción de ARN se llevó a cabo mediante el método fenol-cloroformo utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) en células sembradas en placas de 6 pocillos. Las células se levantaron con un *scraper*, el ARN se separó con cloroformo, se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol al 75% y se disolvió en H₂O de calidad PCR. La calidad y concentración del ARN extraído se determinó en el espectrofotómetro NanoDrop mediante la medida de la densidad óptica a 260 y/o 280 nm. El cloroformo, isopropanol, etanol y H₂O grado PCR fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt, Alemania).

Previo a la retrotranscripción del ARN, se eliminó el ADN genómico que pudiese quedar utilizando *RapidOut DNA Removal kit* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). En primer lugar, se trató 1 µg de ARN con DNAsa I durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, la DNAsa se eliminó utilizando el reactivo DDR. Con el ARN purificado se realizó la transcripción reversa (RT, del inglés *reverse transcription*) en un termociclador TGradient utilizando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) para obtener el ADN complementario (ADNc). La reacción se llevó a cabo en presencia de tampón 10X, mezcla de dNTPs, cebadores al azar, transcriptasa reversa MultiScribe, inhibidor de RNAsa (todos ellos incluidos en el kit) y H₂O grado PCR. Por cada µg de ARN en un volumen de 10 µl se añadieron 10 µl de la mezcla de reacción en tubos de PCR. Los tubos se llevaron al termociclador y se realizó la transcripción reversa que consistía en un ciclo de 10 minutos a 25 °C, seguido de dos horas a 37 °C y, por último, 5 minutos a 85 °C.

Para determinar los niveles de expresión de los genes de interés llevamos a cabo una PCR cuantitativa (RT-qPCR) en una placa de 96 pocillos apta para el equipo LightCycler 480 (Roche, Mannheim, Alemania). Para llevar a cabo la reacción hace falta el ADNc, y una solución *master mix* formada por KAPA SYBR FAST qPCR Kit (Kapa Biosystems, Boston, MA, EE. UU.), 10 µM de cebadores o *primers* específicos para cada

gen (tabla 4) tanto directo (*forward*) como reverso (*reverse*), y H₂O grado PCR hasta un volumen final de 20 µl por pocillo (1 µl de ADNc y 19 µl de máster mix). Los *primers* se obtuvieron de Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), a excepción de los *primers* para el fragmento que amplifica en los primeros exones de TRPC1 (Ex.1-2) que fueron obtenidos de IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EE. UU.). Las muestras se cargaron por triplicado. Como control de carga o gen *housekeeping* se utilizó *β-actina* o el gen para la proteína ribosomal L18 (*RPL18*). El protocolo de amplificación se define en la tabla 5.

Gen	Primers (5' → 3')	Tamaño esperado (pb)
<i>MCU</i>	F: ACTTTGGTGCTATGGGGTGG R: AGGTCCATTTCTGCCTGAGC	296
<i>ORMDL3</i>	F: CATCGGTCTCCTCCACATCG R: CACGATGGGTGTGATGGTCA	238
<i>PMCA4</i>	F: TGGTCAAGTCGCAACTACCC R: GGCAGTCACTAACACCACGA	106
<i>SEPTIN6</i>	F: TTTGTGAAGCTGCGGGAGAT R: AGCCCATCTCCTCCAGCTTA	112
<i>SPCA2</i>	F: TTCCTCTACTCCGTCCTGGG R: CTCTTGGGGCTGCAACAGTA	191
<i>TRPC1 (Ex.1-2)</i>	Hs.PT.58.40507851 *	114
<i>TRPC1 (Ex.11-12)</i>	F: GGCAATCTTTGTCACAAGATTTAG R: CCACTTACTGAGGCTACTAATCAT	292
<i>TRPC5</i>	F: CCTGGTAGTGCTGCTGAACA R: GGGCTGGGGATGATGTTGAA	165
<i>TRPP1</i>	F: GAGCCTAGACGTGTGGATCG R: GAGCACAGGTCGGTGTTACA	183
<i>TRPV6</i>	F: CCTTTGCTGCCTGTGTGAAC R: AGGTTGTACATCTGGCAGGC	151
<i>VDAC3</i>	F: TCTATGGCTGGGCTGTGTTG R: ATGTGTGTGCAGCTGGAAGT	137
<i>RPL18</i>	F: AACTGATGATGTGCGGGTTC R: CAGCTGGTCGAAAGTGAGG	121
<i>β-ACTINA</i>	F: TACGCCAACACAGTGCTGTCTGG R: TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT	206

Tabla 4. Cebadores utilizados para qPCR de genes de interés. Se indica la secuencia de los *primers* y el tamaño esperado del amplicón que generan. pb: pares de bases; F: *forward*; R: *reverse*. *La secuencia de los *primers* para la amplificación de la región de los exones 1-2 de TRPC1 es confidencial y se indica el código de referencia.

	Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Pre-incubación	1	95	300
Amplificación	40	95	15
		60	20
		72	5
Curva de Melting	1	95	5
		55	60
		95	--
Enfriamiento	1	40	10

Tabla 5. Protocolo de qPCR en el equipo LightCycler 480.

La expresión génica fue cuantificada gracias a la sonda SYBR Green I, incluida en el kit de qPCR. Esta sonda se une al ADN de doble cadena y emite fluorescencia entre 465 y 510 nm que puede ser detectada por el equipo. A mayor cantidad de ADN, mayor será la fluorescencia emitida. Por lo tanto, según avanza la reacción y se sintetizan más copias, mayor será la fluorescencia. Por lo tanto, la fluorescencia es proporcional al ARN de partida y al ADNc obtenido a partir de él. Cuanto mayor sea la expresión del gen diana, mayor será el número de copias sintetizado, mayor será la fluorescencia y antes se alcanzará un valor umbral de fluorescencia. Este umbral lo establece el equipo y nos da el valor Ct, definido como el número de ciclos de reacción necesarios para alcanzar el valor umbral (figura 36). El valor Ct será inversamente proporcional al ARN de partida y cuanto más bajo sea, indica una mayor expresión del gen. Para normalizar los valores de expresión de los genes diana, se utilizan controles endógenos (L18, β -actina) y se calcula el valor $2^{-\Delta Ct}$ donde $\Delta Ct = Ct_{\text{diana}} - Ct_{\text{endógeno}}$. Posteriormente, comparamos el valor del gen de interés entre nuestras muestras problema y las muestras control (HT29 vs NCM460, por ejemplo, o células tratadas vs sin tratamiento) con el valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{problema}} - \Delta Ct_{\text{control}}$.

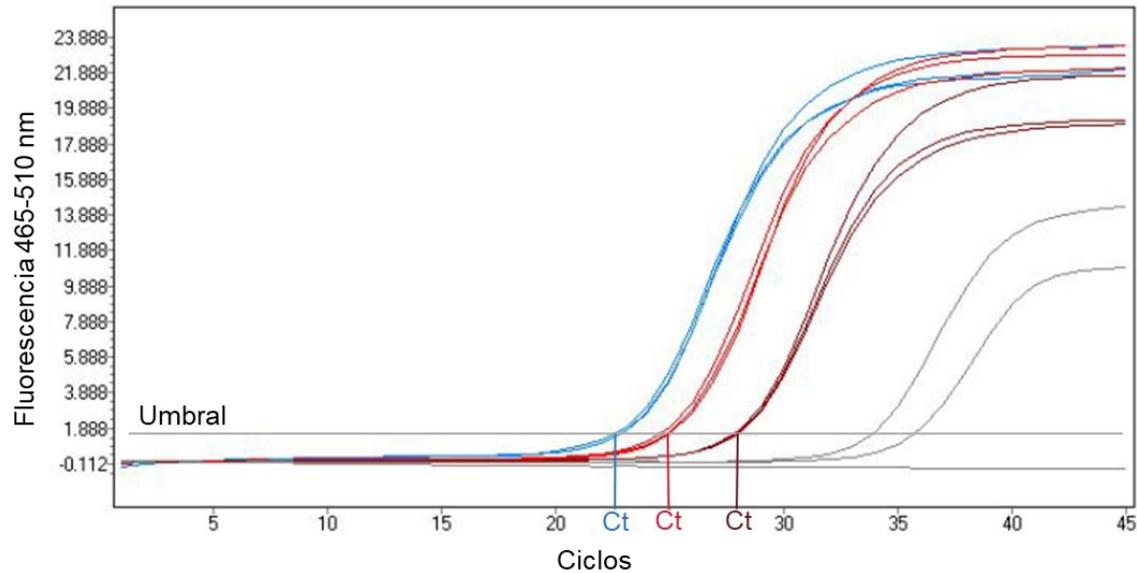


Figura 36. Curvas de amplificación de qPCR. Según aumenta el número de ciclos, aumenta el número de copias de ADNc sintetizadas y, por lo tanto, la fluorescencia hasta alcanzar un valor umbral donde el cambio de fluorescencia es significativo, estableciendo el valor Ct. En este caso, el gen azul tiene un valor Ct menor que el gen rojo, por lo que la expresión de azul será mayor que la expresión de rojo.

9. Extracción de proteínas y *Western Blotting*.

Para el aislamiento y purificación de proteínas se utilizó el tampón de extracción y lisis RIPA (20 mM Tris-HCl pH 7,8; 150 mM NaCl, 1% Tritón X-100, 1% ácido desoxicólico, 1 mM EDTA y 0,05% SDS) suplementado con el cóctel inhibidor de proteasas *Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail* 100X. Tanto el tampón RIPA como el cóctel inhibidor de proteasas se obtuvieron de ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.). La extracción se realizó en células cultivadas en placas de 6 pocillos cuando alcanzaron el 70-90% de confluencia. A cada pocillo se añadieron 500-1000 μ l de RIPA y se levantaron las células con un *scraper*, tras lo cual se sonicaron 3 veces con pulsos y se centrifugaron a 12000 g durante 20 minutos. El sobrenadante se recogió y se cuantificó la cantidad de proteínas por el método de Bradford utilizando el *Bradford Protein Assay Kit* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.).

La expresión de las proteínas de interés se determinó mediante la técnica de *western-blotting* (WB). El WB permite separar las proteínas según su peso molecular y carga realizando una electroforesis SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) para detectarlas posteriormente utilizando anticuerpos específicos. Para realizar el WB, las muestras de proteína se diluyeron a partes iguales con *buffer* de carga (para 10 ml:

3 ml ddH₂O, 3 ml Glicerol, 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 2,05 ml 10% SDS, 0,2 ml 0,5% azul de bromofenol, 50 µl β-mercaptoetanol) y se incubaron a 95 °C durante 5 minutos para romper los puentes disulfuro y desnaturalizar las proteínas. La separación de las proteínas se realizó mediante SDS-PAGE (8-10% Bis-acrilamida; 375 mM Tris HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,5% APS; 0,05% TEMED) en un sistema de electroforesis Mini-Protean (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.). Las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF (Milipore, Bedford, MA, EE. UU.) con el sistema Trans-Blot Turbo Transfer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.). Tras la transferencia, la membrana se bloqueó durante 2 horas con una solución de bloqueo que contiene 5% de leche en polvo en solución de lavado TTBS (0,1% Tween 20; 10% TBS 10X – 25 mM Tris-HCl, 0,9% NaCl, pH 7,5). Posteriormente, la membrana fue incubada durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario específico. Al día siguiente, la membrana se lavó con TTBS y se incubó durante 1 hora con un anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano. Los anticuerpos y las diluciones utilizadas se recogen en la tabla 6. Finalmente, las proteínas se detectaron utilizando el sustrato Pierce ECL (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y el sistema de imagen VersaDoc (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.). La cuantificación de proteínas se llevó a cabo utilizando el software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU) e Image J. La proteína β-actina se utilizó como control de carga y los resultados de expresión se normalizaron respecto a ella. La bisacrilamida es de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EE. UU.). El APS y el TEMED son de Fluka (Merck, Darmstadt, Alemania). El resto de los materiales para los geles y soluciones (Tris, Glicerol, SDS, β-mercaptoetanol, Tween20, NaCl) son de Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt, Alemania).

Anticuerpos primarios	Tipo	Dilución	Casa comercial (referencia)
Conejo anti-TRPC1	Monoclonal	1:1000	Abcam (ab51255)
Conejo anti-TRPC1	Policlonal	1:1000	Alomone-Labs (ACC-010)
Ratón anti-β-actina	Monoclonal	1:5000	Abcam (ab8227)

Anticuerpos secundarios	Dilución	Casa comercial (referencia)
Burro anti-conejo IgG	1:2000	GE Healthcare (NA9340)
Conejo anti-ratón IgG	1:10000	Abcam (ab6728)

Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

10. Inhibición farmacológica de TRPC1.

La inhibición del canal TRPC1 se abordó farmacológicamente con el compuesto Pico145 (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, EEUU). Pico145 es una molécula pequeña (figura 37) capaz de inhibir los canales TRPC1/4/5 a bajas concentraciones, en el rango pico-nanomolar. La inhibición es específica y no afecta a otros canales TRP ni a canales SOC (Rubaiy *et al.*, 2017).

Las células HT29 y NCM460 se trataron con Pico145 10 nM o 100 nM en medio MEC Ca1 durante los 30 minutos previos al experimento de Ca^{2+} , tras cargar las células con Fura-2/AM.

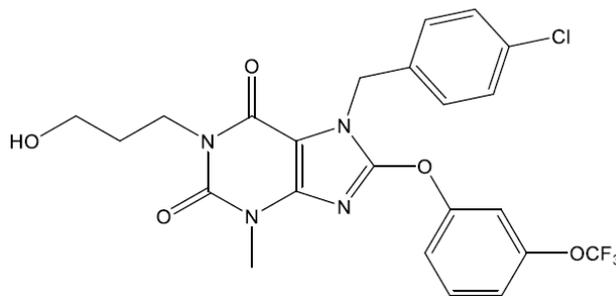


Figura 37. Estructura química del compuesto Pico145.

11. Ensayo de proliferación celular utilizando EdU.

Para medir la proliferación celular se utilizó el ensayo *Click-iT EdU Proliferation Assay Alexa Fluor 594* (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Este método se basa en la incorporación de un análogo modificado de la timidina, el EdU (5-etinil-2-desoxiuridina), en el ADN de nueva síntesis de las células en replicación. EdU puede ser reconocido por el fluoróforo Alexa 594 a través de una reacción click mediada por cobre (figura 38).

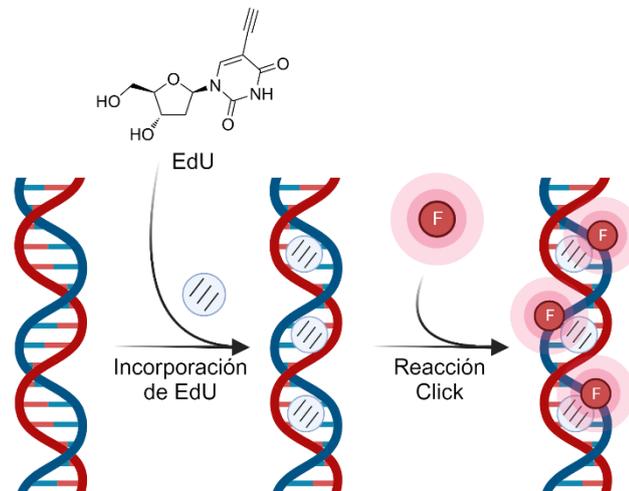


Figura 38. Esquema de la reacción de click-iT. Primero se incorpora a las moléculas de ADN de nueva síntesis el análogo EdU. Posteriormente, este análogo se detecta con un fluoróforo mediante una reacción de click. Figura realizada con BioRender.com.

Las células se sembraron en cubreobjetos de 12 mm de diámetro tratados con poli-L-lisina con medio completo. Al día siguiente, se retiró el FBS del medio durante 48 horas para la sincronización del ciclo celular, tras lo cual se añadió medio completo con FBS. A las 24 horas, realizamos el ensayo de proliferación. Incubamos las células en DMEM completo con EdU 10 μM durante 6 horas. Pasado ese tiempo, retiramos el medio con el análogo modificado, lavamos 3 veces con PBS (3 x 5 minutos) y fijamos con paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Alemania) durante 20 minutos. Lavamos nuevamente con PBS, permeabilizamos con 0,5% Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Alemania) durante 20 minutos, lavamos con PBS e incubamos con el cóctel de detección (tabla 7) durante 30 minutos en oscuridad. Posteriormente se lavaron con PBS y se marcaron los núcleos con Hoechst (incluido en el kit) diluido 1:3000 en PBS durante 20 minutos en oscuridad. Se lavaron los cristales con PBS, con ddH₂O (10 minutos) y se montaron en portaobjetos. Se detectó fluorescencia azul (núcleos) y roja (EdU) en un microscopio Nikon Eclipse 90i (Nikon, Tokio, Japón). Se tomaron imágenes de tres campos al azar, por triplicado de cada una de las condiciones. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ.

Reactivo	Concentración (μl para 1ml final)
Tampón de reacción 1X	86% (860 μl)
CuSO ₄	4% (40 μl)
Alexa Fluor	0,25% (2,5 μl)
Aditivo 1X	10% (100 μl)

Tabla 7. Reactivos para el cóctel de detección del ensayo de proliferación Clik-iT Edu.

12. Silenciamiento génico mediante siRNA.

Para estudiar el efecto de genes concretos en la homeostasis del Ca²⁺ se recurrió al silenciamiento génico utilizando ARN pequeño de interferencia (siRNA, del inglés *small interfering RNA*). El siRNA es una molécula de doble cadena de ARN de 21-23 pares de bases y que hace su efecto a nivel post-transcripcional mediante un mecanismo basado en el ARN de interferencia (RNAi). El RNAi es un mecanismo biológico por el cual se forma una doble hebra de ARN (dsRNA) que induce el silenciamiento génico y marca ese ARN para su degradación. Los dúplex de siRNA son reconocidos por el complejo RISC (del inglés *RNA-induced silencing complex*) donde interacciona con una endonucleasa que rompe la doble cadena. Entonces, la cadena antisentido del siRNA reconoce la secuencia complementaria de ARN mensajero (ARNm) y guía al complejo RISC hasta él. En ese momento tiene lugar la degradación del ARNm por la actividad endonucleasa, lo que impide su traducción a proteína (Alshaer *et al.*, 2021). Las moléculas de siRNA son específicas y eficientes para la disminución de la expresión de genes concretos (figura 39).

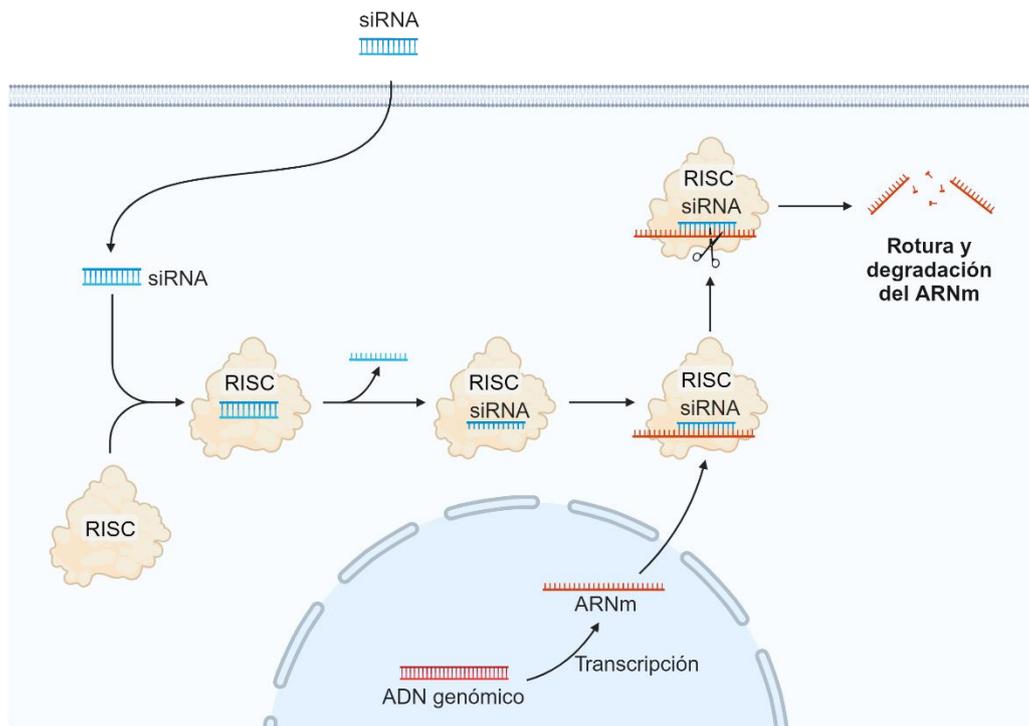


Figura 39. Silenciamiento génico con siRNA. La molécula de siRNA se introduce en la célula donde es reconocida por el complejo RISC. Este complejo rompe el dúplex de ARN y localiza la secuencia de ARNm complementaria, se forma una doble hebra de ARN que es degradada por la endonucleasa de RISC evitando su traducción a proteína. Figura creada con BioRender.com.

Para el silenciamiento génico en células HT29 se utilizó el *TriFECTa Kit DsiRNA Duplex* (IDT, Coralville, IA, EE. UU.) con los siRNA indicados en la tabla 8. Se utilizaron tres siRNA específicos de cada gen. Como control del silenciamiento específico, se utilizó siRNA control, el cual no se une a ningún gen conocido. La introducción de los dúplex de siRNA se llevó a cabo mediante nucleofección. Para ello, por cada reacción, se transfectaron 10^6 células HT29 junto con 50 pmol de siRNA (5 μ l de siRNA 10 μ M) en 100 μ l de solución de nucleofección (tabla 9). La solución con las células y los siRNA se añadió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y se llevó a un Amaxa Nucleofector II (Amaxa Biosystems, Colonia, Alemania) donde se seleccionó el programa W-017 diseñado para transfectar células HT29 con alta eficiencia. A las 48 horas de la nucleofección se comprobó la eficiencia del silenciamiento mediante qRT-PCR. Los experimentos de Ca^{2+} se llevaron a cabo 72 horas después de la nucleofección, siempre y cuando el silenciamiento fuese al menos del 50%. Los reactivos para las soluciones de nucleofección son de Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt, Alemania).

Gen	Localización siRNA	Referencia
TRPV6	3' UTR Exón 15	hs.Ri.TRPV6.13
	Región codificante Exón 15	
	Región codificante Exón 13	
ATP2C2 (SPCA2)	Región codificante exón 14	hs.Ri.ATP2C2.13
	Región codificante exones 25, 26, 27	
	3' UTR exones 27,28	

Tabla 8. siRNAs utilizados para el silenciamiento génico.

Solución A	Solución B	Protocolo
88 mM KH ₂ PO ₄	0,36 M ATP	1. Preparar las soluciones y filtrar.
14 mM NaHCO ₃	0,6 M MgCl ₂	2. Mezclar 4 ml de solución A y 80 µl de solución B.
2 mM D-Glucosa		3. Resuspender 10 ⁶ células en 100 µl de mezcla.

Tabla 9. Soluciones empleadas para la nucleofección.

13. Medida de los niveles intracelulares de poliaminas.

Los niveles intracelulares de poliaminas se detectaron usando PolyamineRED (Funakoshi Co. Ltd, Tokio, Japón), un reactivo que detecta las poliaminas intracelulares. Se compararon los niveles de las células control y con DFMO (Tocris Bioscience, Bio-Techne Brand, Bristol, Reino Unido) 5 mM en medio DMEM con FBS dializado (Lonza, Basilea, Suiza) durante 96 horas para inhibir completamente la síntesis de poliaminas. Tras el tratamiento, las células se incubaron en oscuridad 30 minutos con 30 µM PolyamineRED en medio sin suero. Las células se fijaron y se marcaron los núcleos en oscuridad con DAPI (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) 1:5000. Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron con un microscopio invertido Nikon Eclipse 90i utilizando un filtro para TRITC. Los niveles de fluorescencia se analizaron con el software ImageJ. Se tomaron imágenes de tres campos al azar, por triplicado, de cada una de las condiciones.

14. Registros electrofisiológicos mediante *patch-clamp* planar.

Los registros electrofisiológicos se realizaron utilizando un sistema de *patch-clamp* planar automático Port-a-patch de Nanion Technologies (Múnich, Alemania). Este sistema tiene un chip donde se colocan las células para registrar las corrientes (figura 30). Utilizamos la configuración de célula completa (*whole-cell*) fijando el voltaje (*voltage clamp*). Los registros se realizaron a temperatura ambiente.

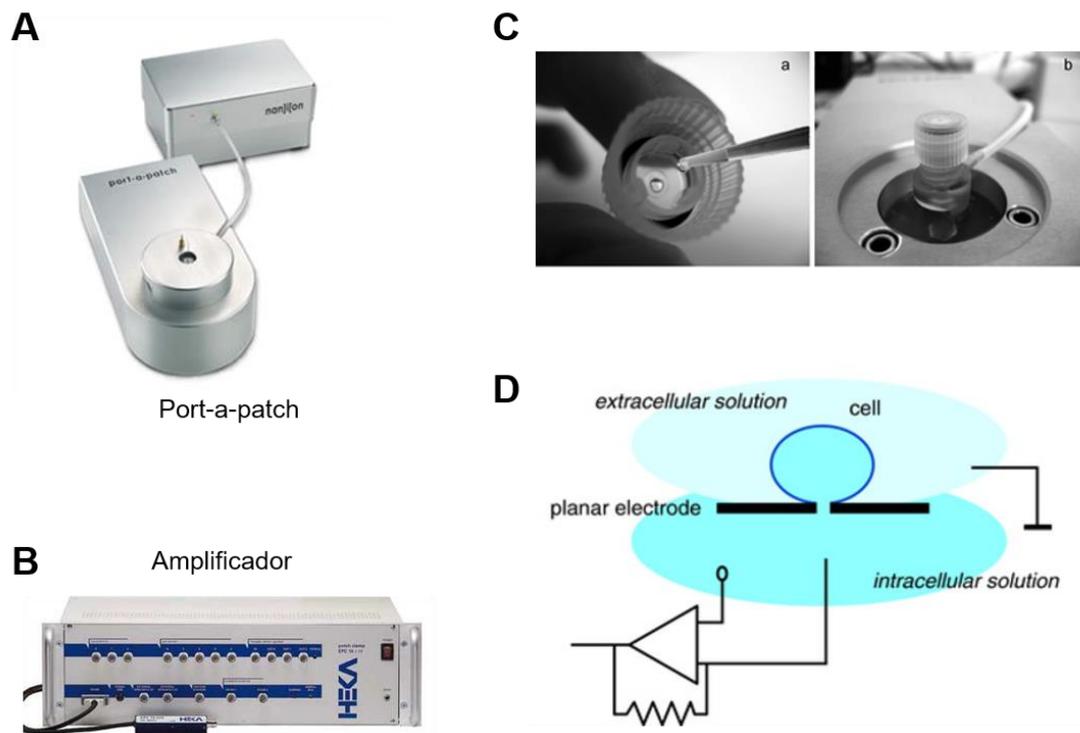


Figura 40. Elementos de un equipo *Port-a-patch clamp planar*. A. Estación de Port-a-patch donde se colocan las células, equivalente a la pipeta del *patch-clamp* convencional. B. Amplificador de la señal HEKA. C. Chip donde se colocan las células. En la parte interna del chip (imagen izquierda) se coloca la solución interna. Posteriormente, este chip se coloca en el port-a-patch (imagen derecha) y se añade la solución externa y las células. D. Esquema del *patch-clamp* planar. La célula se coloca en un electrodo plano (en nuestro caso el chip). Los electrodos están colocados en la solución interna y externa. Al abrir la célula, ésta se pone en contacto con la solución interna, por lo que podemos controlar ambas soluciones. Las imágenes del equipo se obtuvieron de Nanion Technologies (A), HEKA Instruments (B). La imagen del chip donde se colocan las soluciones y células (C) se obtuvo de (Kreir *et al.*, 2008). El esquema del funcionamiento del *patch-clamp* planar (D) se obtuvo de (Wickenden, 2000).

Para medir las corrientes de HT29 o NCM460 las células se sembraron en placas de 6 pocillos con o sin tratamiento durante 3-5 días, se levantaron con Detachin (Amsbio, Cambridge, MA, EE. UU.) y se centrifugaron. El pellet celular se resuspendió a una

densidad de $1 - 5 \times 10^6$ células/ml en solución externa, diferente según las corrientes que queramos medir. Se utilizaron chips NPC-1 (Nanion Technologies, Múnich, Alemania) diseñados para el Port-a-patch adecuados para el tamaño de las células HT29 y NCM460 (3-5 MΩ). En la parte interna de los chips se colocó la solución interna. Las soluciones externas e internas utilizadas se indican al final del apartado. El chip se colocó en la base Port-a-patch y se añadieron las células en la superficie (figura 40C). Para registrar las corrientes se utilizó la configuración *whole cell* en la cual la célula se abre y se miden las corrientes de toda la célula. El protocolo de pulsos de voltaje cambia según las corrientes estudiadas y se indica al final del apartado. Se registró la intensidad de corriente con un amplificador EPC-10 (HEKA Instruments, Stuttgart, Alemania). Se utilizó la capacitancia celular para estimar el tamaño de la célula y normalizar los registros. Para considerar como buenos los registros, la resistencia que se debe alcanzar o sello debe ser mayor de 400 MΩ y se debe mantener a lo largo del experimento. Para el análisis de corrientes se utilizó el software Patchmaster (HEKA Instruments, Stuttgart, Alemania) y GraphPad Prism. A la corriente total se restó la corriente de fuga o *leak* y las corrientes se normalizaron con respecto a la capacitancia celular (pA/pF).

Para las corrientes de K^+ se utilizó una solución externa que contenía, en mM: 140 NaCl, 10 HEPES, 5 Glucosa, 4 KCl, 1 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, pH 7,4. La solución interna contenía, en mM: 50 KCl, 10 NaCl, 60 KF, 20 EGTA, 10 HEPES, pH 7,2. Se aplicaron pulsos cuadrados que van desde -70 mV a +70 mV, aumentando 10 mV cada 500 ms y manteniendo un potencial de -70 mV. De esta manera vamos activando todos los canales de K^+ . Para obtener las corrientes de K^+ mediadas por los canales hEAG (Kv10.1) y hERG (Kv11.1) se utilizó Astemizol 5 μM . La corriente de canales Kv se bloqueó utilizando tetra-etil-amonio o TEA.

Para las corrientes TRPC se utilizó una solución externa que contenía, en mM: 130 NaCl, 10 HEPES, 8 Glucosa, 1,2 $MgCl_2$, 1,5 $CaCl_2$ pH 7,4. A esta solución se añadió Nifedipina 5 μM y ácido niflúmico 100 μM para bloquear los canales de Ca^{2+} y Cl^- respectivamente. La solución interna contenía, en mM: 85 CsCl, 8 NaCl, 2 $MgCl_2$, 60 CsF, 1 EGTA, 10 HEPES, 5 Na-ATP, pH 7,2. Se aplicaron rampas despolarizantes desde -100 mV a +100 mV de 50 ms de duración manteniendo un potencial de 0 mV. Estas rampas se aplicaron cada 5 segundos. Para bloquear las corrientes de TRPC1/4/5 se utilizó Pico145 200 nM.

Los reactivos para las soluciones, así como los inhibidores astemizol y TEA, se obtuvieron de Sigma-Adrich (Merck, Darmstadt, Alemania). El inhibidor Pico145 se obtuvo de MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, EE. UU.).

15. Análisis transcriptómico de genes.

El análisis transcriptómico fue llevado a cabo por el Dr. Enrique Pérez-Riesgo a través de muestras de ARN de células control y células tratadas. El ARN se extrajo utilizando GeneMATRIX Universal Purification Kit (EURx Molecular Biology Products, Gdansk, Polonia). El análisis transcriptómico se llevó a cabo con microarrays Clarion D Human (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE. UU.) en el Centro Andaluz de Medicina Regenerativa (CABIMER, Sevilla, España) o a nivel transcriptómico mediante la tecnología de RNA-seq (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) en Sistemas Genómicos S.L. (Valencia, España). El análisis de datos fue llevado a cabo por el Dr. Enrique Pérez-Riesgo utilizando el software de libre acceso R (R Core Team, 2020) como se detalla en (Pérez-Riesgo *et al.*, 2023).

Las células HT29 y NCM460 se sembraron en placas de 10 cm de diámetro (10^6 células por placa) y al día siguiente se trataron con DFMO 5 mM, en medio DMEM 1g/l glucosa con 10% de FBS dializado. Las células control se mantuvieron con DMEM y FBS dializado, pero sin tratamiento de DFMO. El tratamiento se mantuvo durante 96 horas, momento en el cual se realizó la extracción de ARN. Se realizó la transcriptómica mediante microarrays de las dos líneas celulares tratadas y sin tratar, de manera que se generaron cuatro condiciones: HT29 control, HT29 DMFO, NCM460 control y NCM460 DFMO. Los datos de transcriptómica se analizaron con el software R. Primero, se realizó un control de calidad. Se analizó la distribución de las muestras y la posible presencia del efecto lote (muestras del mismo lote – día, por ejemplo – se parecen más entre ellas que muestras de lotes distintos) con los datos sin normalizar. Después se llevó a cabo la comparación de patrones normalizando y transformando el conjunto de datos para hacer las muestras comparables entre sí. Posteriormente, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) y la detección de valores atípicos. También se realizaron análisis jerárquicos de grupos o *cluster* y se emplearon modelos para explicar la variabilidad. Tras el control de calidad, el conjunto de datos fue preprocesado para normalizar el fondo y eliminar aquellos genes de los que no se disponía una

correspondencia con las anotaciones usadas en los análisis de expresión diferencial (ALIAS). Por último, el análisis de la expresión diferencial se llevó a cabo a través de modelos lineales para datos de microarrays (método limma). Los factores fijos fueron la línea celular (HT29, NCM460) y el tratamiento (control, DFMO), mientras que los factores aleatorios fueron el día en que se extrajeron las muestras. Para controlar los errores por falsos positivos, se empleó el FDR (del inglés *false discovery rate*) que es la proporción esperada de falsos positivos de entre todos los test considerados significativos. Las diferencias se consideraron significativas cuando $FDR < 0,05$.

16. Análisis estadístico.

Los datos de imagen de Ca^{2+} citosólico fueron analizados con R mediante modelos lineales mixtos que tienen en consideración las posibles variaciones de las muestras entre los diferentes días de experimento o entre los diferentes cristales. El resto de los datos fue analizado con R u Origin2019 Pro.

La comparación de datos con dos condiciones se llevó a cabo mediante la prueba T de *student* utilizando el software R. Para el análisis de varias condiciones se utilizaron modelos lineales mixtos en R. Para ellos, se estudió la normalidad y homocedasticidad de los datos, y se transformaron cuando no cumplían alguno de los supuestos. Una vez transformados, se utilizó el análisis de varianza ANOVA y se realizó la comparación de poblaciones dos a dos mediante una prueba Tukey o Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. La transferencia de mitocondrias modula la homeostasis del calcio intracelular.

1.1. Las células tumorales HT29 pueden ser mitoceptadas con mitocondrias aisladas de células normales NCM460.

La técnica de mitocepción o *MitoCeption* como se describe en Caicedo *et al.*, 2015 consiste en introducir mitocondrias aisladas en una célula receptora mediante un choque térmico y un proceso de centrifugación. Utilizamos esta técnica para transferir mitocondrias de células normales NCM460 a células tumorales de colon HT29 y estudiamos sus efectos en la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos o SOCE. El protocolo utilizado en este estudio se ilustra en la figura 41 (ver el apartado métodos para una descripción más detallada).

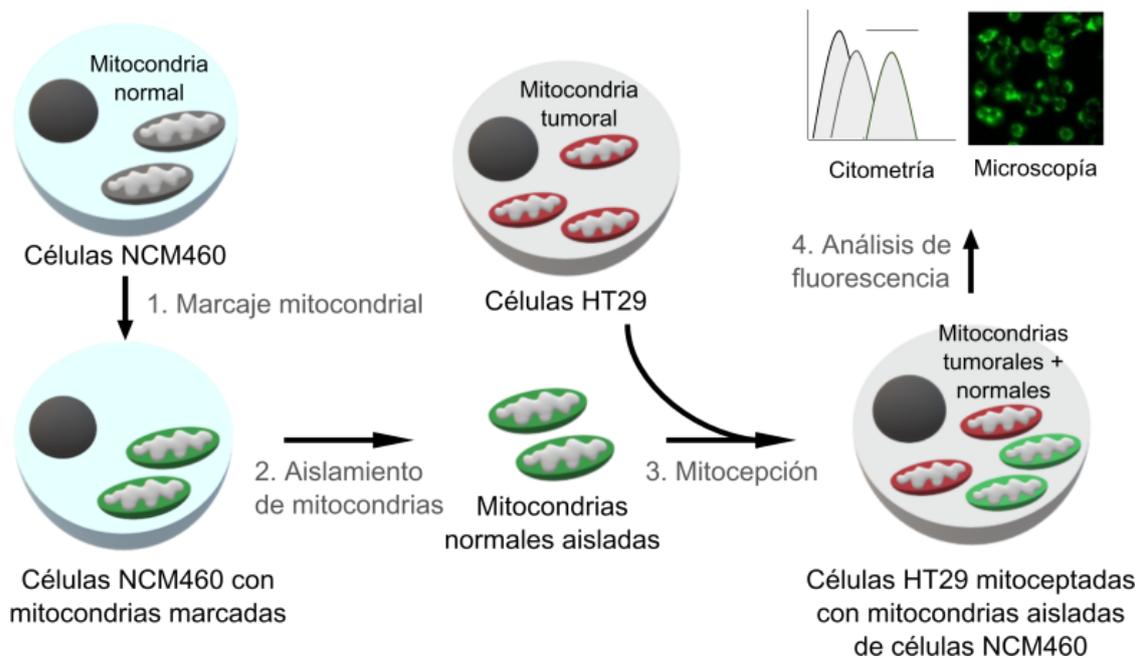


Figura 41. Esquema del proceso de mitocepción. Las mitocondrias de las células donantes NCM460 son marcadas. Después, las mitocondrias son aisladas y transferidas a las células receptoras HT29. La eficiencia de la transferencia se comprueba midiendo la intensidad del marcador mediante citometría de flujo o microscopía.

Para comprobar la transferencia con éxito de las mitocondrias, antes de comenzar el proceso marcamos estos orgánulos en las células NCM460. Se utilizó el marcador MitoTracker Green ya que únicamente depende de la masa mitocondrial y es fácil de observar. Se midió la fluorescencia del marcador a diferentes tiempos para comprobar

si el marcaje de las mitocondrias se mantiene hasta después de su transferencia a las células receptoras. El marcaje con MitoTracker Green se perdió a lo largo del tiempo, de manera que, a las 24 horas, la intensidad de fluorescencia se redujo más del 50 % y continuó desapareciendo con el paso del tiempo (figura 42). Por lo tanto, la tinción de las mitocondrias de las células NCM460 se llevó a cabo 1-2 horas antes del aislamiento mitocondrial para así poder observar diferencias en la fluorescencia 24 horas después de la mitocepción.

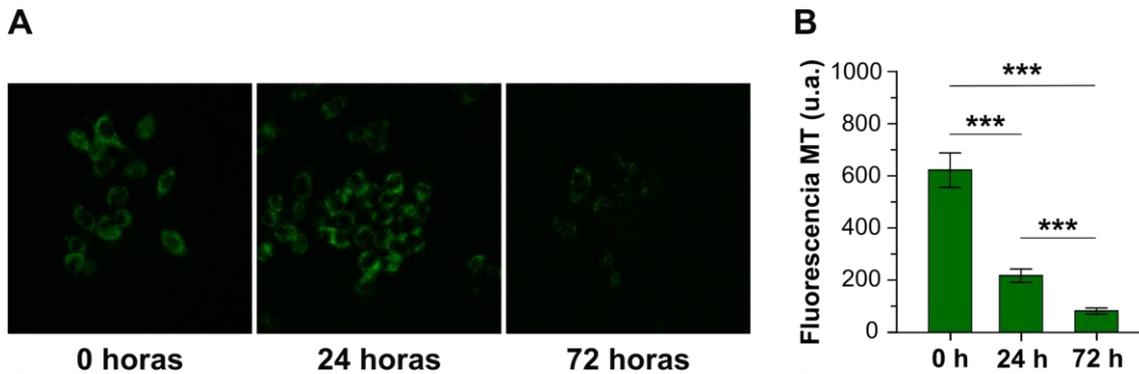


Figura 42. La fluorescencia verde de las células NCM460 marcadas con MitoTracker Green disminuye a lo largo del tiempo. A. Imágenes representativas de células NCM460 tras marcaje mitocondrial con 250 nM de MitoTracker Green tomadas inmediatamente después (izquierda), tras 24 horas (centro) o a los 3 días (derecha) de la tinción. B. Cuantificación a diferentes horas de la fluorescencia verde en células NCM460 marcadas con MitoTracker Green. Las barras representan la media \pm EEM de 10-25 células de 3 experimentos independientes. *** $p < 0,001$.

Para comprobar que el marcaje de las mitocondrias con MitoTracker no afecta a la SOCE, se midió esta entrada tanto en células normales como en células tumorales marcadas con MitoTracker Green una hora antes del experimento. No se observaron diferencias entre las células control y las células marcadas al medir SOCE ni en células tumorales HT29 (figura 43A), ni las células normales NCM460 (figura 43B).

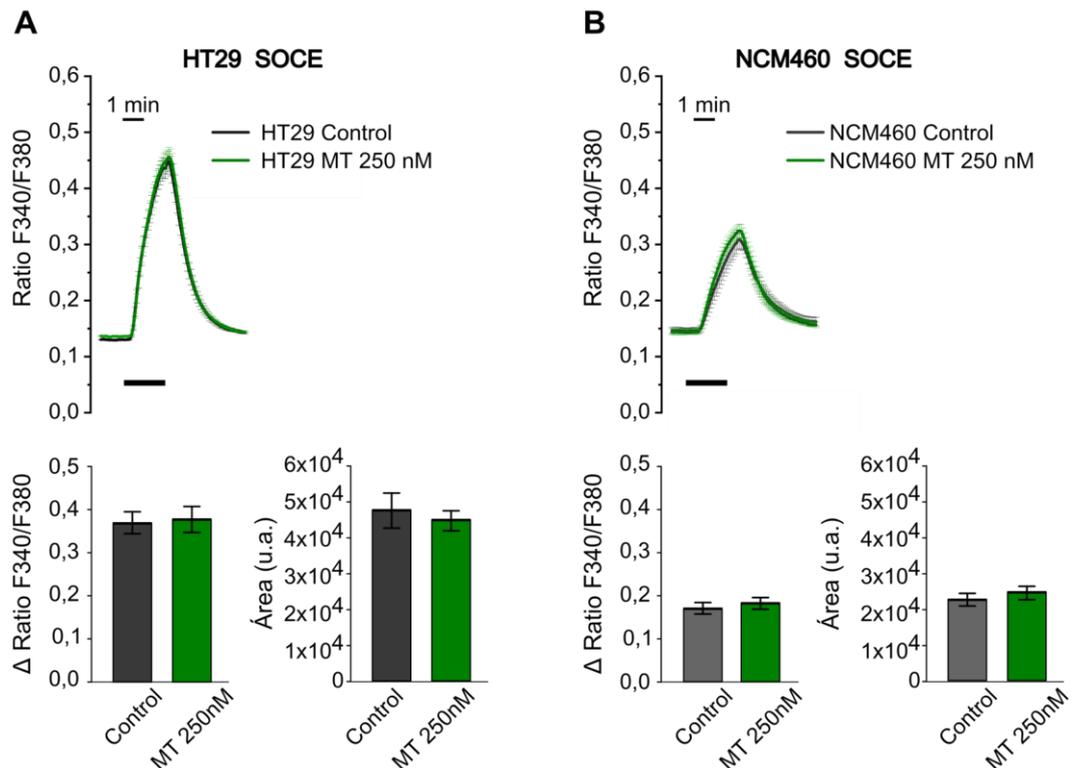


Figura 43. MitoTracker Green no afecta a SOCE en células HT29 o NCM460. Medimos SOCE en células HT29 (A) y células NCM460 (B) sin marcar (Control, en negro) o marcadas con MitoTracker Green (MT 250 nM, en verde). Para activar SOCE usamos taspigargina en medio libre de Ca^{2+} . Los trazos de la parte superior se corresponden con la media \pm EEM de 15-20 células de un experimento representativo de la fluorescencia recogida al excitar a 340-380 nm. La barra negra debajo de los registros indica el intervalo de tiempo en presencia de Ca^{2+} extracelular. Las barras de la parte inferior representan la altura (Δ Ratio) y área media \pm EEM de las curvas de calcio 30-60 células de tres experimentos independientes.

Una vez comprobamos que la fluorescencia del marcador se mantenía 24 horas después y no afectaba a las medidas de Ca^{2+} , las mitocondrias fueron aisladas de células NCM460 como se indica en la metodología. Tras el aislamiento, se procedió a la mitocepción. Adaptamos el protocolo a nuestras condiciones, de manera que centrifugamos conjuntamente en un tubo de microcentrífuga 100 μl de PBS conteniendo las células receptoras con diferentes cantidades de mitocondrias aisladas (1, 10 o 50 μg de mitocondrias aisladas en un volumen de 10-20 μl de PBS). El grupo control fue tratado igual que el grupo mitoceptado, centrifugando 100 μl de células con 10-20 μl de PBS en las mismas condiciones. Las células control y mitoceptadas se mantuvieron en cultivo 24 horas hasta el análisis de la fluorescencia mediante citometría de flujo. La señal fluorescente del MitoTracker aumentó conforme aumentamos la cantidad de mitocondrias transferidas (figura 44), indicando la validez de la técnica. Concretamente,

observamos que más del 75% de las células mitoceptadas mostraban fluorescencia verde tras añadir 50 μg de mitocondrias aisladas de NCM460 y marcadas.

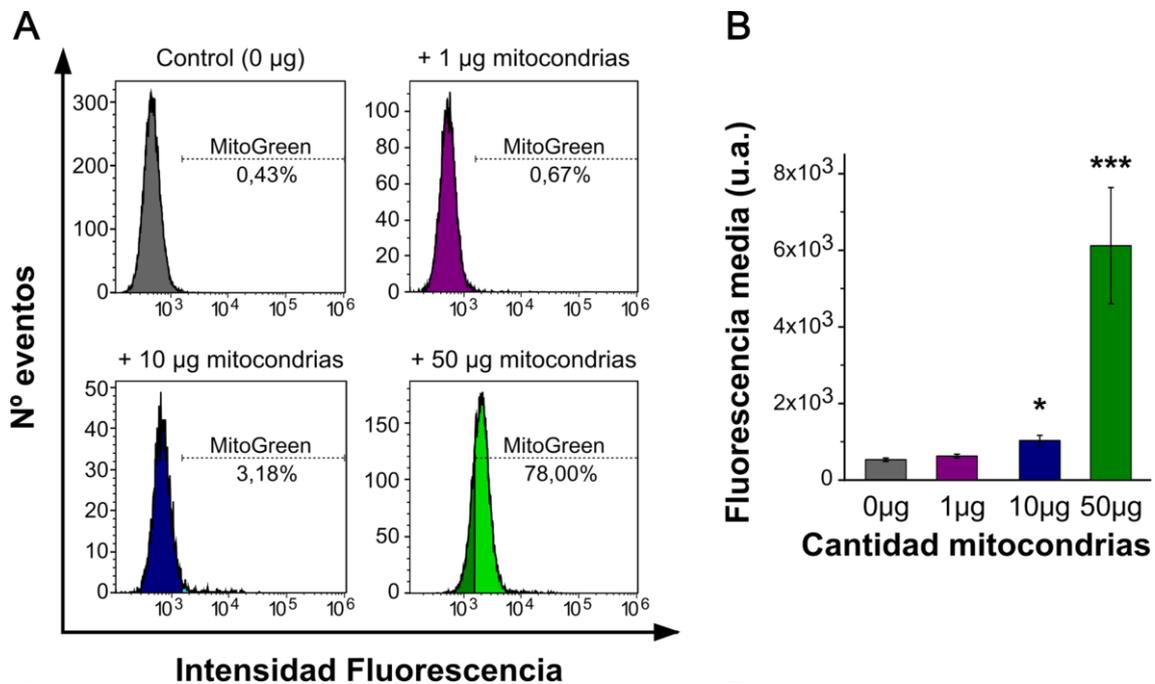


Figura 44. La fluorescencia en las células mitoceptadas aumenta según aumenta la cantidad de mitocondrias. Al analizar mediante citometría de flujo la fluorescencia verde en células HT29 mitoceptadas con diferentes cantidades de mitocondrias de NCM460, observamos un aumento en la intensidad media de la fluorescencia cuanto mayor es la cantidad de mitocondrias aisladas transferidas. A. Curvas representativas de un experimento de citometría de flujo con células HT29 control (solo PBS) o mitoceptadas con diferente cantidad de mitocondrias aisladas de NCM460 (1, 10 o 50 μg respectivamente). B. Media \pm EEM de la intensidad de fluorescencia verde en al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ en referencia al control.

La transferencia de mitocondrias por centrifugación produjo muerte celular alta, por lo que implantamos otra metodología para mejorar la cantidad de células disponibles para pasos posteriores: se realizó un co-cultivo de las células receptoras con las mitocondrias aisladas. Para ello, se añadieron las mitocondrias aisladas directamente sobre células sembradas en cubreobjetos y se mantuvieron en el incubador *overnight*. 24 horas después del co-cultivo, se analizó la fluorescencia en las células mitoceptadas. Se observó que la intensidad de fluorescencia de las células mitoceptadas mediante co-cultivo era menor que en las células centrifugadas con las mitocondrias exógenas (figura 45A). Sin embargo, el número de células con un tamaño y complejidad adecuados, para una misma cantidad de mitocondrias transferidas, fue mayor cuando se utilizó el método del co-cultivo (figura 45C). De manera similar a lo que ocurría con la transferencia por

centrifugación, los niveles de fluorescencia verde fueron proporcionales a la cantidad de mitocondrias añadidas al cultivo de células (figura 45B). Es decir, el método de co-cultivo fue eficaz en la transferencia mitocondrias entre células donadoras y receptoras y, de esta manera, obtuvimos un mayor número de células viables para procesos posteriores.

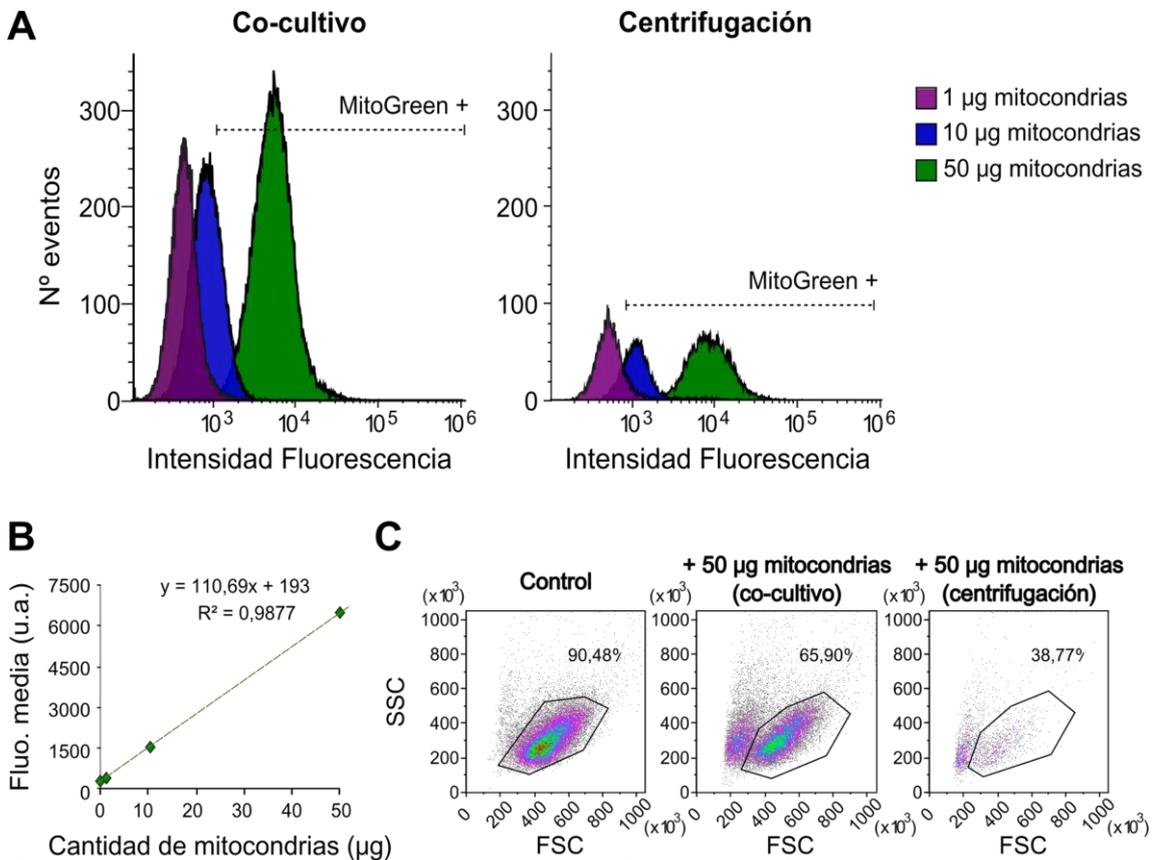


Figura 45. La mitocepción en las células HT29 se puede realizar mediante co-cultivo con las mitocondrias aisladas. A. Curvas de citometría representativas de un experimento de mitocepción en células HT29 haciendo co-cultivo de las mitocondrias aisladas con las células receptoras (panel izquierdo) o centrifugando mitocondrias y células receptoras (panel derecho). En ambos casos la fluorescencia aumenta acorde a la cantidad de mitocondrias transferidas. Sin embargo, mediante co-cultivo, el recuento celular es mayor. B. Recta de regresión que relaciona la intensidad de fluorescencia con los microgramos de mitocondrias transferidas. Se presenta en el gráfico la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación R^2 . C. Paneles representativos comparando tamaño frente a complejidad en células HT29 control (panel izquierdo) y células HT29 mitoceptadas con 50 µg de mitocondrias mediante co-cultivo (panel central) o centrifugación (panel derecho). Se selecciona la población de células que se corresponde con el tamaño (FSC) y complejidad (SSC) de las HT29.

Finalmente, comprobamos mediante microscopía confocal la incorporación de mitocondrias marcadas aisladas de células NCM460 en las células HT29 mediante el método de co-cultivo (figura 46). Mientras que en las células HT29 control no observamos fluorescencia alguna, en las células que han sido mitoceptadas,

observamos fluorescencia verde, proveniente del MitoTracker utilizado para marcar las mitocondrias de las células NCM460 que fueron aisladas y transferidas a las células HT29.

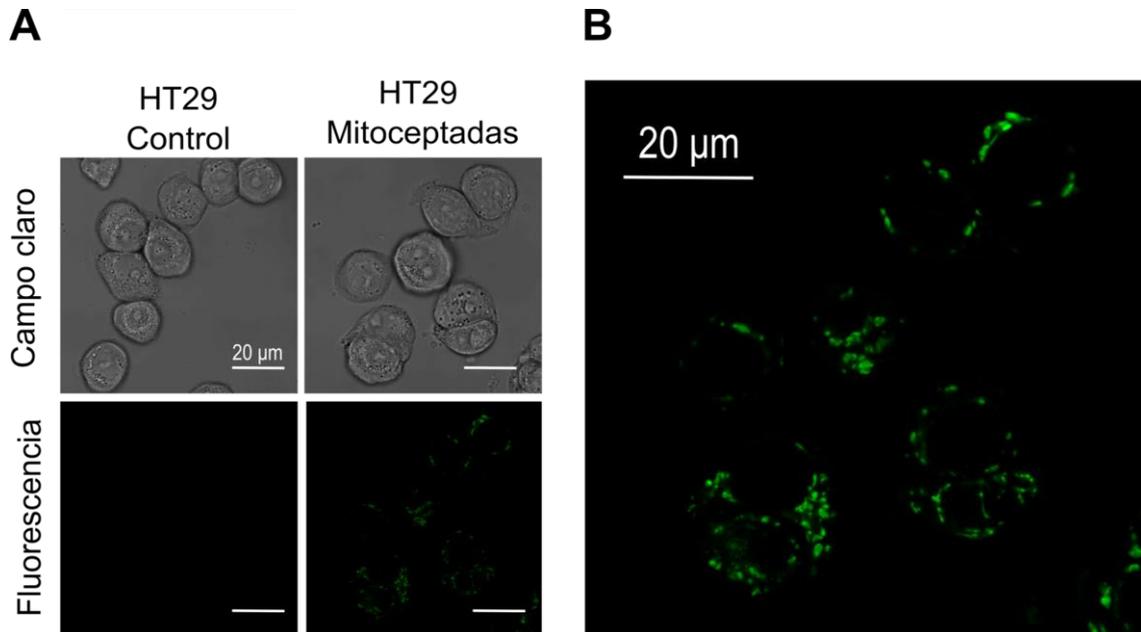


Figura 46. Las células HT29 mitoceptadas incorporan mitocondrias verdes que se pueden observar mediante microscopía confocal. Imágenes de microscopía confocal tomadas con un objetivo de 63X. La barra blanca de escala equivale a 20 µm. A. Imágenes de células HT29 control (izquierda) y mitoceptadas (derecha) tomadas en campo claro (panel superior) o en fluorescencia para el canal verde (panel inferior). B Imagen de fluorescencia verde de células HT29 mitoceptadas con 50 µg de mitocondrias marcadas aisladas de células NCM460.

1.2. La mitocepción de células tumorales HT29 con mitocondrias de células normales reduce SOCE.

Se ha descrito que las mitocondrias pueden actuar como tampón de Ca^{2+} y que tienen un papel importante en la regulación de SOCE dentro de la célula (Watson and Parekh, 2012). Este orgánulo es capaz de captar Ca^{2+} del citoplasma regulando así los procesos de activación e inactivación de las corrientes I_{CRAC} (Gilbert and Parekh, 2000). Además, resultados previos del laboratorio han demostrado que existen diferencias en la captación de Ca^{2+} mitocondrial entre células tumorales y normales. Nuestro grupo ha descrito que las mitocondrias de las células tumorales, pero no de las células normales, son capaces de prevenir la inactivación lenta dependiente de Ca^{2+} de las corrientes I_{SOC} , sosteniendo así la entrada de Ca^{2+} durante más tiempo (Hernández-Morales *et al.*, 2017).

Para comprobar si la transferencia de mitocondrias provocaba cambios en la homeostasis del Ca^{2+} , estudiamos qué ocurría con la SOCE en las células HT29 que contenían mitocondrias aisladas de células NCM460. Se mitoceptaron células tumorales HT29 con 50 μg de mitocondrias aisladas de células normales NCM460, generando las células que denominamos HT29 normo-mitoceptadas. Estas células se mantuvieron 24 horas en cultivo, tras lo cual medimos la entrada de Ca^{2+} vía SOCE en las células HT29 control y normo-mitoceptadas. SOCE disminuyó de manera significativa en las células tumorales HT29 normo-mitoceptadas en comparación con las células HT29 control (figura 47).

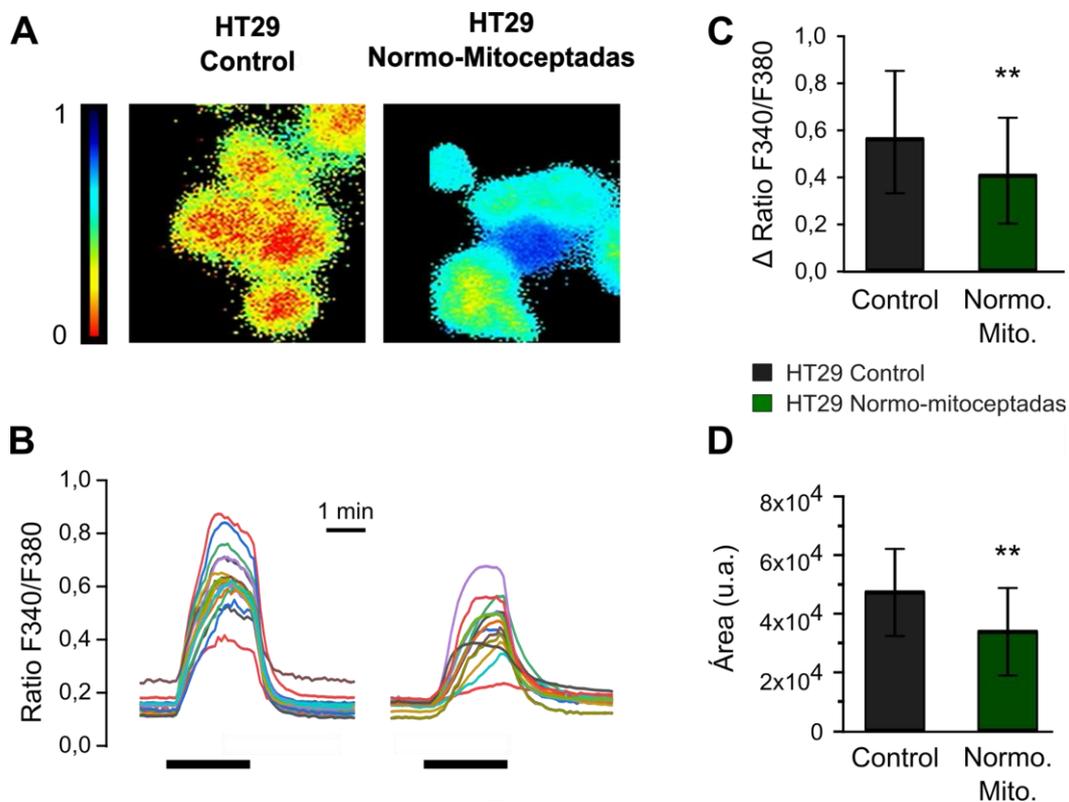


Figura 47. SOCE se reduce en células HT29 normo-mitoceptadas 24 horas después de la transferencia mitocondrial. Medimos SOCE en células HT29 control y células HT29 mitoceptadas con 50 μg de mitocondrias aisladas de células NCM460. A. Imágenes representativas en pseudocolor de experimentos de Ca^{2+} en células HT29 control (izquierda) y células HT29 normo-mitoceptadas (derecha). B. Trazos de registros representativos de células individuales donde se mide el cociente (ratio) de fluorescencias recogidas tras excitar las células a 340 y 380 nm. La barra negra indica el intervalo de tiempo en presencia de medio Ca^{2+} . C. D. Análisis de la altura (Δ Ratio) y área bajo la curva de registros de Ca^{2+} en 112-122 células individuales de 3 experimentos independientes. Se representa la media \pm IC 95% de la altura y el área en las dos condiciones. En negro, células control; en verde, células normo-mitoceptadas. ** $p < 0,01$.

Los niveles de SOCE en las células HT29 normo-mitoceptadas se redujeron hasta niveles similares a los observados en las células NCM460 (no mostrados). Nos preguntamos si esta reducción se producía a tiempos más cortos desde el momento de la transferencia. Para comprobarlo, medimos SOCE a las 3 horas de la mitocepción de las células HT29. Las células HT29 se mitoceptaron mediante centrifugación con 50 μ g de mitocondrias aisladas de células NCM460 (en 10-20 μ l de PBS) y se sembraron en cubreobjetos. Las células HT29 control siguieron el mismo proceso de centrifugación con 10-20 μ l de PBS sin mitocondrias. Se midió SOCE entre 3 y 5 horas después de la transferencia tanto en las células HT29 control como normo-mitoceptadas. Se observó una reducción significativa de SOCE, medida como diferencia en el ratio de fluorescencia, en las células HT29 normo-mitoceptadas en comparación con las células HT29 control (figura 48). Es decir, el efecto sobre SOCE de la mitocepción de células HT29 con mitocondrias aisladas de células NCM460 es significativo en las primeras horas tras la transferencia mitocondrial, aunque menor que el observado a las 24 horas.

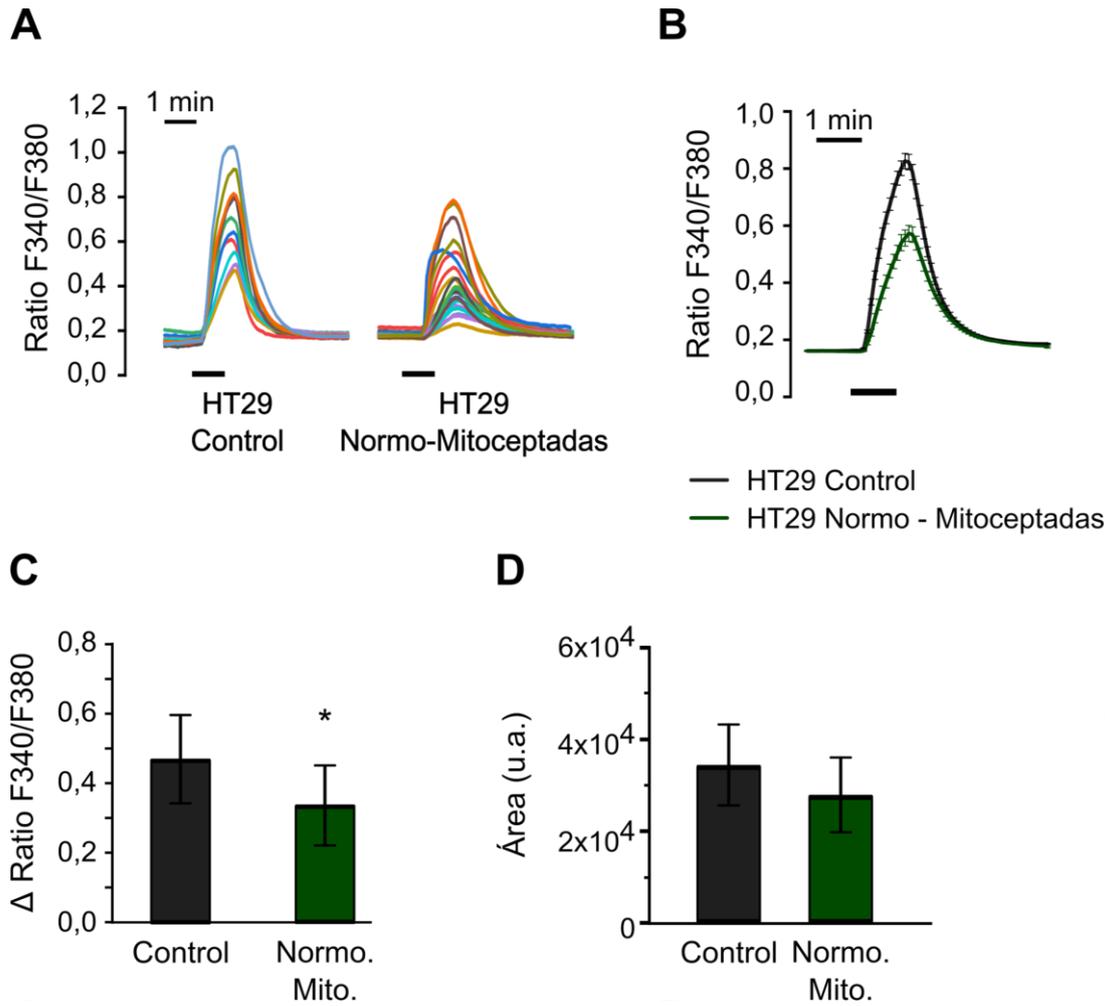


Figura 48. La SOCE se reduce en las células HT29 normo-mitoceptadas 3-5 horas después de la mitocepción. A. Trazos representativos del ratio de la fluorescencia en células individuales HT29 control (izquierda) o normo-mitoceptadas (derecha). La barra negra indica el tiempo de registro en presencia de Ca^{2+} extracelular. B. Trazos de la media \pm EEM de un experimento representativo de 12-25 células. La barra negra indica la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular. C. D. Altura del pico (C) y área bajo la curva (D) de registros de Ca^{2+} citosólico en células tumorales control y mitoceptadas. Se muestra la media \pm IC 95% de los valores de la altura y el área de 133-169 células individuales de 4 experimentos independientes. En gris, células HT29 control; en verde, células HT29 normo-mitoceptadas * $p < 0,05$.

- 1.3. El efecto sobre SOCE de la mitocepción de mitocondrias normales en células tumorales es transitorio: permanece tras 48 horas, pero se pierde 7 días después de la mitocepción.

Las mitocondrias son orgánulos muy dinámicos que están en continua reorganización subcelular mediante eventos de fusión y fisión. Esta plasticidad es importante para la funcionalidad de dichos orgánulos (Archer, 2013; Braschi and McBride, 2010). Estos procesos y, en general, la biogénesis mitocondrial son muy importantes para la vida celular y pueden promover o suprimir el fenotipo tumoral, dependiendo del tipo celular, del estadio de progresión tumoral o de factores de estrés presentes en el microentorno (Boland *et al.*, 2013; Patrushev *et al.*, 2015). Si en condiciones fisiológicas las mitocondrias sufren procesos de fusión y biogénesis, puede que llegue un punto que las células mitoceptadas ya no contengan mitocondrias de células normales o bien que estas mitocondrias se hayan fusionado con las mitocondrias tumorales propias de las células. Por lo tanto, el efecto sobre SOCE que se observa en las células tumorales al añadir mitocondrias de células normales podría desaparecer.

Para comprobar esta hipótesis mantuvimos las células HT29 normo-mitoceptadas en cultivo más horas y medimos la entrada de Ca^{2+} siguiendo los mismos protocolos utilizados anteriormente. 48 horas después de la transferencia mitocondrial, SOCE disminuyó de manera significativa en las células HT29 normo-mitoceptadas con respecto a las células HT29 control (figura 49). Sin embargo, tras una semana en cultivo, no se observaron diferencias significativas y los registros de Ca^{2+} citosólico en células HT29 control y células HT29 normo-mitoceptadas presentaban unos niveles similares (figura 50).

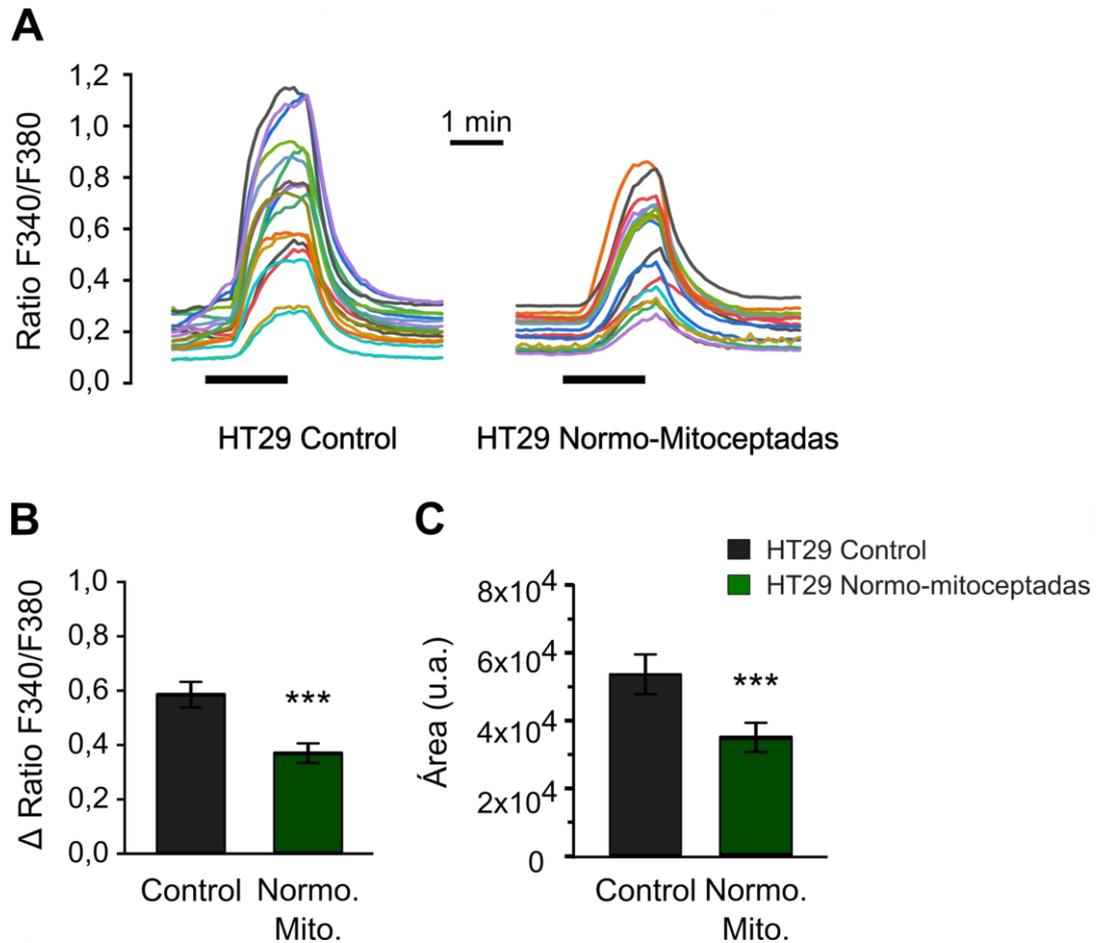


Figura 49. SOCE se reduce en las células tumorales mitoceptadas hasta 48 horas después.

Medimos SOCE en células HT29 normo-mitoceptadas 48 horas después de la mitocepción. Al igual que en los experimentos previos, las células se cargaron con Fura-2/AM y se activó SOCE utilizando tapsigargina en medio libre de Ca^{2+} previo al registro. A. Trazos representativos de 15-17 células individuales de un experimento realizado 48 horas después de la mitocepción. Las barras negras se corresponden con el intervalo de tiempo en presencia de Ca^{2+} extracelular. B. Media \pm IC 95% de la diferencia en el ratio y el área bajo la curva de registros de Ca^{2+} de 75-99 células de 3 experimentos independientes. En gris, células HT29 control; en verde, células HT29 normo-mitoceptadas. *** $p < 0,001$.

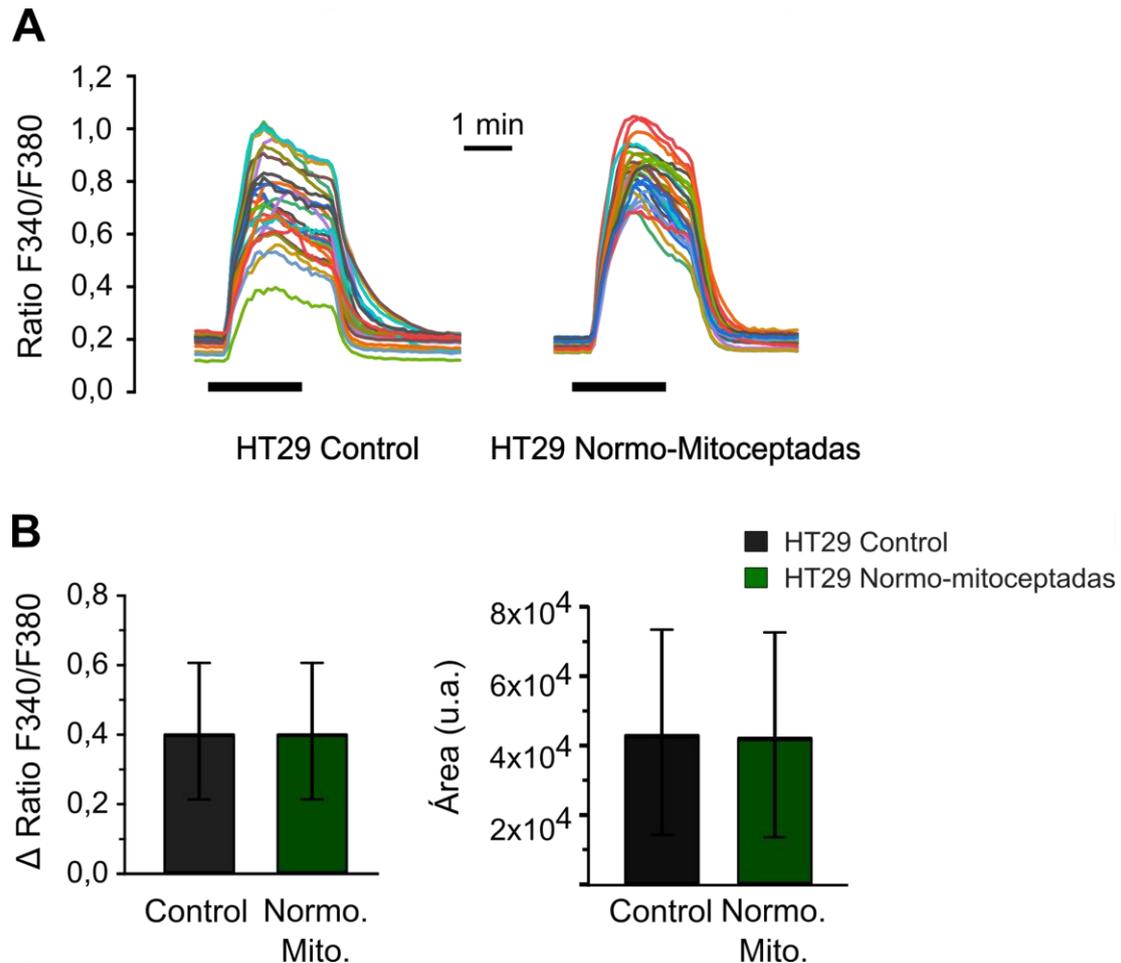


Figura 50. No existen diferencias en SOCE 7 días después de la mitocepción de células HT29. Medimos SOCE en células HT29 normo-mitoceptadas 7 días después de la transferencia mitocondrial. A. Trazos representativos de 25-32 células individuales de un experimento de SOCE 7 días después de la transferencia mitocondrial. Las barras negras se corresponden con el intervalo de tiempo en presencia de Ca^{2+} extracelular. B. Media \pm IC 95% de la altura y área de la curva de registros de Ca^{2+} de 141-156 células individuales de 3 experimentos independientes. En gris, células HT29 control; en verde, células HT29 normo-mitoceptadas.

Los resultados de los experimentos de SOCE en las células HT29 normo-mitoceptadas sugieren que el efecto de las mitocondrias normales sobre SOCE en las células tumorales HT29 es dependiente del tiempo (figura 51). Se observa una disminución inmediata de SOCE que se exagera con el tiempo. A las 24 horas la reducción es de aproximadamente un 20% y alcanza su máximo a las 48 horas, donde los valores de SOCE se asemejan a los obtenidos en las células normales NCM460, en torno a un 40% menor que las células HT29 control. Sin embargo, este efecto se pierde y, al cabo de una semana en cultivo, ya no se observan diferencias en la entrada de Ca^{2+} vía SOCE entre las células HT29 control y las normo-mitoceptadas.

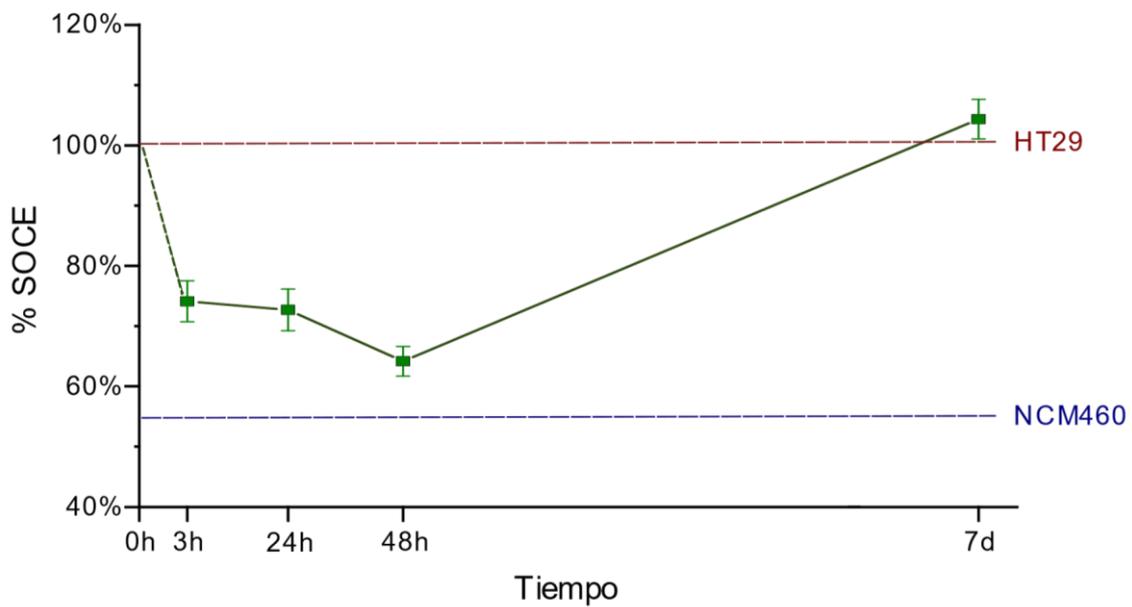


Figura 51. Variación de SOCE en células HT29 normo-mitoceptadas a lo largo del tiempo.

Se indica el % de la entrada de calcio operada por depósitos en las células HT29 mitoceptadas normalizada según la entrada registrada en las células HT29 control a lo largo del tiempo. Los puntos se corresponden con la media \pm EEM del total de células analizadas en cada punto temporal. Se observa una disminución de la entrada de calcio en las primeras 48 horas. A los 7 días, esta entrada se recupera y vuelve a valores cercanos a los registros en células HT29 control. La línea punteada roja indica niveles de SOCE en células HT29 control, mientras que la línea punteada azul indica valores de SOCE en células normales NCM460.

1.4. La mitocepción con mitocondrias aisladas de células tumorales tiene efecto sobre SOCE en células tumorales HT29, pero no en células normales NCM460.

En las células HT29 observamos una disminución en la entrada de Ca^{2+} tras el vaciado de depósitos cuando estas células eran mitoceptadas con mitocondrias aisladas de células NCM460. Este efecto se puede deber a la diferencia en la captación de Ca^{2+} por parte de las mitocondrias, normales o tumorales, o a otros factores, con independencia de la naturaleza mitocondrial, como podrían ser la formación de microdominios celulares ricos en mitocondrias o a un aumento de la producción de ROS que pueden controlar eventos de SOCE de manera local o modulando la inactivación de los canales.

Para comprobar si el efecto observado en la SOCE era debido a las diferencias en las mitocondrias y la captación de Ca^{2+} y no al mayor número de mitocondrias en las

células, llevamos a cabo una estrategia similar: mitoceptar las células tumorales HT29 con mitocondrias aisladas de las propias células tumorales HT29 bajo las mismas condiciones dando lugar a las células que en adelante denominaremos células HT29 tumo-mitoceptadas.

Lo primero que observamos tras el aislamiento de mitocondrias de las células tumorales HT29 fue que, en las mismas condiciones y partiendo del mismo número de células, obteníamos una fracción mitocondrial tres veces mayor en las células tumorales comparado con los microgramos de proteína mitocondrial que obtuvimos en los extractos de células normales (figura 52).

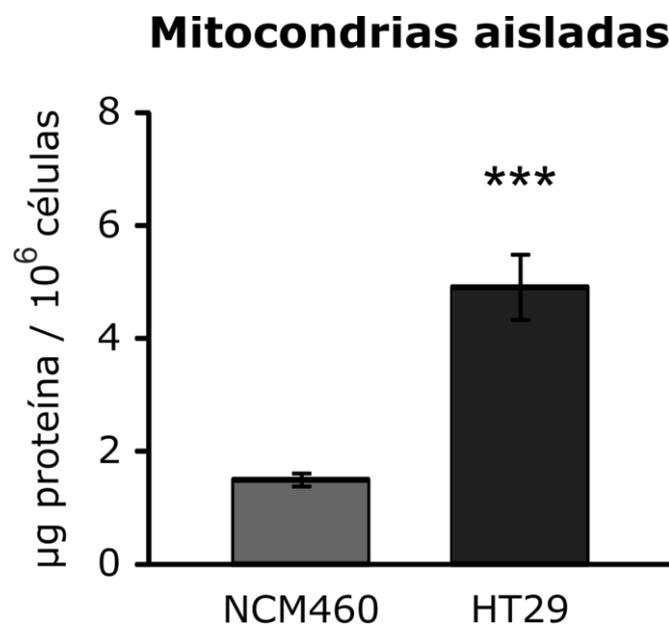


Figura 52. La cantidad de mitocondrias aisladas es mayor en las células tumorales HT29 que en las células normales NCM460. Siguiendo el mismo protocolo y en las mismas condiciones, se cuantificó la cantidad de proteína obtenida tras el proceso de aislamiento mitocondrial en células normales NCM460 y en células tumorales HT29. Las barras representan la media \pm EEM de la cuantificación de proteína equivalente al número de mitocondrias aisladas en, al menos, 5 experimentos independientes realizados en las mismas condiciones.

Transferimos las mitocondrias tumorales a las células HT29 utilizando las mismas condiciones de mitocepción con las que obtuvimos las células HT29 normo-mitoceptadas. Es decir, añadimos 50 μ g de mitocondrias aisladas de células tumorales. y obtuvimos las células HT29 tumo-mitoceptadas. De la misma manera, 24 horas después, medimos SOCE en las células HT29 control y tumo-mitoceptadas cargadas con Fura-2/AM y previamente tratadas con tapsigargina para activar la entrada de Ca^{2+} vía SOCE. En las células HT29 tumo-mitoceptadas se observó un aumento significativo

del área bajo la curva de la SOCE, pero no del ratio de la fluorescencia en comparación con las células HT29 utilizadas como control (figura 53). Es decir, no sólo no vemos una disminución de la SOCE, sino que, la transferencia de mitocondrias tumorales parecía aumentar la entrada de Ca^{2+} vía SOCE en las células HT29.

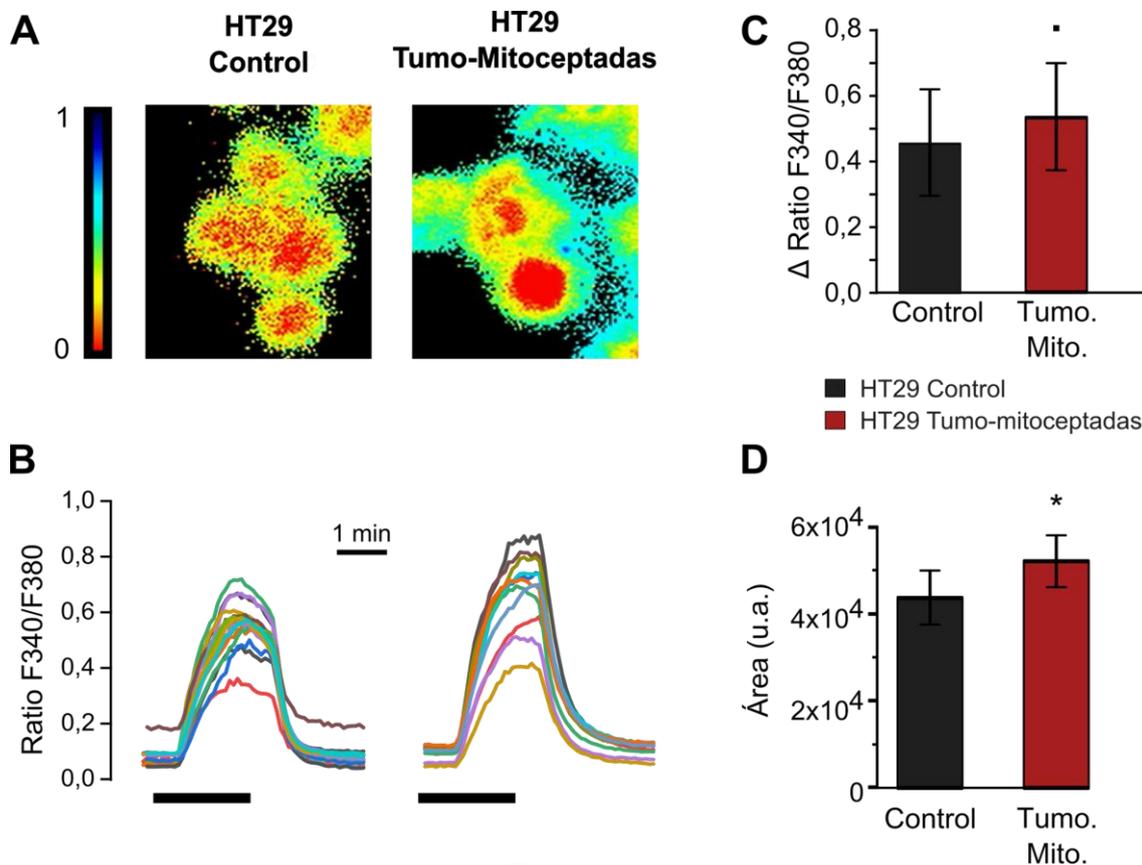


Figura 53. SOCE aumenta en las células HT29 tumo-mitoceptadas. Medimos SOCE en células HT29 control y HT29 tumo-mitoceptadas con 50 μg de mitocondrias aisladas de células HT29. A. Imágenes representativas en pseudocolor de experimentos de Ca^{2+} citosólico en células HT29 control (izqda) y HT29 tumo-mitoceptadas (dcha). B. Trazos donde se registra el ratio de fluorescencia de células individuales de un experimento de Ca^{2+} representativo. La barra negra bajo los trazos se corresponde con el intervalo de tiempo en presencia de Ca^{2+} extracelular. C. D. Análisis de la altura (C) y el área (D) de la curva de registros de Ca^{2+} de 102-112 células individuales de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; · $p < 0,1$.

Por tanto, los resultados indican que el efecto de la mitocepción sobre la SOCE en las células HT29 no se debe al aumento de la cantidad de mitocondrias sino que podría deberse a las diferencias en las propias mitocondrias. Si las mitocondrias proceden de células normales la mitocepción disminuye la SOCE. Sin embargo, si las mitocondrias proceden de células tumorales, la mitocepción aumenta aún más la SOCE en las células tumorales.

El aumento de la SOCE en las células HT29 tumo-mitoceptadas podría deberse a una mayor captación de Ca^{2+} citosólico en estas células con exceso de mitocondrias tumorales con alto potencial mitocondrial. Esto provocaría que los canales SOCs se inactivasen más tarde y, por lo tanto, la entrada de Ca^{2+} fuese mayor y mantenida. Es decir, el fenotipo tumoral podría exacerbarse en las células HT29 tumo-mitoceptadas. Quisimos comprobar si las mitocondrias tumorales también tenían efecto sobre la SOCE en las células NCM460. Es decir, si adoptaban un perfil más tumoral. Para ello, mitoceptamos las células NCM460 con $50 \mu\text{g}$ de mitocondrias aisladas de células HT29 en las mismas condiciones que las anteriores y obtuvimos las células NCM460 tumo-mitoceptadas. 24 horas después, medimos SOCE en estas células cargadas previamente con Fura-2/AM. y tratadas con tapsigargina. No se observaron diferencias significativas en la SOCE de las células NCM460 tumo-mitoceptadas en comparación con las células NCM460 control (figura 54).

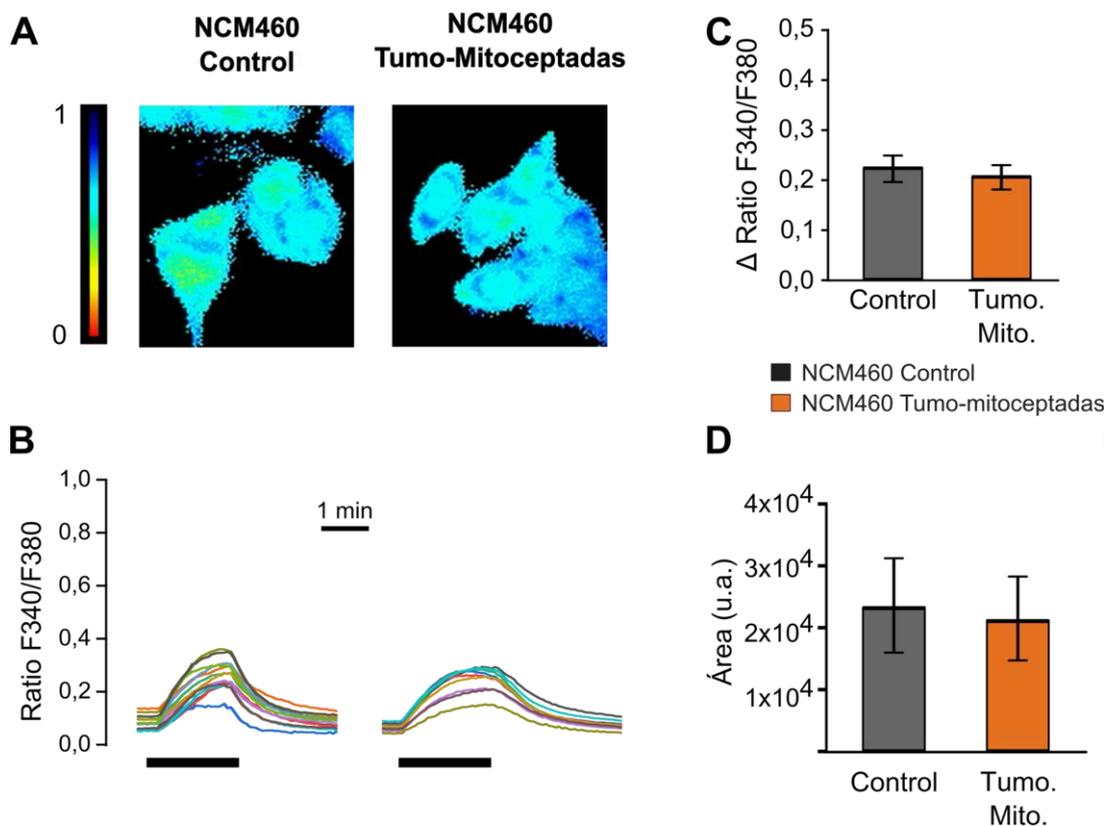


Figura 54. La mitocepción de células normales NCM460 con mitocondrias aisladas de células HT29 no tiene efecto en SOCE. Medimos SOCE en células NCM460 control y NCM460 tumo-mitoceptadas con $50 \mu\text{g}$ de mitocondrias aisladas de células HT29. A. Imágenes representativas en pseudocolor de experimentos de Ca^{2+} citosólico en células NCM460 control (izquierda) y NCM460 tumo-mitoceptadas (derecha). B. Trazos donde se registra el ratio de fluorescencia de células individuales de un experimento representativo. C. D. Análisis de la altura (C) y el área (D) de la curva de registros de Ca^{2+} de 78-63 células individuales de tres experimentos independientes.

Poniendo en conjunto los resultados de SOCE obtenidos a las 24 horas de la mitocepción (figura 55), podemos decir que la mitocondria juega un papel importante en la regulación de la entrada de Ca^{2+} vía SOCE en las células tumorales de colon HT29.

Además, la mitocepción sobre las células HT29 tiene un efecto sobre SOCE diferente dependiendo de la procedencia de las mitocondrias: si las mitocondrias aisladas proceden de células tumorales, SOCE se ve aumentada en las células HT29 tumo-mitoceptadas. Por el contrario, si las células HT29 se mitoceptan con mitocondrias aisladas de células normales (HT29 normo-mitoceptadas), la entrada de Ca^{2+} por esta vía se reduce de manera significativa a las pocas horas de realizar la mitocepción. Sin embargo, el efecto no se mantiene indefinidamente en el tiempo debido a la vida de las mitocondrias, a los procesos de fusión mitocondrial o de división celular que están teniendo lugar. En cuanto a las células normales NCM460, la transferencia de mitocondrias aisladas de células tumorales no tiene efecto sobre SOCE en las células NCM460 tumo-mitoceptadas. No obstante, no sabemos qué ocurriría con la SOCE en las células NCM460 si se mitoceptasen con mitocondrias aisladas de células normales.

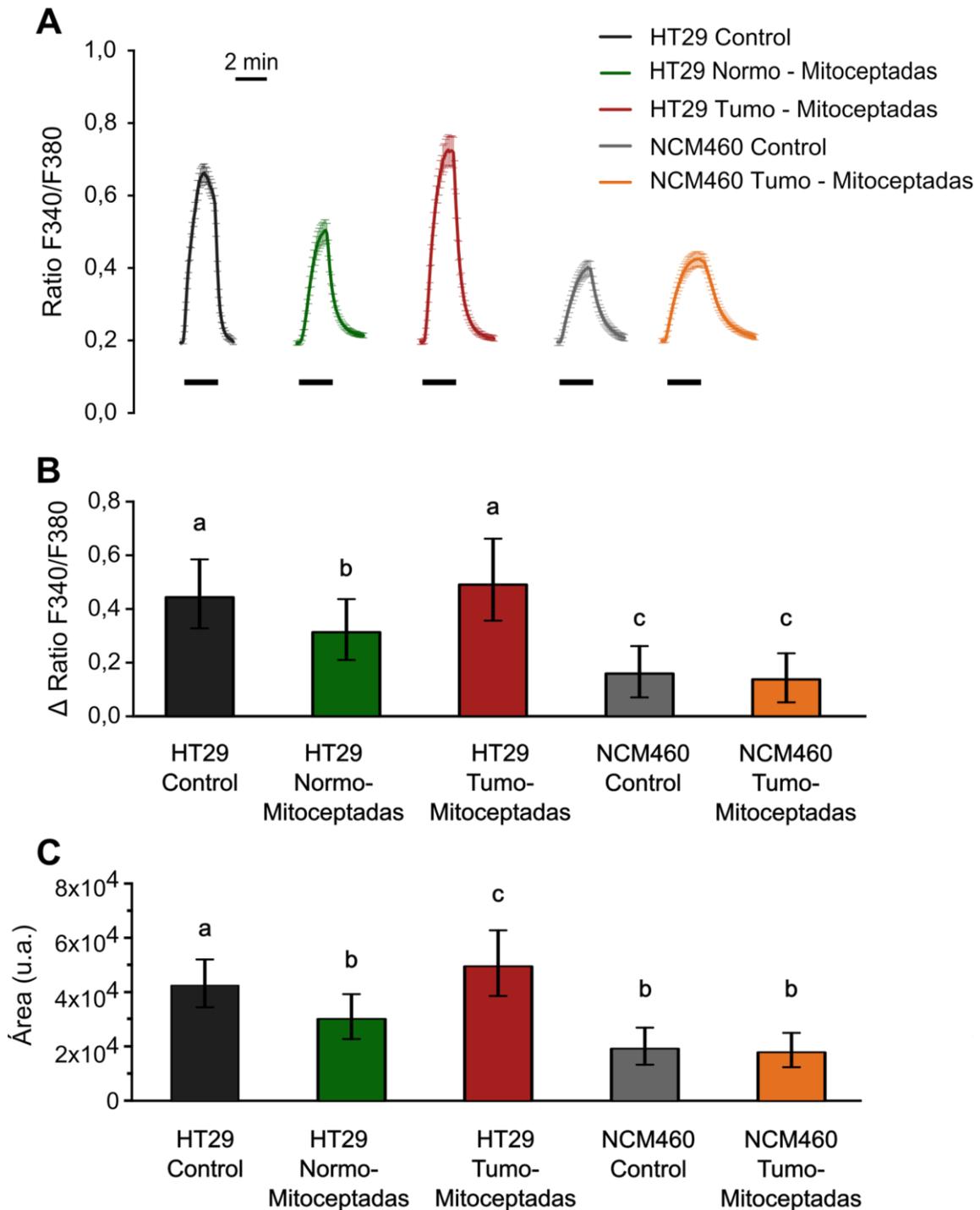


Figura 55. Resumen de SOCE a las 24 horas de la mitocepción en células HT29 y NCM460.

A. Trazos de la media \pm EEM de un experimento de Ca^{2+} representativo de cada una de las condiciones (de izquierda a derecha): HT29 control, HT29 normo-mitoceptadas, HT29 tumo-mitoceptadas, NCM460 control y NCM460 tumo-mitoceptadas. La barra negra en A y B indica la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular. B. C. Análisis de la altura (B) y del área bajo la curva (C) de experimentos de Ca^{2+} de todas las células registradas en, al menos, 3 experimentos independientes de cada una de las condiciones. Las barras representan la media \pm IC 95% en cada uno de los casos. Se indican con la misma letra aquellas condiciones en las que no se registran diferencias significativas entre las diferentes condiciones ($p \geq 0,05$).

1.5. El potencial mitocondrial es diferente en las células tumorales mitoceptadas.

Para investigar por qué en las células HT29 la transferencia de mitocondrias, tanto de células normales como tumorales, modula la SOCE, medimos el potencial de membrana de la mitocondria. Alteraciones en el potencial mitocondrial podrían relacionarse con los cambios observados en SOCE.

Para medir el potencial mitocondrial utilizamos la sonda mitocondrial TMRM que se acumula en la matriz de estos orgánulos en función de su potencial. A mayor acumulación de la sonda, mayor fluorescencia registrada y más negativo será el potencial mitocondrial en esas células. Los resultados de la medida de fluorescencia del TMRM se representan en la figura 56. Las células HT29 mostraron una fluorescencia debida al TMRM significativamente mayor que las células NCM460. Este resultado concuerda con resultados previos del grupo que indicaban un potencial mitocondrial más negativo en las células HT29. En cuanto a las células HT29 mitoceptadas, la fluorescencia de TMRM fue significativamente mayor en las células HT29 con transferencia de mitocondrias tumorales, con respecto a las células HT29 control, mientras que la fluorescencia fue menor en las células HT29 normo-mitoceptadas. En las células NCM460 no se observaron diferencias significativas en el potencial mitocondrial entre las células control y las NCM460 tumo-mitoceptadas.

Estos resultados son consistentes con los observados en SOCE a las 24 horas de la transferencia mitocondrial (figura 55). Las células donde se registraron unos niveles de SOCE menores, presentan una menor fluorescencia de TMRM, es decir, un potencial mitocondrial más positivo. Esto podría indicar que los cambios observados en la SOCE de las células mitoceptadas estarían relacionados con las diferencias en el potencial de membrana de las mitocondrias.

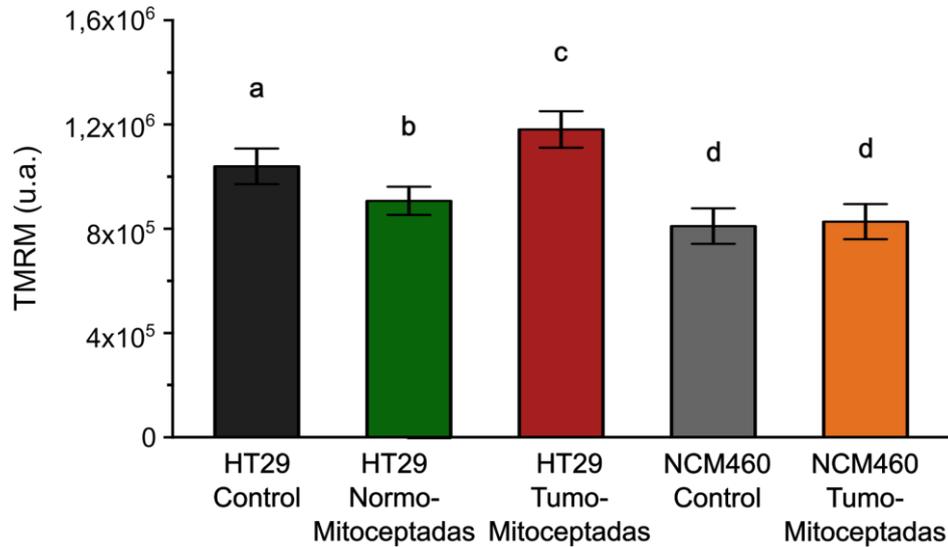


Figura 56. El potencial mitocondrial es diferente en las células HT29 mitoceptadas. Medimos el potencial mitocondrial en las células HT29 y en las células NCM460 utilizando la sonda TMRM. Se midió tanto en condiciones control como en células mitoceptadas o bien con mitocondrias aisladas de células normales (normo-mitoceptadas) o con mitocondrias aisladas de células tumorales (tumo-mitoceptadas). Se representa la media \pm IC 95% de la medida de fluorescencia de la sonda de al menos 3 imágenes de 3 experimentos independientes de las cinco condiciones (de izquierda a derecha): HT29 control, HT29 normo-mitoceptadas, HT29 tumo-mitoceptadas, NCM460 control y NCM460 tumo-mitoceptadas. Se indican con la misma letra aquellas condiciones donde no existen diferencias significativas ($p \geq 0,05$).

Estos resultados indican que es posible la transferencia mitocondrial *in vitro* de mitocondrias aisladas en células tumorales de colon. Esta transferencia mitocondrial tiene diferentes efectos sobre SOCE y sobre el potencial mitocondrial dependiendo de las células de las cuales se han aislado. Los resultados sugieren un papel importante de la mitocondria tumoral y normal en la entrada de Ca^{2+} vía SOCE y abren nuevas vías de estudio en el tratamiento del CCR.

2. Estudio del remodelado del Ca^{2+} intracelular en células HT29 mediado por el canal TRPC1.

En las células de cáncer colorrectal se observa una mayor entrada de Ca^{2+} como parte del remodelado de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. Este aumento se asocia, entre otros aspectos, a la pérdida de la inactivación de las corrientes de SOCE. Es decir, esta corriente no se inactiva, dando lugar a una entrada de Ca^{2+} mayor y mantenida en el tiempo. Este remodelado es complejo y podría tener diferentes responsables como cambios en el potencial mitocondrial y en la recaptación de Ca^{2+} , u otros elementos como el canal TRPC1. Resultados previos del grupo han descrito una corriente de entrada de Ca^{2+} I_{CRAC} mediada por Orai1 en las células normales NCM460. Sin embargo, en las células tumorales HT29 se registra una corriente compuesta por una corriente I_{CRAC} aumentada además de una corriente de entrada de Ca^{2+} no selectiva I_{SOC} mediada por el canal TRPC1, el cual aparece sobreexpresado en las células HT29 (Sobradillo *et al.*, 2014). Para investigar más a fondo el papel de TRPC1 en la SOCE de las células tumorales HT29, estudiamos su inhibición en esta línea celular mediante diferentes estrategias.

2.1. Eliminación del canal TRPC1 mediante edición génica en células HT29.

Eliminamos el canal TRPC1 de las células HT29 utilizando la herramienta de edición génica CRISPR/Cas9, como se indica en el apartado de metodología. Se diseñaron dos guías que reconocen una secuencia de 20 nucleótidos en el exón 10 y en el 13, respectivamente, para eliminar un fragmento donde se encuentra el poro del canal. Se utilizó un vector de recombinación que contiene un casete de resistencia a blasticidina como método de selección de las células editadas (figura 57A).

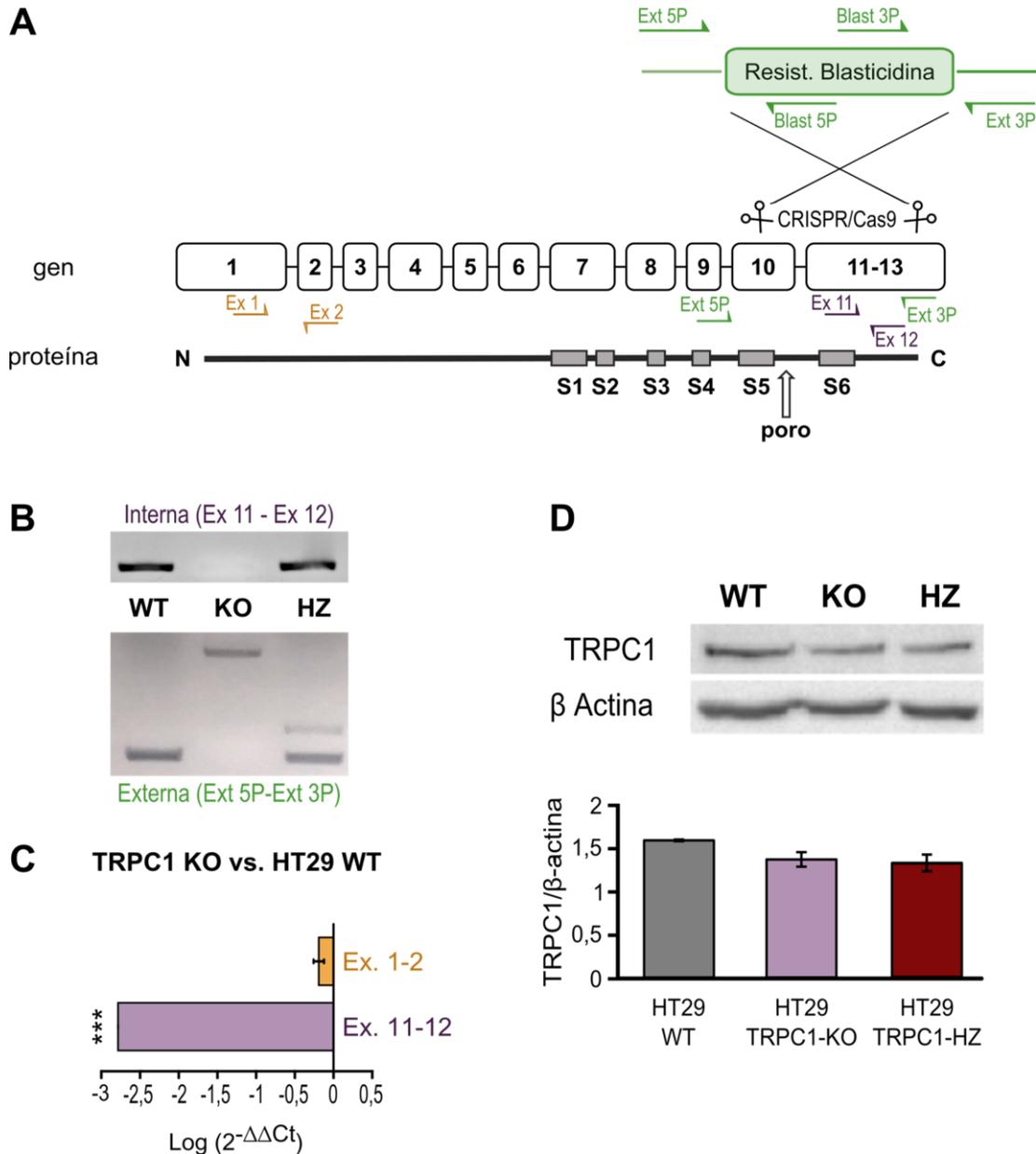


Figura 57. Estrategia de edición génica de TRPC1 mediante CRISPR/Cas9 en células HT29. Se trató de eliminar el canal TRPC1 de las células HT29 utilizando la herramienta de edición CRISPR/Cas9. A. Resumen de la estrategia llevada a cabo en las células HT29. Se diseñaron dos guías que reconocen una secuencia en el exón 10 y otra en el exón 13. Estas guías son reconocidas por la nucleasa Cas9 y se produce un corte. Este corte es reparado gracias a un vector de recombinación que contiene la secuencia para producir un casete de resistencia a blasticidina. Se indican los *primers* utilizados para llevar a cabo las diferentes comprobaciones por PCR o qPCR: en color naranja los *primers* para mirar la expresión del canal en una zona no editada; en morado los *primers* para mirar la expresión en la zona eliminada, y en verde los *primers* para comprobar que la estrategia de edición ha sido correcta. B. Resultados de PCR convencional en células HT29 WT, TRPC1-HZ y TRPC1-KO analizando el fragmento interno eliminado (imagen superior) y el fragmento editado entero utilizando *primers* externos al lugar de edición (imagen inferior). C. Resultados de qPCR donde se analizan los niveles de expresión de TRPC1 (En naranja, Ex. 1-2) y la expresión en el fragmento eliminado (En morado, Ex. 11-12). Se representa la media ± EEM de tres muestras independientes. D. Resultados de western blot donde se miran los niveles de proteína de TRPC1 en células WT, KO y HZ. Se utiliza β-actina como control endógeno para normalizar los resultados. *** p<0,001.

La eliminación de TRPC1 se comprobó por PCR (figura 57B), obteniendo células donde no había tenido lugar la edición (WT), células donde se había eliminado TRPC1 en uno de los alelos (HZ) y células donde la edición había tenido éxito (KO). Tanto las células WT como las células HZ presentaban una banda de PCR dentro del fragmento eliminado que no aparecía en las células KO. Al examinar toda la zona editada con los *primers* externos, observamos que en las células WT solo aparecía la banda correspondiente al fragmento de genoma sin editar, mientras que las células HZ presentaban dos bandas: una correspondiente al alelo WT sin editar y otra de mayor tamaño correspondiente al alelo KO editado. En cuanto a las células KO, presentaban una única banda, pero de un tamaño mayor al esperado únicamente por el casete de resistencia, por una posible inserción de otras partes del vector de recombinación. En las células HT29 TRPC1-KO comprobamos los niveles de expresión de ARNm mediante qPCR. Analizamos tanto el fragmento eliminado (exones 11-12) como un fragmento externo a la edición (exones 1-2) y confirmamos la ausencia del fragmento editado, aunque continuaba habiendo expresión de otras partes del canal TRPC1 (figura 57C). Comprobamos la expresión de TRPC1 a nivel de proteína mediante western blot y observamos que, en los tres casos, la banda correspondiente a dicho canal no presentaba diferencias significativas en cuanto a tamaño e intensidad (figura 57D). En las células HT29 TRPC1-KO se eliminó únicamente el poro de TRPC1 y se mantuvo la expresión del resto del canal.

Medimos la SOCE en las células editadas, pero no observamos diferencias significativas entre las células HT29 WT y las células HT29 TRPC1-KO (figura 58).

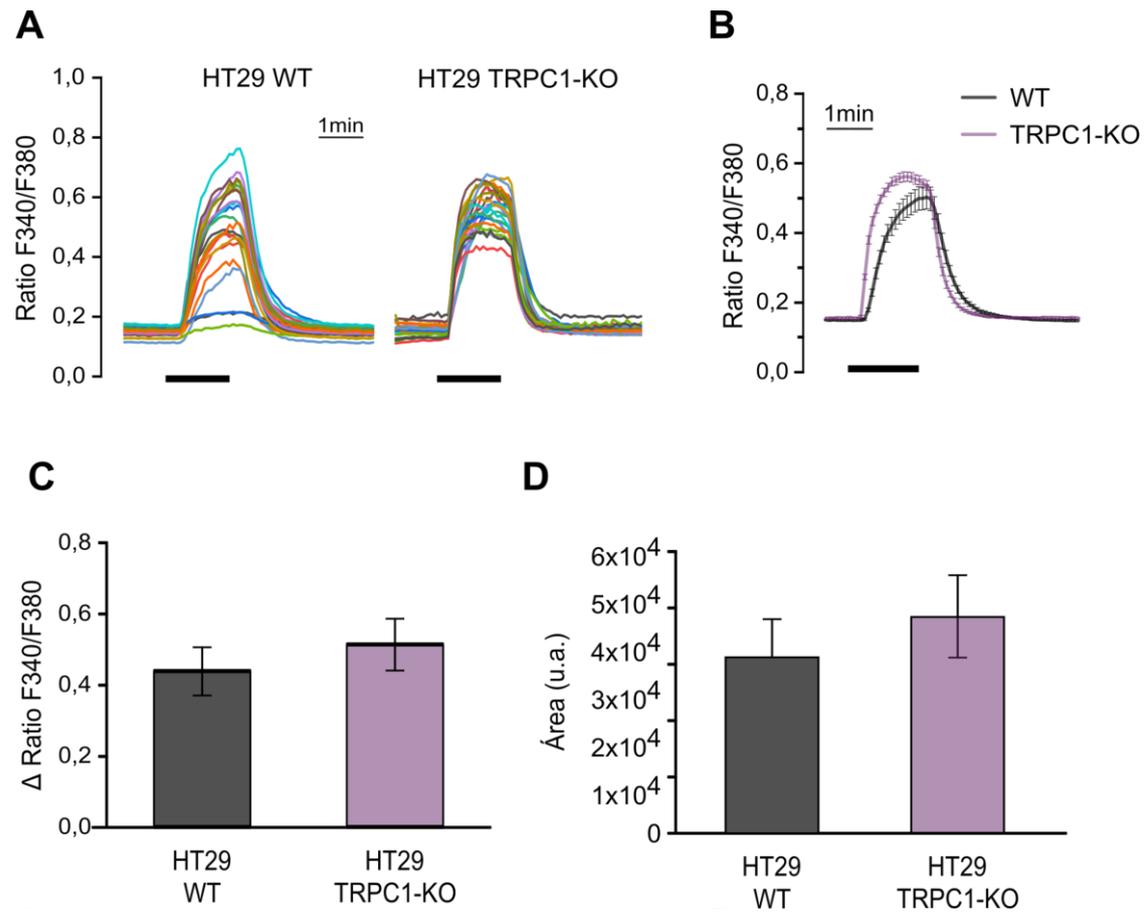


Figura 58. La edición génica de TRPC1 en las células HT29 no tiene efecto SOCE. Medimos el calcio citosólico en células WT y TRPC1-KO cargadas con Fura-2/AM donde activamos SOCE con taspigargina en medio libre de calcio. A. Registros representativos del ratio de fluorescencia recogido en células individuales HT29 WT y HT29 editadas para eliminar el poro del canal TRPC1. B. Trazo de la media \pm EEM de un experimento representativo con 22-25 células HT29 WT y TRPC1-KO. C. Análisis de la altura de la curva de calcio. D. Área bajo la curva de registros de calcio en células HT29 WT o editadas. En A y B, la barra negra se corresponde con el intervalo de tiempo en presencia de calcio en el medio extracelular. En C y D se representa la media \pm IC 95% de 114-125 células de tres experimentos independientes.

Exploramos otros posibles efectos de la eliminación de TRPC1 y medimos la síntesis de nuevas moléculas de ADN en un ensayo de proliferación. No se observaron diferencias significativas entre las células HT29 WT y las células HT29 TRPC1-KO (figura 59).

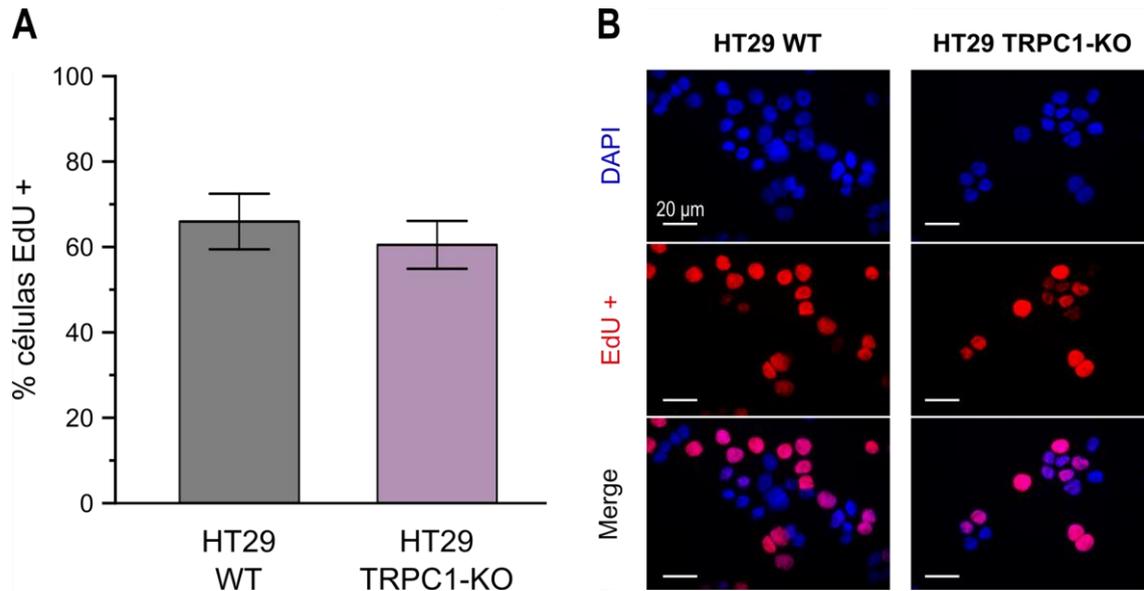


Figura 59. La proliferación celular es similar en las células HT29 WT y las células HT29 editadas. Se utilizó un ensayo Clik-iT EdU Alexa Fluor 594 para medir la proliferación celular, basado en la incorporación de un análogo modificado de la timidina en el ADN. A. Cuantificación en % de células positivas donde se ha incorporado EdU. Se representa la media \pm EEM de 16-19 campos aleatorios diferentes de tres experimentos independientes. B. Imágenes representativas tomadas a 60X de un experimento de proliferación. El panel izquierdo se corresponde con células HT29 WT y el panel derecho con células HT29 TRPC1-KO. En la parte superior se muestran imágenes de los núcleos celulares teñidos con DAPI; en la parte media, las imágenes de fluorescencia roja que se corresponde con los núcleos de las células EdU+, y en la parte baja la superposición de ambas imágenes. En rosa se marcan los núcleos de las células recién sintetizadas. La barra blanca de la escala corresponde con 20 μ m.

Según los resultados obtenidos, la eliminación del poro del canal TRPC1 en las células HT29 no tiene efectos sobre SOCE ni sobre la proliferación. Sin embargo, al no haberse demostrado efectivamente la ausencia de proteína TRPC1 por western blot, abordamos una estrategia farmacológica alternativa.

2.2. Inhibición farmacológica del canal TRPC1 en células HT29 y NCM460.

Debido a que los efectos de la eliminación génica de TRPC1 no fueron claros, estudiamos la función del canal utilizando el inhibidor Pico 145. Se ha descrito que esta pequeña molécula es capaz de inhibir los canales TRPC1/4/5 de manera específica, selectiva y a concentraciones muy bajas, en el rango picomolar (Rubaiy *et al.*, 2017).

Medimos SOCE con tapsigargina en las células HT29 y NCM460 tratadas previamente durante 30 minutos con el inhibidor Pico145 a una concentración de 10 nM, el cual mantuvimos en el medio extracelular durante el experimento. No se observaron diferencias significativas en SOCE por el tratamiento con Pico 145 10 nM ni en células HT29 (figura 60A/B), ni en células NCM460 (figura 60C/D).

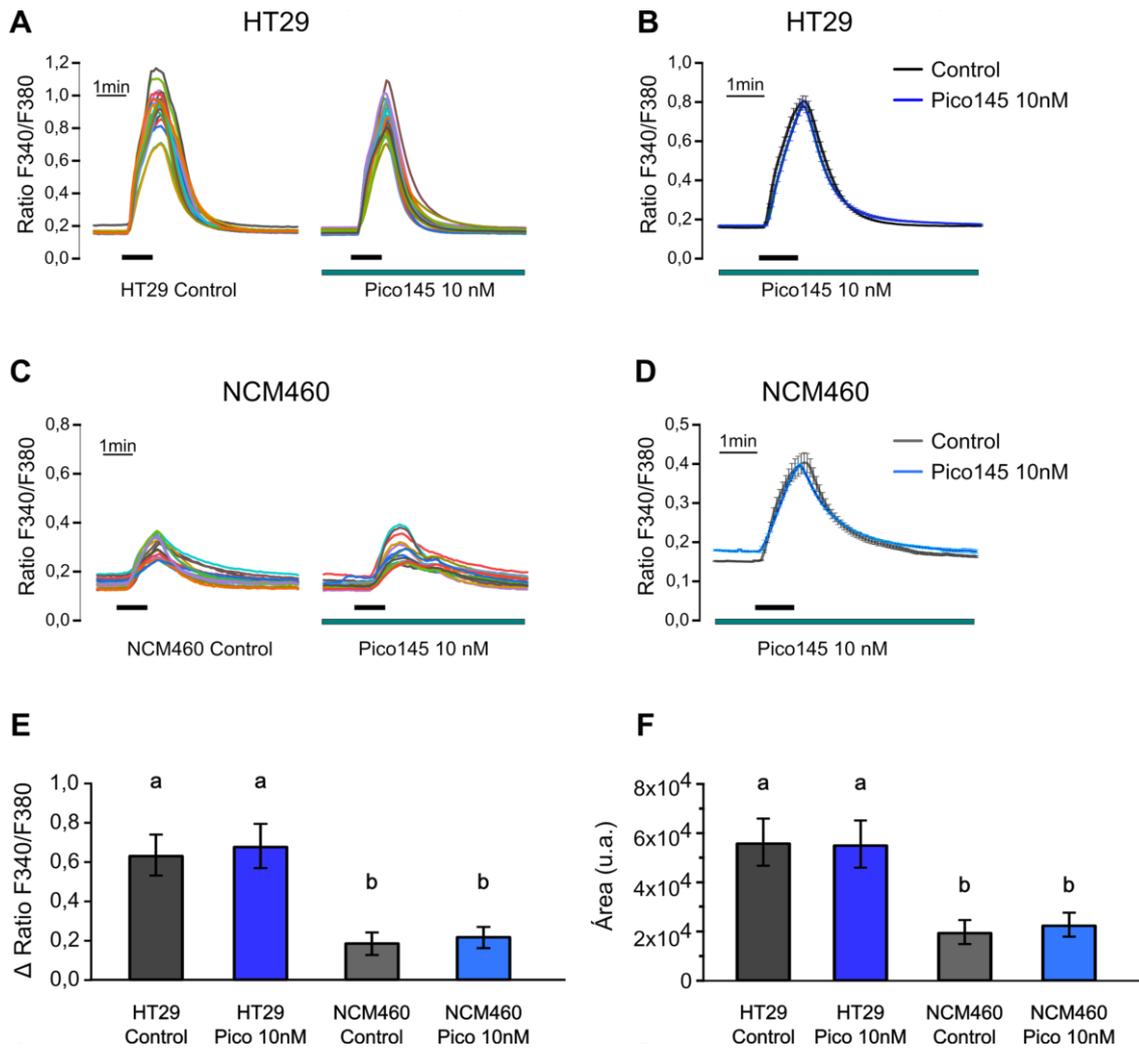


Figura 60. Pico145 no tiene efecto sobre SOCE ni en células HT29 ni en células NCM460 cuando se utiliza a 10 nM. Medimos SOCE en células HT29 y NCM460 tratadas durante 30 minutos con Pico145 10 nM. A. Trazos representativos de células individuales de HT29 de un mismo experimento donde se registra el ratio de la fluorescencia recogida en células HT29 control y células tratadas con Pico145 10 nM. B. Trazo de la media \pm EEM de un experimento representativo de 22-25 células HT29. C. Registros representativos de células individuales de NCM460 de un experimento de SOCE en células NCM460 control y tratadas con Pico 10 nM. D. Trazo de la media \pm EEM de un experimento representativo de 15-20 células NCM460. E. Análisis de la altura de la curva (Δ Ratio) de registros de calcio en células HT29 y NCM460 control o tratadas con Pico145 10 nM de tres experimentos independientes. F. Área bajo la curva de registros de calcio en células HT29 y NCM460 control o tratadas con Pico145. En A, B, C, D la barra negra y la barra azul bajo los trazos se corresponde con el intervalo de tiempo en presencia de calcio o de inhibidor Pico145, respectivamente, en el medio extracelular. En E y F se representa la media \pm IC 95% de al menos 3 experimentos independientes. Se indican con la misma letra aquellas condiciones donde no existen diferencias significativas ($p \geq 0,05$).

Aumentamos diez veces la concentración del inhibidor y medimos SOCE de la misma manera en las células HT29 y NCM460 pretratadas con Pico145 100 nM durante

30 minutos. Como muestra en la figura 61, el uso de Pico145 a 100 nM provocó una disminución en SOCE tanto en las células HT29 como en las células NCM460.

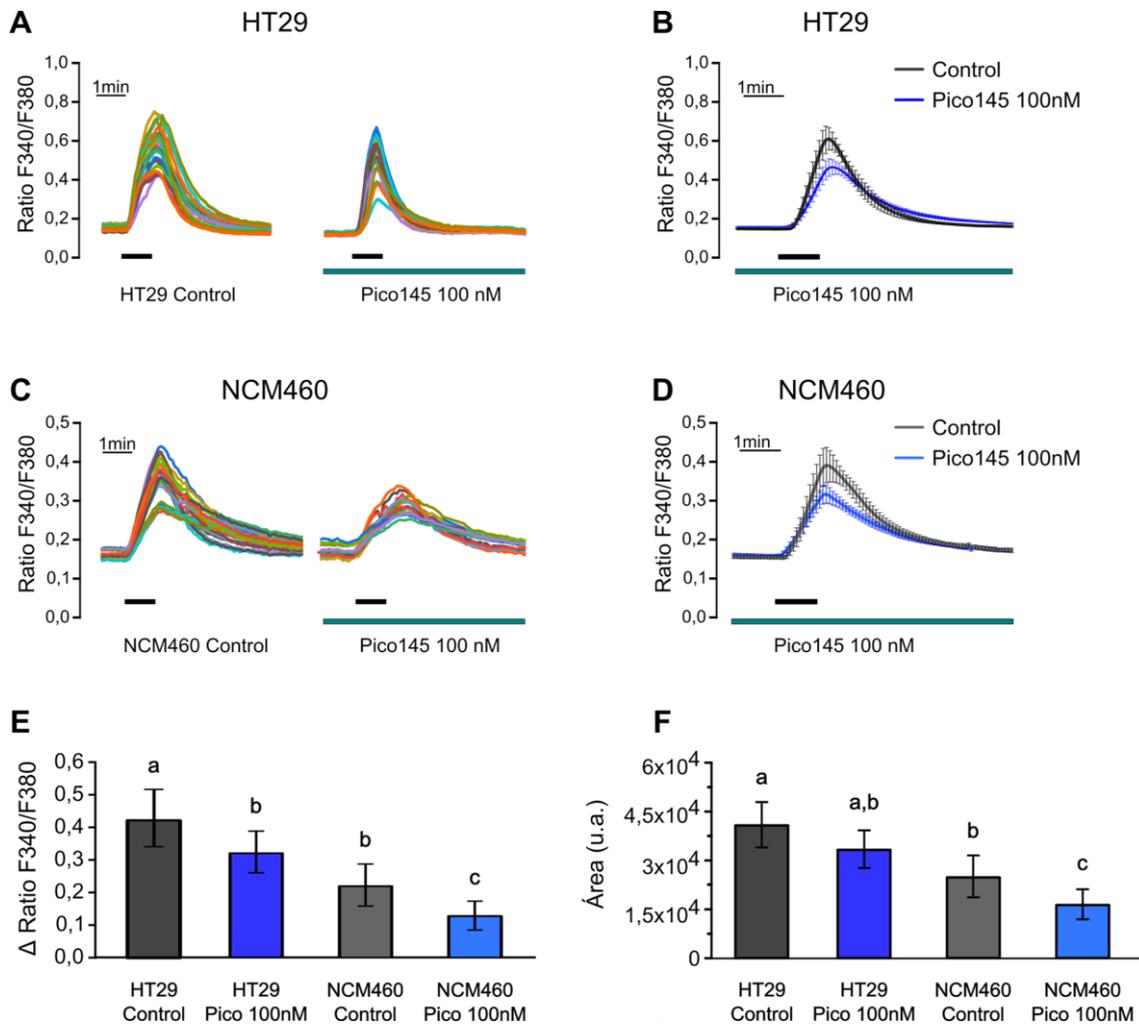


Figura 61. Pico145 100 nM disminuye SOCE tanto en células HT29 como en células NCM460. Medimos SOCE en células HT29 y NCM460 tratadas durante 30 minutos con Pico145 100 nM. A. Registros representativos de células individuales de un experimento de SOCE en células HT29 control y células tratadas con Pico145 100 nM. B. Trazo de la media \pm EEM de un experimento representativo de 22 células HT29. C. Registros representativos de células individuales de un experimento de SOCE en células NCM460 control y tratadas con Pico 100 nM. D. Trazo de la media \pm EEM de un experimento representativo de 17-26 células NCM460. E. Análisis de la altura de la curva de registros de calcio en células HT29 y NCM460 control o tratadas con Pico145 100 nM de tres experimentos independientes. F. Área bajo la curva de registros de calcio en células HT29 y NCM460 control o tratadas con Pico145 100nM. En A, B, C, D la barra negra bajo los trazos se corresponde con el intervalo de tiempo en presencia de calcio en el medio extracelular. La barra azul bajo los trazos se corresponde con el tiempo en presencia del inhibidor Pico145 durante el experimento. En E y F se representa la media \pm IC 95% de al menos 3 experimentos independientes. Se indican con la misma letra aquellas condiciones donde no existen diferencias significativas ($p \geq 0,05$).

Analizando en conjunto las curvas de entrada de Ca^{2+} , observamos una disminución en el ratio de fluorescencia debida al tratamiento con Pico145 100 nM tanto en células tumorales HT29 como en células normales NCM460 (figura 61E). Cuando medimos el área bajo la curva (figura 61F), no observamos diferencias entre las células HT29 control y las tratadas con Pico145, ni entre estas últimas y las células NCM460 control. Sin embargo, en las células NCM460, el tratamiento con Pico145 100 nM disminuyó SOCE. Por tanto, la molécula Pico145 a 100 nM, no serviría de estrategia específica para utilizar en células tumorales.

Para ver el efecto de Pico145 sobre los canales TRPC, estudiamos mediante *patch-clamp* las corrientes TRPC tanto en células normales NCM460 como en células tumorales HT29. Para poder aislar estas corrientes, añadimos nifedipina y ácido niflúmico en la solución externa de manera que bloqueamos canales de Ca^{2+} y de Cl^- y medimos la entrada por canales TRPC.

En las células HT29 los resultados fueron muy variables. Aproximadamente la mitad de las células presentaban una pequeña inhibición de la corriente TRPC de salida con el tratamiento con Pico145 200 nM (figura 62A/B), mientras que en el resto no se veían diferencias significativas o bien se observaba un aumento de la corriente (no mostrado). En cuanto a las células normales NCM460, no se observaron diferencias significativas en las corrientes TRPC cuando se exponían al fármaco Pico145 200 nM (figura 62C/D). Al poner en conjunto todos estos resultados, observamos que las células HT29 tienen corrientes TRPC mayores que las células NCM460 (figura 62E), tanto en su componente de entrada como en el de salida. Sin embargo, relativo a la inhibición de los canales TRPC1/4/5 con Pico145 200 nM, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los tipos celulares (figura 62E), en parte debido a la enorme variabilidad observada en las células HT29.

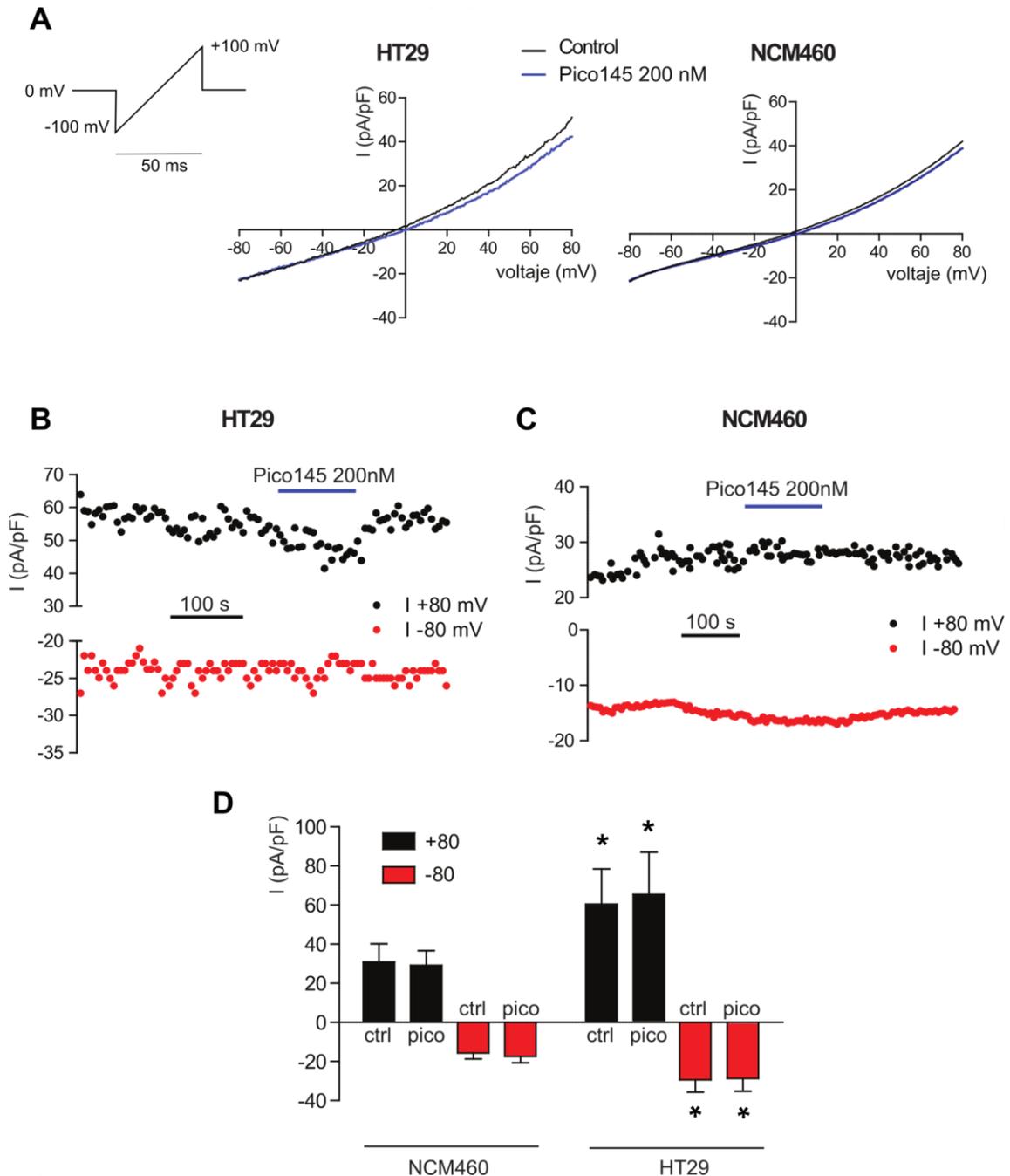


Figura 62. Corrientes TRPC en células HT29 y NCM460. Medimos las corrientes TRPC en células HT29 y NCM460 utilizando *patch-clamp planar* en configuración *whole-cell*. Aplicamos rampas despolarizantes cada 5 segundos de -100 mV a +100 mV en 50 ms en ausencia o presencia de Pico145 200 nM. A. Trazos IV representativos de corrientes TRPC en células HT29 (izquierda) o células NCM460 (derecha) en ausencia (control, en negro) o presencia de Pico145 200 nM (en azul). B. Cambios en la corriente TRPC a + 80 mV y - 80 mV en ausencia o presencia de Pico145 200 nM en células HT29. Se observa una pequeña disminución en la corriente a +80mV en presencia de Pico145. C. Cambios en la corriente TRPC a + 80 mV y - 80 mV al utilizar Pico145 200 nM en células NCM460. D. Medida de la corriente TRPC (media + EEM) de salida (+80 mV) o entrada (-80 mV), en células NCM460 (izquierda) o células HT29 (derecha) en ausencia (ctrl) o presencia de Pico145 200 nM (pico). * $p < 0,05$. En B, C y D la corriente a +80 mV se representa en negro y la corriente a -80 mV se representa en rojo.

Los intentos de inhibición del canal TRPC1 no han tenido resultados concluyentes. Ni la eliminación del canal mediante CRISPR/Cas9 ni la inhibición utilizando Pico145 a bajas concentraciones han tenido efectos claros sobre SOCE en las células HT29 (figuras 58 y 60). Solo cuando aumentamos la concentración de Pico145 hasta los 100 nM observamos una pequeña disminución de SOCE en las células HT29 (figura 61). Sin embargo, esta disminución se observa también en las células NCM460, descartando la inhibición farmacológica como método específico de modulación de la entrada de Ca^{2+} a través de TRPC1. En cuanto a otras características tumorales como la proliferación celular, tampoco observamos diferencias significativas en aquellas células HT29 donde hemos eliminado el poro del canal TRPC1 (figura 59). Por último, en relación con las corrientes TRPC, observamos que las células tumorales presentan una corriente TRPC mayor que las células normales, pero que en ninguno de los tipos celulares la presencia de Pico145 a 200 nM tiene efecto (figura 62). Por todo ello, no podemos establecer un papel claro del canal TRPC1 sobre la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos ni sobre cambios en el fenotipo tumoral.

3. Estudio del remodelado de SOCE en cáncer de colon relacionado con la síntesis de poliaminas.

Nuestro grupo ha descrito recientemente que el remodelado de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular asociada a las células tumorales, incluyendo la mayor SOCE y la sobreexpresión de canales TRPC1, es revertida en ausencia de poliaminas. Puesto que los cambios en la expresión y actividad de TRPC1 no parecen explicar los cambios en SOCE, decidimos estudiar a continuación los efectos de las poliaminas sobre otros sistemas de transporte de Ca^{2+} .

3.1. La inhibición de la síntesis de poliaminas con DFMO revierte la expresión de genes relacionados con el transporte de Ca^{2+} en células HT29.

Se conoce que en muchos casos de cáncer colorrectal, la enzima ODC encargada de la síntesis de poliaminas está sobreexpresada. Además, diferentes promotores tumorales inducen una mayor expresión y actividad de esta enzima, resultando en un exceso de síntesis de poliaminas (Bachmann and Geerts, 2018; Gerner *et al.*, 2018). Resultados previos del laboratorio han descrito que el tratamiento con DFMO, un inhibidor irreversible de la ODC, puede alterar el remodelado del Ca^{2+} intracelular relacionado con el fenotipo tumoral: DFMO aumenta el tamaño de los depósitos y disminuye SOCE en células HT29 (Gutiérrez *et al.*, 2019). Estos resultados sugieren que las poliaminas contribuyen al remodelado de los canales de Ca^{2+} en CCR y que el tratamiento con DFMO podría prevenir CCR mediante la reversión del remodelado de transportadores de Ca^{2+} .

Recientemente se ha llevado a cabo en el laboratorio un análisis transcriptómico del remodelado del Ca^{2+} en CCR y su reversión mediante la inhibición de la síntesis de poliaminas. Con DFMO ciertos genes relacionados con el transporte de Ca^{2+} se encuentran diferencialmente expresados entre las células tumorales HT29 y normales NCM460 y revierten su expresión diferencial en las células tumorales tratadas con DFMO (Pérez-Riesgo *et al.*, 2023). Se conocía que esto ocurre en algunos de los mecanismos moleculares relacionadas con SOCE, pero también con otros canales, bombas y proteínas relacionadas con la homeostasis del Ca^{2+} en CCR. Los genes de

mayor interés para este estudio se resumen en la figura 63 y son TRPC5, TRPV6, TRPP1, TRPP2, PMCA4 y SPCA2. Los genes de TRPC5, TRPV6, TRPP1 y SPCA2 presentaban una mayor expresión en las células tumorales HT29, mientras que en el caso de TRPP2 y PMCA4 la expresión era menor en comparación con las células normales NCM460 (figura 63A). La depleción de la síntesis de poliaminas en las células HT29 con DFMO revirtió la expresión de estos genes en sentido contrario (figura 63B), sugiriendo el posible papel de las poliaminas en el remodelado de la homeostasis del Ca^{2+} y el fenotipo tumoral.

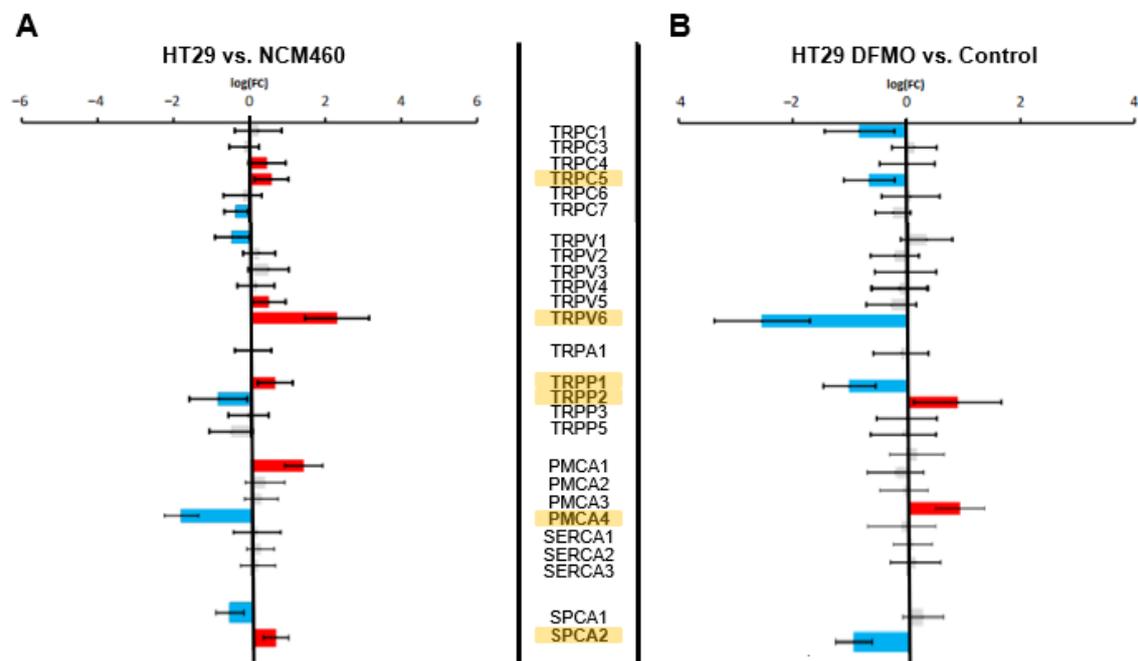


Figura 63. Expresión diferencial de genes relacionados con sistemas de transporte de Ca^{2+} . Estudio transcriptómico de la expresión diferencial de genes de los canales TRP y los sistemas de extrusión de Ca^{2+} entre células tumorales HT29 y células normales NCM460 (A) y entre células tumorales HT29 tratadas y no tratadas con DFMO (B). Las barras representan el \log_2 del *fold change* \pm IC de varios genes relacionados con el transporte de Ca^{2+} . Las barras grises indican que no hay diferencias significativas. Las barras azules indican que la expresión es menor en las células tumorales en relación con las células normales, mientras que las barras rojas indican una mayor expresión en las células tumorales. Los genes destacados en naranja significan que la expresión diferencial tumoral (A) es revertida en la dirección opuesta con el tratamiento de DFMO (B).

Además de estos genes que codifican para proteínas de la membrana plasmática implicadas en el transporte de Ca^{2+} , había otros genes de interés, pero que no se muestran en esta tesis, como son los que codifican para las proteínas reguladoras de SOCE, ORMDL3 y SEPTINA 6, y para las proteínas de transporte mitocondrial MCU o

VDAC3. Los resultados sugieren que estos sistemas de transporte están diferencialmente expresados en las células tumorales y podrían contribuir al fenotipo tumoral.

Los resultados de transcriptómica fueron confirmados mediante qPCR utilizando el gen ribosomal RP18S como referencia (figura 64). Salvo en los transcritos correspondientes al canal TRPC5 y a la proteína reguladora ORMLD3, el resto de los genes analizados mostraban una expresión diferencial en las células HT29 tumorales frente a las células normales NCM460 (figura 64A), en la misma dirección que mostraba el análisis transcriptómico con microarrays (figura 63A). Es decir, la expresión de TRPV6, TRPP1 y SPCA2 era mayor en las células tumorales HT29 en comparación con las células normales NCM460, mientras que la expresión de VDAC3 y PMCA4 estaba disminuida en las células tumorales. La depleción de la síntesis de poliaminas con DFMO en las células HT29 revertía la expresión de estos genes en particular, lo que concuerda con los resultados del análisis transcriptómico.

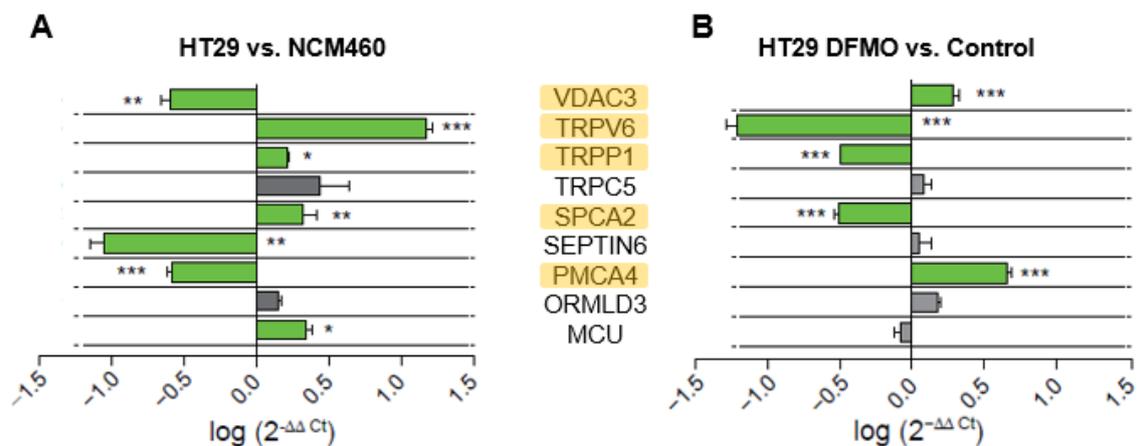


Figura 64. Expresión diferencial de genes implicados en transporte de Ca²⁺ en células normales y tumorales y reversión por depleción de poliaminas con DFMO. Se analizó la expresión de diferentes genes relacionados con el transporte de Ca²⁺ mediante qPCR utilizando el gen ribosomal *RPL18S* como control endógeno. A. Comparación de los niveles de expresión entre células tumorales HT29 y células normales NCM460. Los valores negativos indican una menor expresión en las células tumorales con respecto a las células normales mientras que los valores positivos indican una mayor expresión en las células tumorales. B. Expresión diferencial entre células HT29 tratadas y no tratadas con DFMO. Los valores negativos indican una disminución de la expresión en células HT29 tratadas con DFMO, mientras que los valores positivos indican un aumento de la expresión en las células tumorales tratadas. En ambos casos las barras representan el $\log(2^{-\Delta\Delta Ct}) \pm$ EEM de triplicados de tres muestras diferentes. Para mayor claridad, se muestran en verde las diferencias estadísticamente significativas. En naranja se destacan los genes donde la expresión diferencial tumoral (A) es revertida en dirección opuesta con el tratamiento de DFMO (B). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Por tanto, la inhibición de la síntesis de poliaminas que revierte parcialmente el fenotipo tumoral hacia un fenotipo más normal aumentó significativamente la expresión de PMCA4 y VDAC3 en las células tumorales HT29, lo que favorecería la extrusión de Ca^{2+} del citosol hacia el exterior celular o las mitocondrias. El mismo tratamiento disminuyó la expresión de TRPV6, TRPP1 y SPCA2 en las células tumorales HT29 lo que sería consistente con una disminución de la entrada de Ca^{2+} . Es decir, los cambios en los niveles de expresión en las células tumorales con respecto a las células normales pueden estar relacionados con un aumento de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático, asociado con el fenotipo tumoral. El tratamiento con DFMO, que inhibe la síntesis de poliaminas, revierte los niveles de expresión hacia un fenotipo menos tumoral con expresión diferencial de las moléculas que participan en el transporte de Ca^{2+} .

Estudios previos del grupo habían descrito un cambio en el tamaño de los depósitos y en la entrada de Ca^{2+} en células HT29 tratadas con DFMO (Gutiérrez *et al.*, 2019). A continuación, estudiamos el efecto de alguna de estas moléculas relacionadas con el transporte de Ca^{2+} por separado para comprobar si tenían algún efecto sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y la entrada de Ca^{2+} .

3.2. El silenciamiento de TRPV6 aumenta SOCE en las células tumorales HT29.

Para ver el efecto que podrían tener distintos sistemas de transporte de Ca^{2+} sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y SOCE, estudiamos por separado algunos de ellos. Para ello, los silenciamos uno por uno y analizamos qué ocurría con los niveles basales de Ca^{2+} , los depósitos de Ca^{2+} y la entrada de Ca^{2+} vía SOCE.

El primer sistema que estudiamos fue TRPV6, un canal de Ca^{2+} altamente selectivo cuya función principal en el epitelio intestinal es la absorción de Ca^{2+} . TRPV6 también se ha asociado a SOCE gracias a su activación por el complejo STIM1/Orai1/TRPC1 que provocan la translocación de TRPV6 a la membrana plasmática y aumenta la permeabilidad de Ca^{2+} en las células (Raphaël *et al.*, 2014). TRPV6 era uno de los genes cuya expresión se revertía con el tratamiento de DFMO en las células tumorales, por lo que su inhibición en las células HT29 podría modificar los niveles de Ca^{2+} y alterar SOCE. Para contrastar esta hipótesis, silenciamos TRPV6 en

las células HT29 utilizando siRNA. La expresión de TRPV6 se redujo un 50- 60% en las células HT29 (figura 65A).

En las células HT29 donde silenciamos TRPV6 (siTRPV6) medimos el Ca^{2+} basal, los depósitos de Ca^{2+} y la entrada de Ca^{2+} vía SOCE y los comparamos con los niveles obtenidos en células HT29 donde se había utilizado un siRNA que no interfiere con ningún gen conocido (siControl). Tratamos las células con ácido ciclopiazónico (CPA), un inhibidor reversible de la SERCA que provoca el vaciado de los depósitos y el no rellenado de los mismos mientras se mantenga.

No se observaron diferencias significativas en los niveles basales de Ca^{2+} citosólico entre las células HT29 Control y las células HT29 siTRPV6 (figura 65C). Tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto al tamaño de los depósitos, determinado por el área bajo la curva registrada después de añadir CPA en medio libre de Ca^{2+} (figura 65D). En cuanto a la entrada de Ca^{2+} , medimos SOCE en las células HT29 Control y HT29 siTRPV6 añadiendo Ca^{2+} en el medio extracelular en presencia de CPA. Inesperadamente, se registró un aumento significativo de la entrada de Ca^{2+} vía SOCE en las células HT29 siTRPV6 (figura 65E).

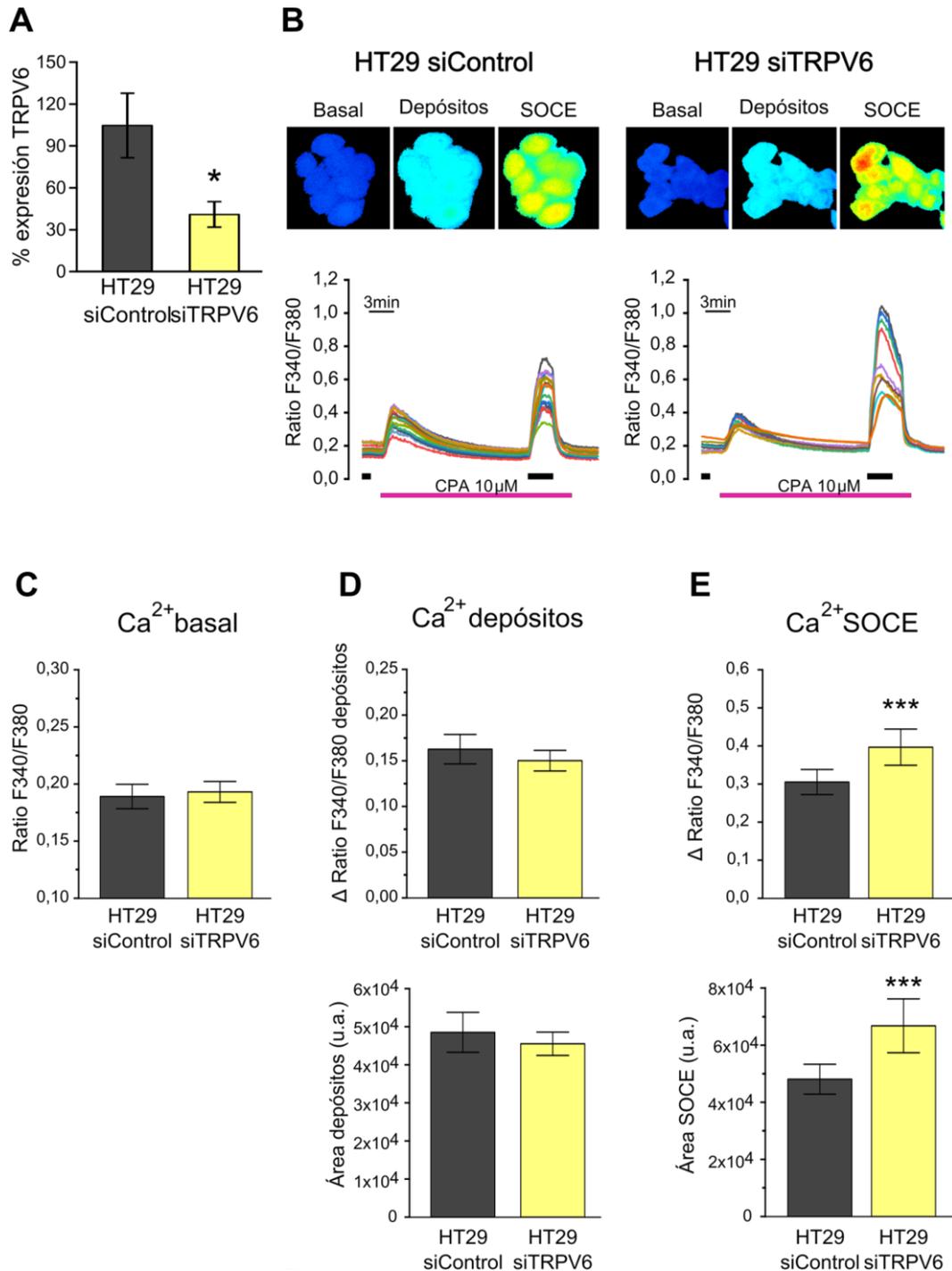


Figura 65. El silenciamiento de TRPV6 en las células HT29 aumenta SOCE. A. Media \pm EEM de la expresión de TRPV6 utilizando el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para comparar los niveles de TRPV6 HT29 siControl y siTRPV6 utilizando β -actina como control endógeno. B. Registros representativos de un experimento de Ca²⁺ en células individuales HT29 Control o siTRPV6. La barra negra indica presencia de Ca²⁺ en el medio extracelular y la barra rosa se corresponde con el intervalo de tiempo en presencia de CPA. C. Niveles de Ca²⁺ basal obtenidos analizando la mediana durante el primer minuto de experimento en medio Ca1. D. Niveles de Ca²⁺ en los depósitos midiendo la altura y el área de la curva registrada tras la adición de CPA en medio Ca0. E. Niveles de Ca²⁺ debido a SOCE midiendo la altura y el área de la curva tras añadir Ca²⁺ al medio extracelular y en presencia de CPA. Las barras en C, D, E representan la media \pm IC 95% de 80-87 células de tres experimentos independientes. * p<0,05; *** p<0,001.

3.3. El silenciamiento de SPCA2 disminuye el tamaño de los depósitos y aumenta SOCE en las células tumorales HT29.

En segundo lugar, estudiamos la SPCA2, una ATPasa perteneciente a la vía secretora de Ca^{2+} . Se ha descrito que esta proteína está sobreexpresada en algunos tipos de cáncer y su expresión aumenta la entrada de Ca^{2+} a través de Orai1 independientemente de los niveles de Ca^{2+} de los depósitos y, por lo tanto, de los sensores del retículo STIM1 y STIM2 (Feng *et al.*, 2010). Esto promueve la progresión en el ciclo celular y la supervivencia mediante la activación de la entrada de Ca^{2+} independiente de los depósitos (Makena *et al.*, 2022). Por lo tanto, la inhibición de SPCA2 podría cambiar los niveles de Ca^{2+} en las células HT29. Para estudiar esta hipótesis, silenciamos la expresión de SPCA2 en las células HT29 mediante siRNA (siSPCA2) y medimos el Ca^{2+} basal, el contenido en los depósitos y la entrada vía SOCE en las células silenciadas.

El siRNA redujo un 60-80% la expresión de en las células HT29 (figura 66A). En cuanto a los niveles de Ca^{2+} basal, no se observaron diferencias significativas en las células HT29 siSPCA2 respecto a las células control (figura 66C). Sí se observó una reducción significativa en el tamaño de los depósitos de las células HT29 siSPCA2 (figura 66D). Por último, en relación con SOCE, se registró un aumento significativo de la entrada de Ca^{2+} por esta vía en las células HT29 siSPCA2 (figura 66E).

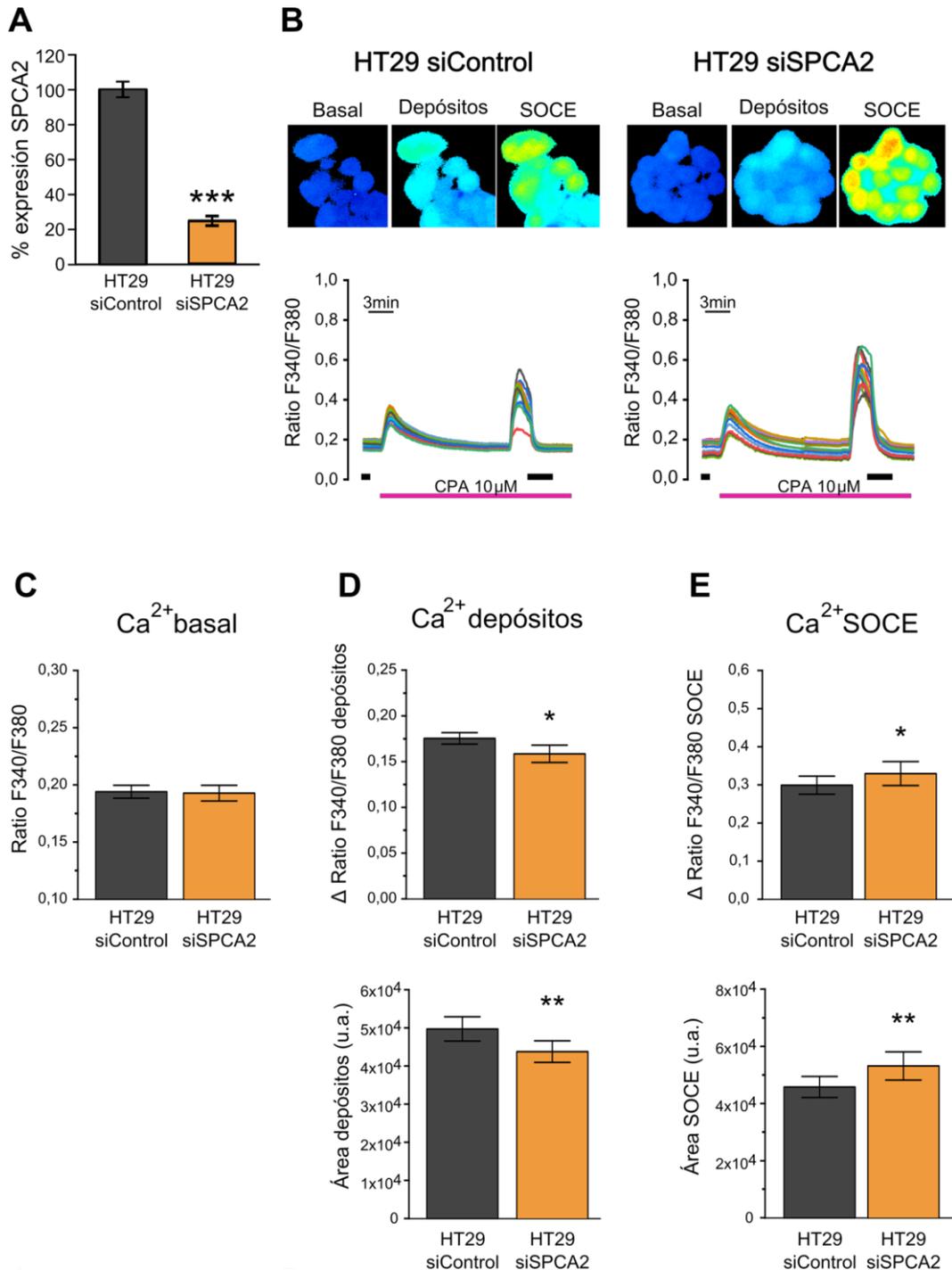


Figura 66. El silenciamiento de SPCA2 en las células HT29 disminuye el tamaño de los depósitos y aumenta SOCE. A. Media \pm EEM de la expresión de SPCA2 utilizando el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ obtenido al comparar los niveles de SPCA2 en las células siControl y siSPCA2 utilizando β -actina como control endógeno. B. Registros representativos de un experimento de Ca²⁺ en células HT29 siControl o siSPCA2. La barra negra indica la presencia de Ca²⁺ en el medio extracelular y la barra rosa se corresponde con el intervalo de tiempo en presencia de CPA. C. Niveles de Ca²⁺ basal obtenidos durante el primer minuto de experimento en medio Ca1. D. Niveles de Ca²⁺ de los depósitos midiendo la altura y el área de la curva registrada tras la adición de CPA al medio extracelular sin Ca²⁺. E. Niveles de Ca²⁺ tras la activación SOCE determinados por la altura y el área de la curva registrada. Las barras en C, D, E representan la media \pm IC 95% de 120-133 células de tres experimentos independientes. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

3.4. La inhibición de la síntesis de poliaminas con DFMO en células SW480 revierte la expresión de genes relacionados con el transporte de Ca^{2+} .

Ciertos genes relacionados con el transporte de Ca^{2+} aparecían sobreexpresados en células HT29 en comparación con las células NCM460, y su expresión diferencial se revertía con el tratamiento con DFMO en las células HT29 (figuras 63 y 64). Para confirmar esta expresión diferencial de genes y la posible reversión con DFMO en otras células de CCR, utilizamos la línea celular de adenocarcinoma de colon SW480. Medimos los niveles de poliaminas basales en las dos líneas tumorales y observamos que las células SW480 presentaban unos niveles de poliaminas que duplicaban los registrados en las células HT29, y que estos disminuían drásticamente con el tratamiento con DFMO en ambos tipos celulares (figura 67).

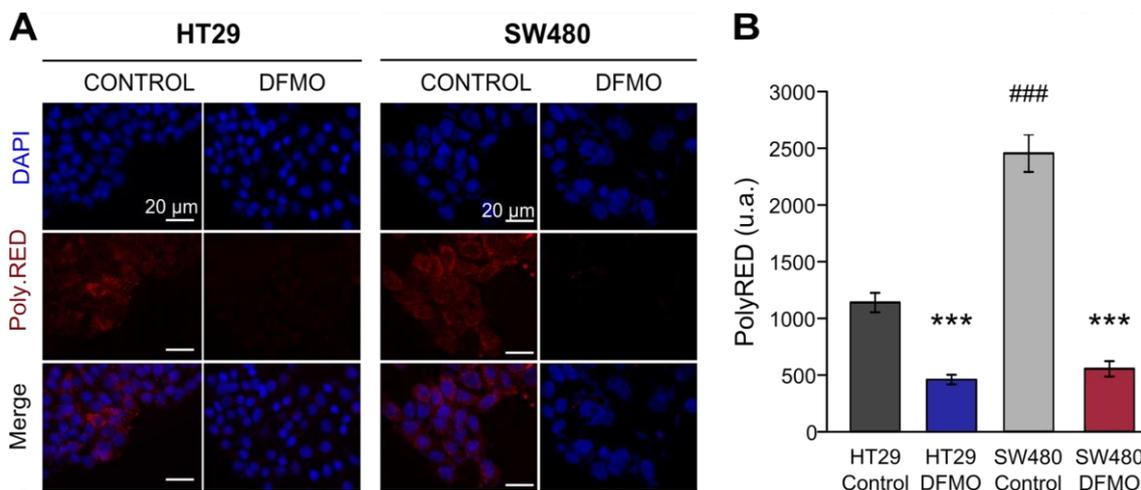


Figura 67. DFMO reduce los niveles de poliaminas en células HT29 y SW480. Medimos los niveles de poliaminas intracelulares utilizando el reactivo PolyamineRED (PolyRED) en células de adenocarcinoma de colon HT29 y SW480 tratadas y sin tratar con DFMO. A. Imágenes representativas de fluorescencia tomadas a 40X de células HT29 (izquierda) y SW480 (derecha) sin tratar (Control) o tratadas con DFMO. Las imágenes superiores indican los núcleos celulares marcados con DAPI. En el centro, las imágenes en rojo de PolyRED indicativas de los niveles de poliaminas. En la parte inferior, la superposición de las imágenes de ambos canales. B. Cuantificación de la fluorescencia roja correspondiente a los niveles de poliaminas detectados con PolyRED. Se representa la media \pm IC 95% de la fluorescencia obtenida en imágenes de diferentes campos de 4 experimentos independientes. *** $p < 0,001$ en células tratados con DFMO con respecto a su control; ### $p < 0,001$ entre los controles de las dos líneas celulares.

Para ver el efecto del DFMO en las células SW480, medimos el tamaño de los depósitos y la entrada de Ca^{2+} vía SOCE comparando los resultados con las células normales NCM460 como se muestra en la figura 68.

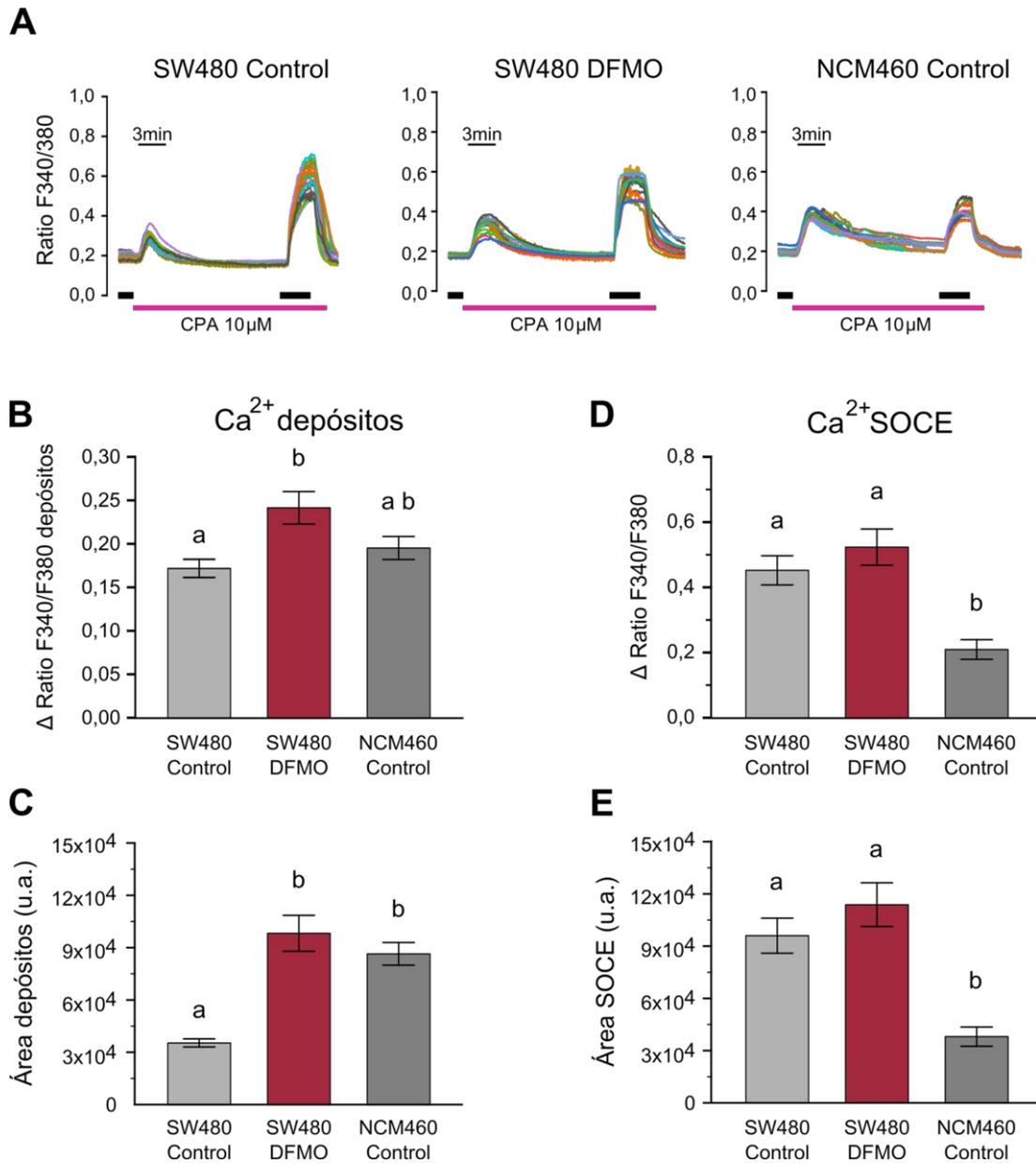


Figura 68. Efecto del DFMO sobre los depósitos de Ca²⁺ y SOCE en células SW480. A. Registros representativos de un experimento en células SW480 sin tratar (izquierda), SW480 tratadas con DFMO (centro) y NCM460 control (derecha). Las barras negras indican presencia de Ca²⁺ en el medio extracelular y la barra rosa indica el intervalo de tiempo en presencia de CPA. B. Altura de la curva generada al liberar Ca²⁺ de los depósitos con CPA. C. Niveles de Ca²⁺ en los depósitos de células SW480 y NCM460 medidos como el área bajo la curva que se genera después de provocar su vaciado con CPA. D. Altura de la curva que se corresponde con la entrada de Ca²⁺ al añadirlo al medio extracelular en presencia de CPA. E. Valor del área bajo la curva correspondiente a SOCE tras añadir Ca²⁺ al medio en presencia de CPA. En B, C, D, E se representa la media \pm IC 95% de 75-89 células de al menos tres experimentos independientes. La misma letra en las barras indica que no existen diferencias significativas ($p \geq 0,05$).

El contenido de Ca^{2+} de los depósitos, medido como el área bajo la curva después de activar el vaciado con CPA, fue cerca de 3 veces menor en las células tumorales SW480 control en comparación con las células normales NCM460. Sin embargo, el tratamiento con DFMO aumentó el contenido en Ca^{2+} de los depósitos de las células SW480 hasta valores de células NCM460 (figura 68C). En cuanto a SOCE, en las células SW480 se registró una entrada de Ca^{2+} por esta vía significativamente mayor que en las células NCM460. No obstante, el tratamiento con DFMO no tuvo efecto significativo sobre la SOCE en las células SW480 (figura 68D/E). Es decir, las células SW480 presentaban un perfil tumoral con depósitos de Ca^{2+} menores y entrada vía SOCE mayor que las células normales NCM460 y, el tratamiento con DFMO revertía parcialmente este fenotipo provocando un aumento del contenido en Ca^{2+} en los depósitos.

Como el DFMO afectaba a la expresión de genes en células HT29, analizamos la expresión de algunas de las moléculas relacionadas con el transporte de Ca^{2+} en células SW480 mediante qPCR. Concretamente, analizamos la expresión de los genes que codifican para SPCA2, TRPC5, TRPP1 y TRPV6 en células SW480 control y tratadas con DFMO y los comparamos con la expresión en células NCM460 (figura 69). Estas cuatro moléculas aparecieron sobreexpresadas en las células SW480 en relación con las células NCM460 (figura 68A). Sin embargo, tras el tratamiento de las células SW480 con DFMO, la expresión de SPCA2, TRPP1 y TRPV6 se redujo de manera significativa, mientras que en TRPC5 no se observaron diferencias significativas (figura 69B). El tratamiento con DFMO equiparó los niveles de expresión de TRPP1 entre las células SW480 tratadas y las células NCM460 control, mientras que los niveles de TRPC5 y TRPV6 seguían significativamente aumentados en las células tumorales pese a la reducción de la expresión con el tratamiento con DFMO. En el caso de SPCA2, el tratamiento con DFMO redujo drásticamente su expresión en las células tumorales, provocando una infraexpresión de esta molécula en las células SW480 tratadas en comparación con las células normales NCM460 (figura 69C).

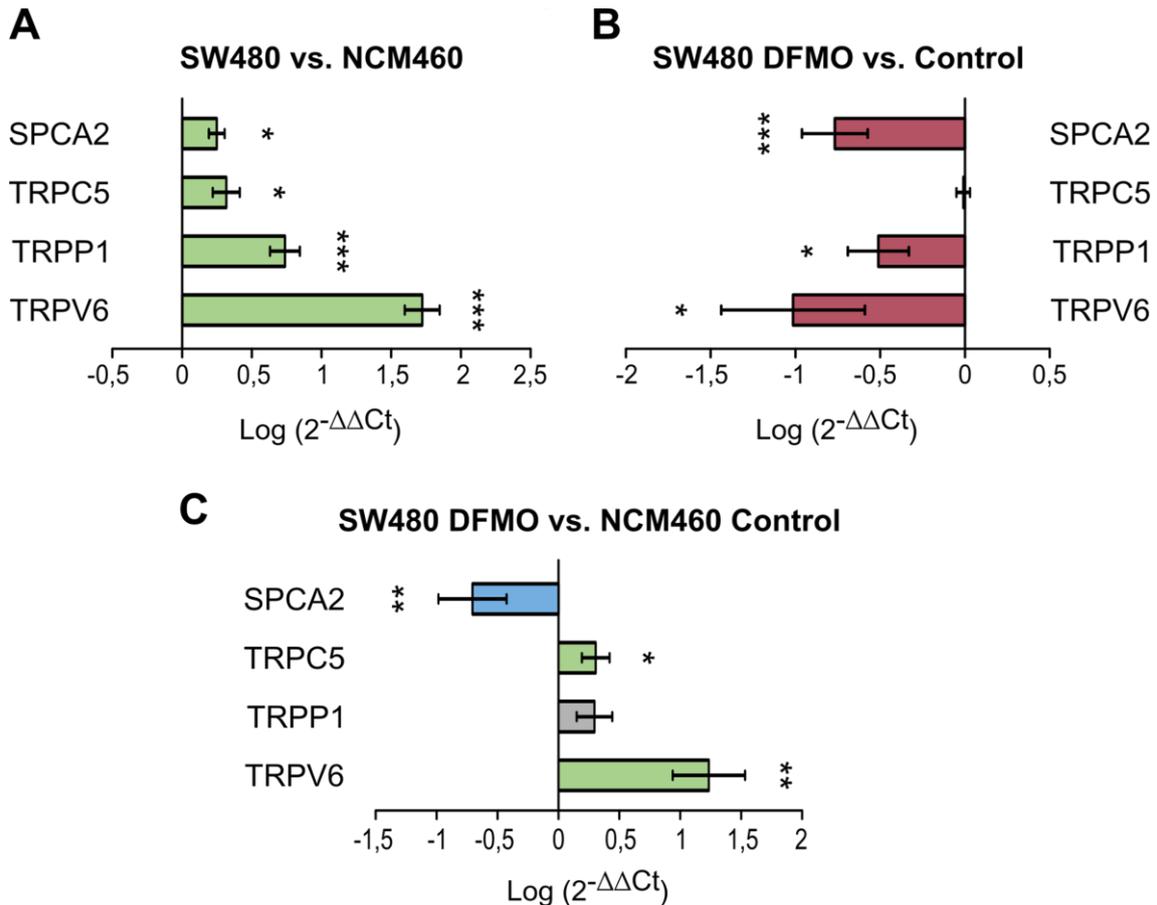


Figura 69. La expresión diferencial tumoral de SPCA2, TRPC5, TRPP1 y TRPV6 en células SW480 se revierte parcialmente con el tratamiento con DFMO. Análisis de la expresión diferencial mediante qPCR de genes relacionados con el transporte de Ca²⁺ en células SW480 sin tratar o tratadas con DFMO y células NCM460. Se utilizó el gen ribosomal RPL18S como control endógeno. A. Comparación en los niveles de expresión entre células tumorales SW480 y células normales NCM460. Los valores positivos, en verde cuando hay diferencias significativas, indican una mayor expresión en células tumorales. B. Expresión diferencial de genes de transporte de Ca²⁺ en células SW480 no tratadas y tratadas con DFMO. Los valores negativos, en granate cuando las diferencias son significativas, indican una disminución de la expresión con el tratamiento con DFMO. C. Expresión diferencial entre células SW480 tratadas con DFMO y células NCM460. Valores negativos indican mayor expresión en células NCM460; en positivo, mayor expresión en células SW480 tratadas. Se colorean aquellos donde las diferencias son significativas: en verde, mayor expresión tumoral; en azul, menor expresión en tumoral. Las barras representan el log (2^{-ΔΔCt}) ± EEM de triplicados de tres muestras diferentes. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

Las células SW480, modelo de línea celular de adenocarcinoma de colon, presentan un fenotipo relacionado con la homeostasis del Ca²⁺ intracelular similar al de las células HT29: depósitos con menor contenido de Ca²⁺ y entrada de Ca²⁺ vía SOCE mayor que las células normales NCM460 (figura 68). Estos cambios pueden estar mediados por la expresión diferencial de genes relacionados con el transporte de Ca²⁺ (figura 69A).

En resumen, la línea celular SW480 presenta unos niveles de poliaminas intracelulares significativamente mayores que las células tumorales HT29 (figura 67), por lo que el efecto de la depleción de poliaminas podría exacerbarse. El DFMO, inhibidor de la vía de síntesis de poliaminas, revierte parcialmente el fenotipo tumoral en las células SW480 en relación con la homeostasis de Ca^{2+} , aumentando el contenido en Ca^{2+} de los depósitos hasta valores similares a los de las células normales NCM460. Sin embargo, no altera SOCE, donde el DFMO no tiene efecto sobre las células SW480 (figura 68). La inhibición de la síntesis de poliaminas también revierte la expresión diferencial de SPCA2 y TRPP1 en las células SW480, mientras que TRPC5 y TRPV6 se mantienen sobreexpresados en las células SW480 a pesar del tratamiento si los comparamos con la expresión en células normales NCM460 (figura 69C).

Estos resultados indican que las células SW480, con altos niveles de poliaminas intracelulares, pueden ser un buen modelo para el estudio de estas moléculas en relación con el cáncer colorrectal.

4. Remodelado de los canales de potasio en el cáncer colorrectal y reversión por inhibición de la síntesis de poliaminas.

En el cáncer se producen cambios en la homeostasis de otros iones aparte del Ca^{2+} . En esta tesis se han estudiado cambios en la homeostasis del Ca^{2+} en el CCR, pero otro ion importante es el K^+ . Se ha observado una expresión anormal de canales de K^+ en varios tipos de tumores y células tumorales. Estos canales están implicados en proliferación celular, así como en progresión tumoral y neoplasia (Comes *et al.*, 2015). Algunos de los canales de K^+ relacionados con el cáncer y, más concretamente con el CCR, son los canales Kv10.1 y Kv11.1. El canal *Ether-à-go-go* 1, Kv10.1 o hEAG1, codificado por el gen *KCNH1* es el primer canal de K^+ asociado con oncogénesis y desarrollo tumoral (Gómez-Varela *et al.*, 2007). Relacionado con la familia *Ether-à-go-go*, nos encontramos el canal Kv11.1 o hERG1, codificado por el gen *KCNH2*, el cual se ha visto sobreexpresado en CCR a nivel de proteína (Lastraioli *et al.*, 2004). Por ello, estudiamos las posibles diferencias en las corrientes de K^+ de las células normales y tumorales con un análisis específico de aquellas corrientes mediadas por canales implicados en cáncer incluyendo los canales hEAG1 (Kv10.1) y hERG1 (Kv11.1). Finalmente, estudiamos los posibles efectos de la depleción de poliaminas y las bases moleculares de los posibles cambios.

4.1. Las células tumorales HT29 muestran menores corrientes totales de K^+ aunque mayor cantidad de corrientes “tumorales” que las células normales NCM460.

Para estimar las corrientes totales de K^+ dependientes de voltaje en células normales y tumorales utilizamos la técnica de *patch-clamp* que permite registrar corrientes de K^+ a diferentes potenciales. La figura 70A muestra registros representativos de las corrientes totales de K^+ y las curvas de densidad de corriente/voltaje (I-V) obtenidas. Se utilizó astemizol para bloquear de forma selectiva las corrientes hEAG1 y hERG1. La diferencia entre la corriente total y tras la aplicación del astemizol permitió la identificación de las corrientes debidas a estos dos canales. Observamos que la corriente total de K^+ es significativamente mayor en las células NCM460 que en las células HT29 a potenciales positivos (figuras 70B). Tras bloquear

los canales hEAG1 y hERG1 con astemizol 5 μM , observamos una disminución de la corriente que se corresponde con la mediada por los canales hEAG1 y hERG1 (figura 70A). Aunque las corrientes totales en las células tumorales fueron menores que en las normales, la contribución de las corrientes hEAG1 y hERG1 a la corriente total fue mucho mayor en las células tumorales. De hecho, las corrientes hEAG1 y hERG1 representan alrededor del 15% de la corriente en las células NCM460 mientras que alcanza el 40% aproximadamente de la corriente total en las células HT29 (figura 70B/C).

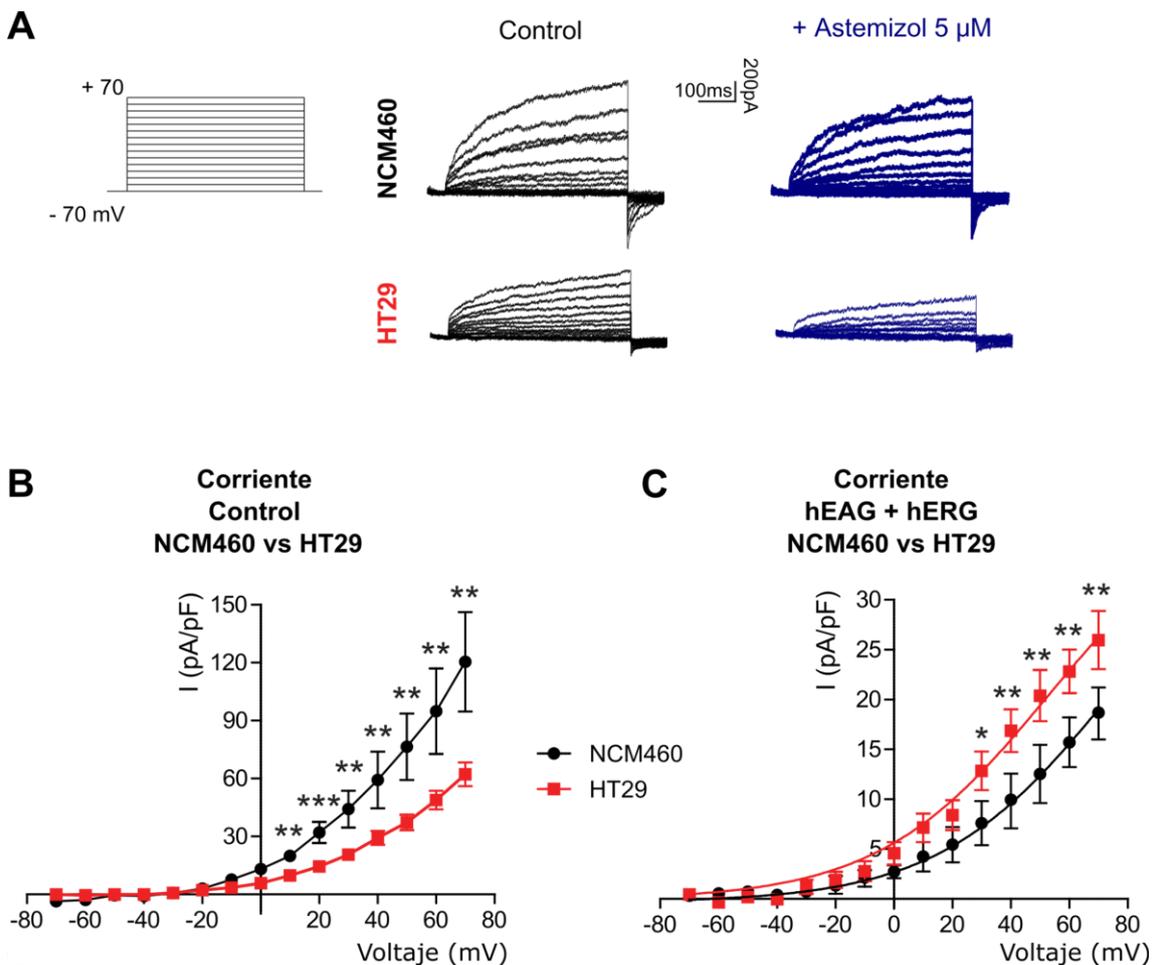


Figura 70. Corrientes de K^+ en células NCM460 y HT29. Las corrientes se registraron utilizando *patch-clamp planar* en configuración *whole cell* aplicando pulsos cuadrantes despolarizantes desde -70 mV a +70 mV. A. Registros representativos de células NCM460 o HT29 donde se mira la corriente de K^+ total (control, en negro) o añadiendo 5 μM de Astemizol (en azul) para bloquear los canales hEAG1 y hERG1. B. Media \pm EEM de los registros I-V de corriente total de K^+ en 10 células NCM460 (en negro) y 20 células HT29 (en rojo). C. Media \pm EEM de los registros I-V de la corriente de potasio mediada por los canales hEAG1 y hERG1 en células NCM460 y HT29. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.2. La inhibición de la síntesis de poliaminas aumenta las corrientes de K^+ en células HT29.

Resultados previos del grupo han demostrado que la inhibición de la síntesis de poliaminas con DFMO modifica la homeostasis de Ca^{2+} intracelular en células tumorales HT29, aumentando los depósitos y disminuyendo SOCE (Gutiérrez *et al.*, 2019). Se han obtenido resultados similares en otra línea celular de CCR, las células SW480. Estos cambios en la homeostasis del Ca^{2+} pueden deberse a modificaciones en la expresión de genes relacionados con el transporte de Ca^{2+} . Nos preguntamos si la inhibición de la síntesis de poliaminas también tendría efecto sobre la homeostasis del K^+ , en particular sobre las corrientes de K^+ incluyendo las corrientes mediadas por los canales hEAG1 y hERG1. Para responder a esta pregunta, medimos corrientes de K^+ en células HT29 sin tratar y células tratadas con DFMO 5 mM durante 96-120 horas. En ambos casos, las células HT29 se mantuvieron en cultivo con medio DMEM suplementado con FBS dializado para evitar la suplementación con poliaminas exógenas al cultivo celular. Observamos que la corriente total de K^+ era significativamente mayor en las células HT29 tratadas con DFMO que en aquellas que no estaban tratadas (figura 71B), revirtiendo el fenotipo tumoral en este sentido.

En segundo lugar, analizamos las corrientes específicas mediadas por los canales hEAG1 y hERG1. En este caso también se observó un aumento significativo en las corrientes de las células HT29 tratadas con DFMO (figura 71C). Es decir, la inhibición de la síntesis de poliaminas estaría provocando un aumento de las corrientes de K^+ incluyendo aquellas mediadas por los canales hEAG1 y hERG1. No obstante, en las células HT29 no tratadas, que han sido mantenidas con medio con FBS dializado, se observó una corriente mediada por hEAG1 y hERG1 muy pequeña, prácticamente inexistente (figura 71C, trazado negro). Los resultados indicaron que, en presencia de suero dializado, la inhibición de la síntesis de poliaminas con DFMO aumentó la corriente total de K^+ y este incremento podría deberse a un aumento de la actividad de los canales Kv10.1 y Kv11.1. Por tanto, estos resultados sugieren que las poliaminas modulan las corrientes de K^+ , particularmente la corriente mediada por los canales Kv10.1 y Kv11.1.

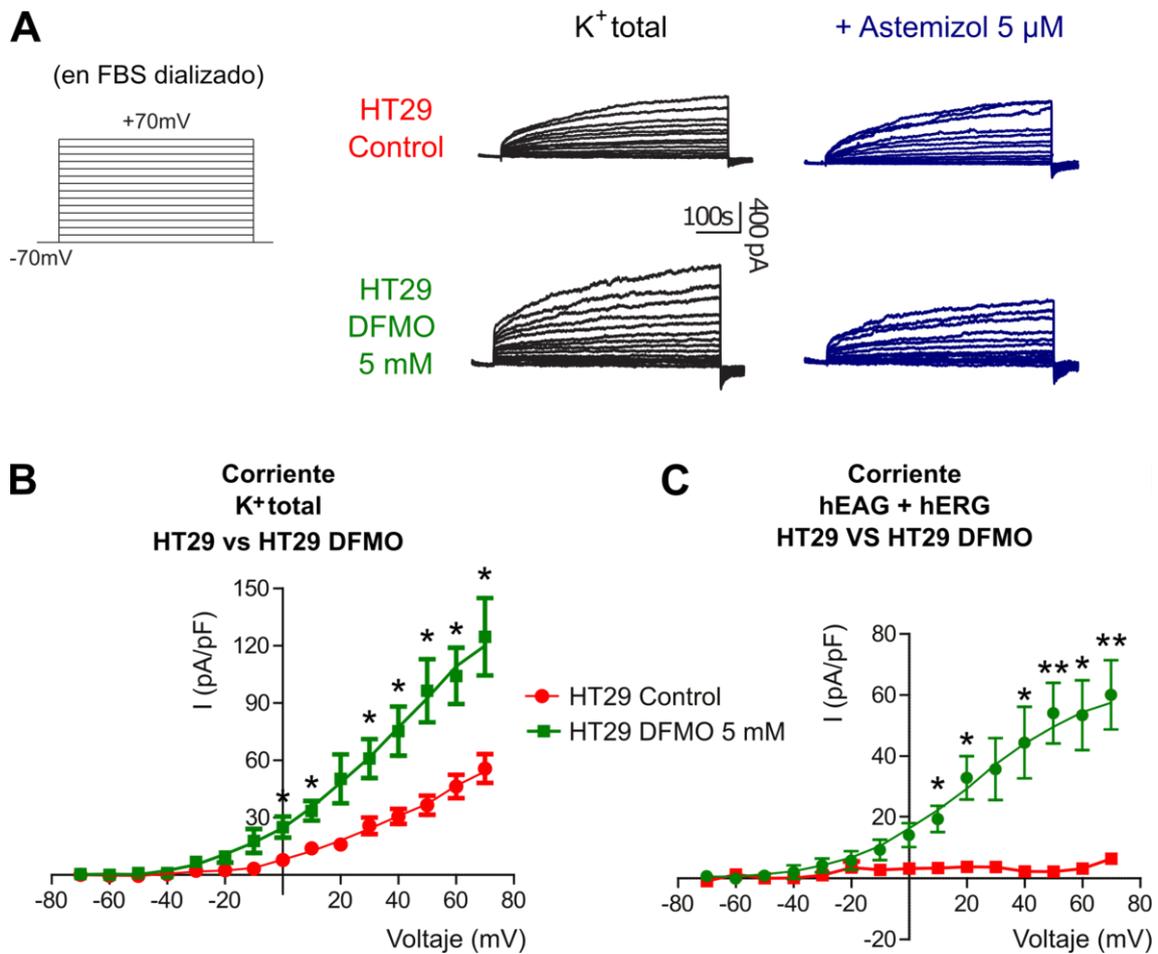


Figura 71. La inhibición de la síntesis de poliaminas con DFMO en células HT29 aumenta las corrientes de K⁺. Se midieron las corrientes de K⁺ utilizando *patch-clamp planar* en configuración *whole cell* y aplicando pulsos cuadrados despolarizantes desde -70 mV a +70 mV. A. Registros representativos de la corriente de K⁺ en células HT29 tratadas con DFMO 5 mM y células HT29 sin tratar (control). Se registraron las corrientes de K⁺ totales (en negro) y las corrientes aplicando astemizol 5 μM (en azul) para bloquear hEAG1 y hERG1. B. Media ± EEM de los registros I-V normalizados según el tamaño de la célula de la corriente total de K⁺ en células HT29 sin tratar (control) o tratadas con DFMO 5 mM durante 4-5 días. C. Media ± EEM de los registros I-V normalizados según el tamaño de la célula de la corriente de los canales hEAG1 y hERG1 en células HT29 sin tratar (control) o tratadas con DFMO 5 mM durante 4-5 días. En B y C se representan en rojo las células HT29 control sin tratar y en verde las células HT29 tratadas con DFMO 5 mM. * p<0,05; ** p<0,01.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos previamente en las células normales NCM460, observamos que el tratamiento con DFMO en las células HT29 aumentó la corriente total por canales de K⁺ hasta niveles similares a los obtenidos en las células NCM460 control (figura 72).

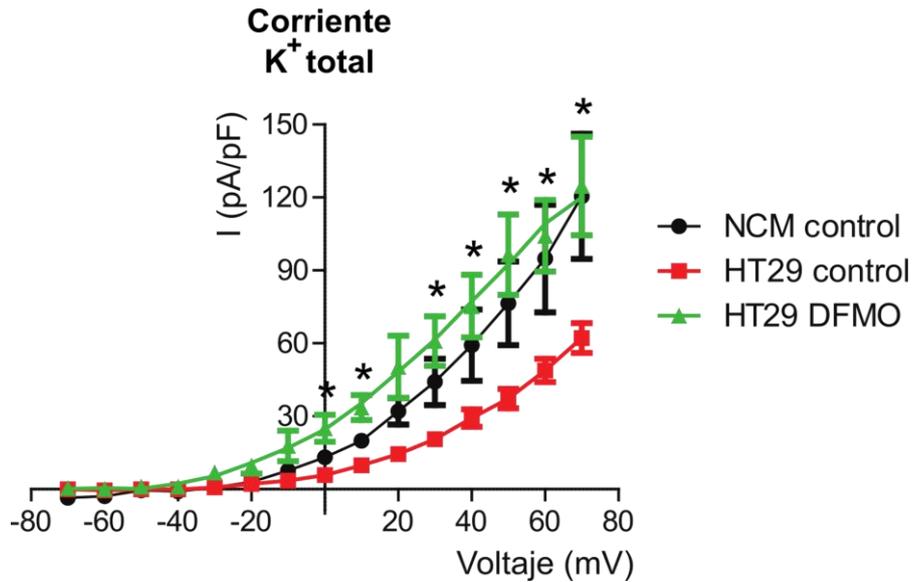


Figura 72. La inhibición de la síntesis de poliaminas con DFMO iguala las corrientes totales de K⁺ de las células HT29 y NCM460. Media \pm EEM de los registros I-V normalizados según el tamaño de la célula de la corriente total de K⁺ en células tumorales HT29 control (en rojo), HT29 tratadas con DFMO 5 mM (en verde) y células normales NCM460 (en negro). * $p < 0,05$ en comparación con células HT29 control.

Por lo tanto, podemos concluir que las células tumorales HT29 presentan una menor cantidad de corriente total de K⁺ dependiente de voltaje que las normales NCM460, aunque el componente mediado por canales Kv10.1 y Kv11.1 en las células HT29 es mayor. Además, la inhibición de la síntesis de poliaminas revierte esta característica tumoral, aumentando las corrientes totales de K⁺, en especial aquellas que están mediadas por los canales Kv10.1 y Kv11.1. En sentido inverso, se podría decir que las poliaminas, presentes en exceso en el entorno tumoral, favorecen la pérdida de corriente de K⁺ total y este efecto viene mediado por la modulación de la actividad de los canales Kv10.1 y Kv11.1, mayoritarios en estas células.

4.3. Expresión diferencial de canales de K⁺ en las células tumorales HT29 en comparación con las células normales NCM460.

Para investigar la expresión diferencial de los canales de K⁺ en el CCR se llevó a cabo un estudio transcriptómico comparando las células normales NCM460 y las células

tumorales HT29. Se estudiaron cerca de 100 genes que codifican para diferentes canales de K⁺.

Los datos obtenidos del análisis transcriptómico indicaron que una menor expresión de gran parte de los canales de K⁺ en las células HT29 en comparación con las células NCM460. Específicamente, una quinta parte de los genes estudiados mostraban una expresión significativamente menor en las células tumorales respecto a las normales, aunque dos genes, *KCNQ4* y *KCNK17*, se expresaban más abundantemente en las células tumorales (figura 73). Estos resultados podrían explicar la mayor corriente total de K⁺ que se observaba en las células NCM460.

Algunos de los canales diferencialmente expresados pertenecen a la familia de los canales EAG. Concretamente, el canal Kv11.1 o hERG1, codificado por el gen *KCNH2*, se encontró infraexpresado en las células HT29 (figura 73). En este estudio no contábamos con los datos suficientes como para saber qué estaba ocurriendo con la expresión del gen *KCNH1*, que codifica para Kv10.1. El resultado de la expresión de Kv11.1 no concuerda con la mayor cantidad de corriente mediada por Kv10.1 y Kv11.1 observada en las células tumorales HT29 en comparación con las células normales NCM460 (figura 70). Sin embargo, el estudio transcriptómico nos da unos resultados de niveles de expresión de ARN que pueden no corresponder con los niveles de expresión de proteína.

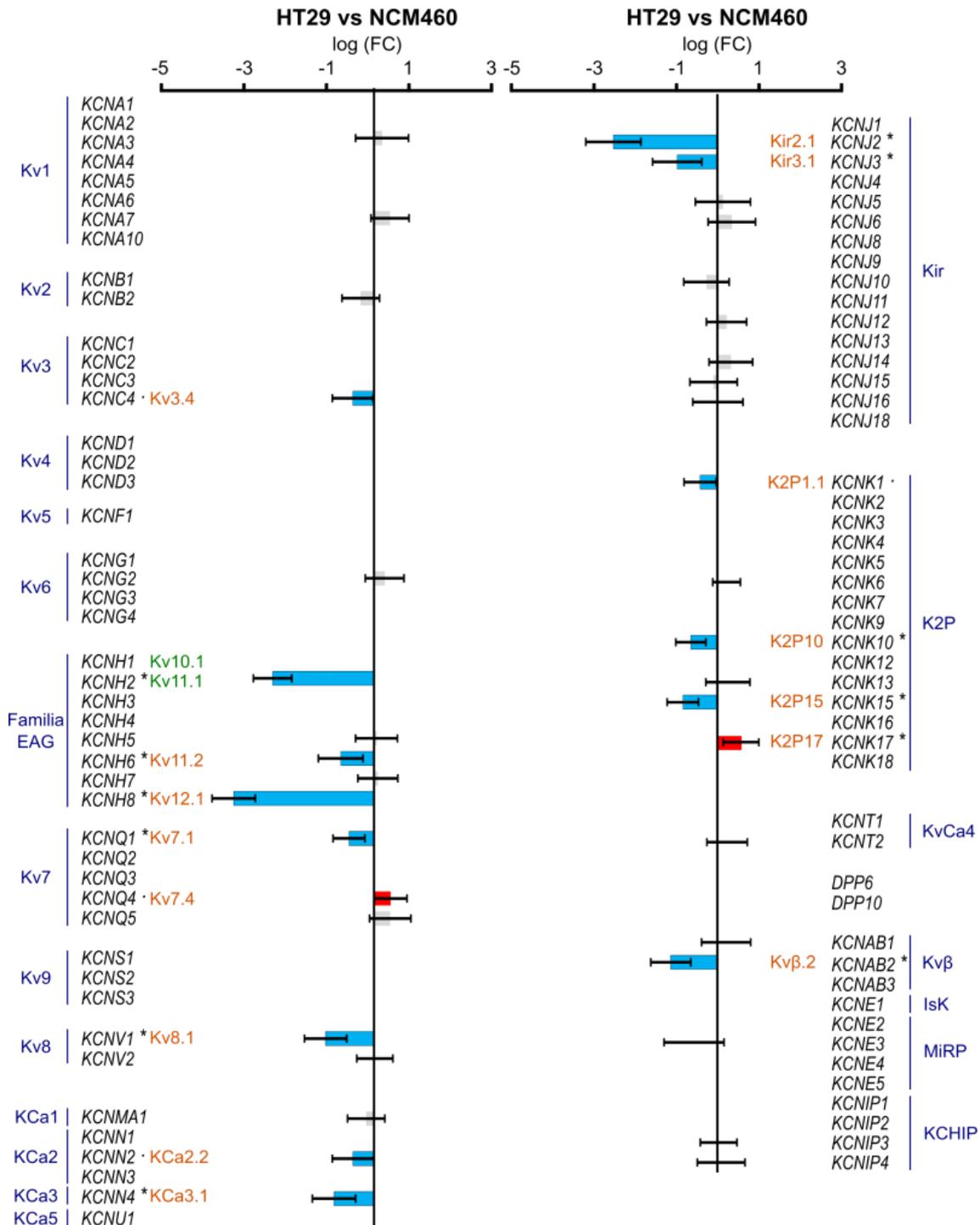


Figura 73. Expresión diferencial de canales de K⁺ entre células HT29 y células NCM460. Las barras representan log₂ del *fold change* (FC) ± IC 95% de los resultados del análisis transcriptómico utilizando *microarrays*. Las barras grises indican que no hay diferencias entre ambas condiciones. Las barras azules hacia la izquierda indican que la expresión es significativamente menor en las células tumorales, mientras que las barras rojas hacia la derecha indican que los genes están sobreexpresados significativamente en células tumorales. Para mayor claridad, se indica en azul la familia de canales de K⁺ a las que pertenece el conjunto de genes. En letra verde se indican los canales Kv10.1 y Kv11.1. Se resaltan en naranja los nombre de los canales codificados por genes que muestran una expresión diferencial significativamente diferente (* p<0,05) o cercana a la significancia (· p< 0.1).

A continuación, estudiamos los efectos de la inhibición de la síntesis de poliaminas con DFMO sobre la expresión de canales de K⁺ en células tumorales HT29. Los resultados, mostrados en la figura 74, indicaron que la expresión de 6 genes estaba modulada por DFMO: el tratamiento aumentó la expresión de *KCNV2*, *KCNJ3*, *KCNK1*, y *KCNE3*, mientras que la expresión de *KCNN4* y *KCNK6* disminuyó tras el tratamiento. Sin embargo, únicamente 2 de ellos revertían su expresión en las células HT29 tratadas con DFMO en comparación con la expresión diferencial observada frente a NCM460. Estos genes fueron *KCNJ3* y *KCNK1* que corresponden, respectivamente, con el canal Kir3.1 (o GIRK1) y el canal K2P1.1. Ambos aparecían infraexpresados en las células HT29 en comparación con las células NCM460 (figura 73) y el tratamiento con DFMO en las células tumorales aumentó su expresión de manera significativa (figura 74).

No se observaron diferencias significativas en la expresión de ninguno de los genes que codifican para canales de la familia EAG tras el tratamiento con DFMO de las células HT29.

Por otra parte, es reseñable el aumento significativo de la expresión de *KCNE3*, que codifica para una subunidad reguladora de canales de K⁺ (o MiRP2), y de *KCNV2*, que codifica para el canal Kv8.2, tras el tratamiento de las células tumorales HT29 con DFMO.

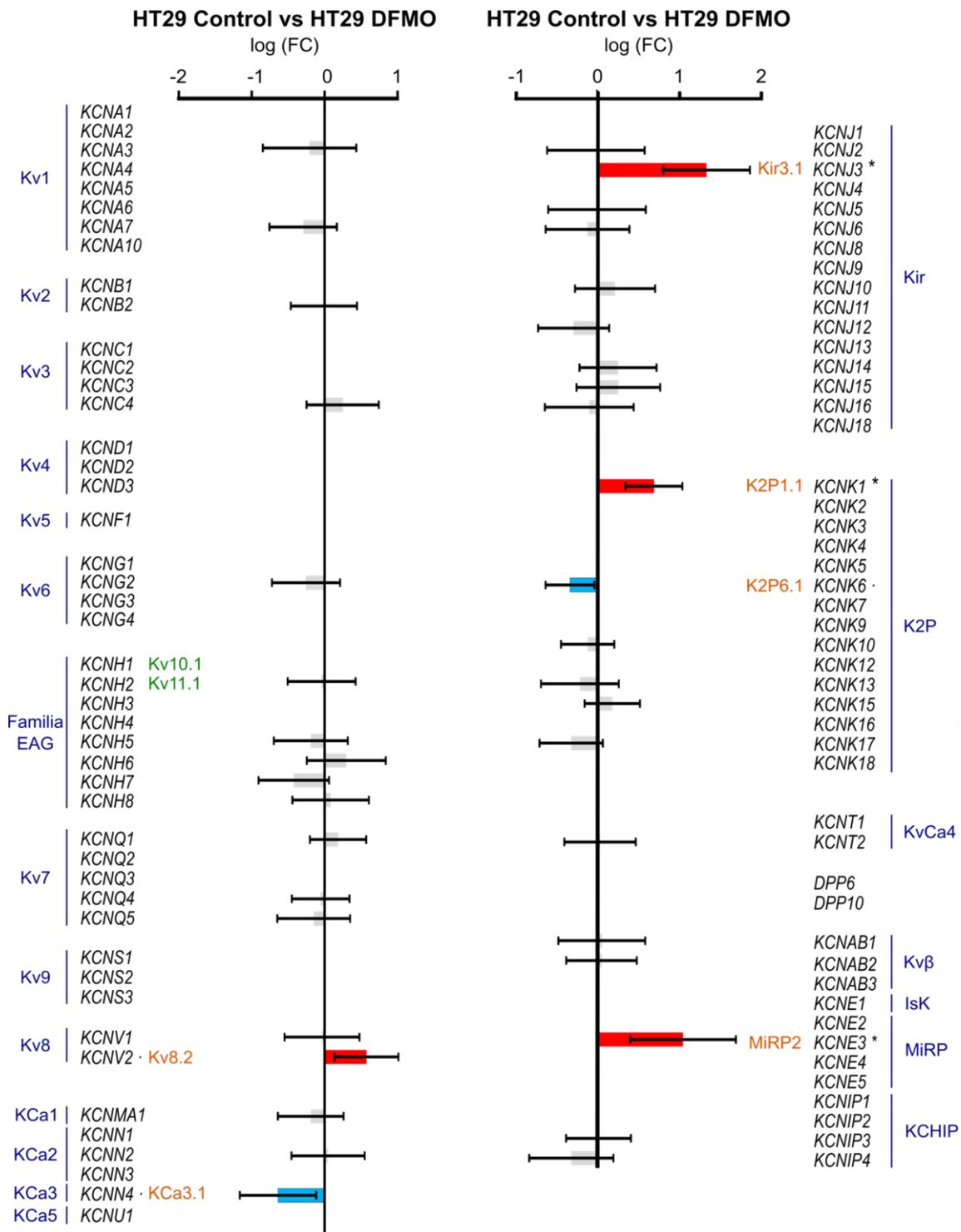


Figura 74. Expresión diferencial de genes codificantes para canales de K⁺ en células HT29 tratadas con DFMO. Análisis transcriptómico utilizando *microarrays*. Las barras azules hacia la izquierda indican que hay una menor expresión en las células HT29 tratadas con DFMO, mientras que las barras rojas hacia la derecha indican una mayor expresión en las células después del tratamiento con DFMO. Se resaltan en naranja los nombres de los canales codificados por genes que muestran una expresión diferencial significativamente diferente (* $p < 0,05$) o cercana a la significancia (· $p < 0,1$).

En conjunto, los resultados mostraron la existencia de un remodelado en la homeostasis del K^+ en el CCR, tanto a nivel electrofisiológico como con el análisis transcriptómico. La inhibición de la síntesis de poliaminas con DFMO aumenta las corrientes totales de K^+ en las células tumorales HT29 hasta alcanzar los niveles de las células NCM460, pese a la modulación de únicamente de 4 genes, *KCNV2*, *KCNJ3*, *KCNK1* y *KCNE3*, tras el tratamiento con DFMO. La cuestión es si estos cambios podrían explicar el aumento de las corrientes Kv10.1 y Kv11.1 observados en las células HT29 tras la depleción de poliaminas.

Por otra parte, no hay coincidencia entre los estudios transcriptómicos y la electrofisiología. En los canales de K^+ , y más concretamente en Kv10.1 y Kv11.1, podrían estar teniendo lugar diferentes procesos de regulación que alteren la actividad de los canales. De ahí las diferencias observadas a nivel electrofisiológico, pero no en transcriptómica. Sería interesante utilizar otras estrategias en el futuro para tratar de identificar los mecanismos de modulación de la homeostasis del K^+ en CCR por las poliaminas.

DISCUSIÓN

La homeostasis iónica es muy importante para las funciones de la célula y su alteración puede contribuir al desarrollo de enfermedades como el cáncer. El proceso tumoral promueve estas alteraciones que proporcionan ventajas para la supervivencia celular incluyendo una mayor capacidad de proliferar y migrar, incluso en ausencia de oxígeno o la resistencia a la muerte celular. Estas características de las células tumorales son conocidas como los *hallmarks* del cáncer. Dos de los iones más importantes para las funciones celulares son el Ca^{2+} y el K^+ . Se han visto cambios en la homeostasis de ambos cationes en diferentes tipos de tumores. Resultados previos del grupo han descrito cambios en la homeostasis intracelular de Ca^{2+} y, más concretamente, en la entrada de Ca^{2+} vía SOCE, relacionados con cambios en la expresión de moléculas directamente relacionadas con SOCE y otras moléculas como el canal TRPC1 (Sobradillo *et al.*, 2014). Esta mayor entrada de Ca^{2+} en las células tumorales también está modulada por la mitocondria tumoral, la cual es capaz de captar Ca^{2+} a su interior de manera que previene la inactivación dependiente de Ca^{2+} de los canales implicados en SOCE (Hernández-Morales *et al.*, 2017). El DFMO, un inhibidor de la enzima ODC, el paso limitante en la biosíntesis de poliaminas, parece revertir el remodelado de SOCE que se produce en el CCR y reducir características del cáncer como la mayor proliferación celular o la resistencia a la apoptosis (Gutiérrez *et al.*, 2019). Por todo ello, en este trabajo se han abordado nuevas estrategias para el estudio y la reversión del fenotipo tumoral en las células de CCR, así como se ha profundizado en alguna de las ya existentes, como la depleción de poliaminas, para determinar los cambios que producen de manera más concreta en el remodelado iónico, tanto del Ca^{2+} como del K^+ .

1. La transferencia de mitocondrias de células normales a células tumorales revierte parcialmente el fenotipo tumoral.

Las células tumorales tienen una entrada de Ca^{2+} vía SOCE mayor que las células normales. No solo eso, sino que los canales CRAC se mantienen abiertos durante más tiempo. Resultados previos del grupo pusieron el foco de estos cambios en la mitocondria tumoral. La mitocondria de las células tumorales es capaz de captar más Ca^{2+} que la de las células normales. La retirada de Ca^{2+} del citoplasma por las mitocondrias ralentiza la inactivación de los canales CRAC dependiente de Ca^{2+} , lo que promueve una entrada vía SOCE mayor y prolongada en el tiempo en las células tumorales (Hernández-Morales *et al.*, 2017). Este remodelado en el Ca^{2+} se debe, por

una parte, al efecto Warburg y al mayor potencial mitocondrial que presentan las células tumorales que tiene una enorme influencia sobre la captación mitocondrial de Ca^{2+} (Valero *et al.*, 2008). Por otra parte, también se debe a la expresión diferencial de numerosas proteínas que participan en la captación de Ca^{2+} mitocondrial incluyendo los canales VDAC de la MME, el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial y todas las moléculas moduladoras de este complejo, así como los sistemas de extrusión de Ca^{2+} de la mitocondria. Para determinar la contribución de la mitocondria tumoral en la entrada de Ca^{2+} vía SOCE, se diseñó una estrategia novedosa: transferir mitocondrias de células normales NCM460 a células tumorales HT29. Se sabe que, de manera natural, las mitocondrias viajan entre células mediante lo que se conoce como transformación mitocondrial (Kesner *et al.*, 2016). De manera artificial, se ha descrito una técnica llamada *MitoCeption* o mitocepción que permite introducir mitocondrias aisladas de células donantes a células receptoras a partir de un choque térmico (Caicedo *et al.*, 2015).

En este proyecto de tesis, se ha desarrollado una estrategia sencilla que permite aislar mitocondrias de células NCM460 previamente marcadas con una sonda fluorescente y transferirlas a células receptoras HT29. A estas células HT29 que contienen mitocondrias de células NCM460 las hemos denominado HT29 normo-mitoceptadas. Los resultados muestran que la mitocepción es técnicamente posible a través de la simple co-incubación de mitocondrias aisladas y células receptoras, y que la transferencia aumenta con la densidad de mitocondrias donantes utilizadas. La eficiencia mejora notablemente si se introduce un paso de centrifugación conjunta de mitocondrias aisladas y células receptoras en el protocolo. Sin embargo, este paso aumenta el daño celular.

Ase observó una reducción significativa de SOCE en las células HT29 normo-mitoceptadas en comparación con las células HT29 usadas como control. Esta reducción se puede observar a las pocas horas de la transferencia mitocondrial y las diferencias se van haciendo mayores durante los primeros días. Sin embargo, a la semana de la mitocepción ya no se observan cambios significativos entre la entrada vía SOCE entre las células HT29 normo-mitoceptadas y aquellas usadas como control. Teniendo en cuenta que las células HT29 se duplican aproximadamente cada 24 horas, es posible que a los 7 días la abundancia relativa de células HT29 normo-mitoceptadas se haya reducido notablemente por lo que la SOCE registrada correspondería a la de las células HT29 sin mitoceptar. Al dividirse las células, también se dividen las

mitocondrias, distribuyendo su masa entre las células hijas. No conocemos la vida media mitocondrial en los modelos celulares empleados, pero hay estudios que han reportado una enorme variabilidad dependiendo del tejido donde se encuentren, oscilando entre los 3,4 días en células de hígado y los 35,7 días en cerebro (Stauch et al., 2023). Además, las mitocondrias son orgánulos muy dinámicos que se pueden fusionar y dividir en respuesta a la demanda celular y al entorno (Archer, 2013). Es decir, durante esos siete días, las mitocondrias introducidas de las células NCM460 se han podido fusionar con las mitocondrias propias de las células HT29 y dividirse repartiéndose entre las nuevas células sintetizadas, de manera que, al cabo de una semana, no quedarían mitocondrias procedentes de las células NCM460.

Para ver si los efectos en la reducción de SOCE se debían al origen de las mitocondrias transferidas o si eran más bien un efecto del aumento de la masa mitocondrial tras el proceso de mitocepción, repetimos el proceso de aislamiento y transferencia mitocondrial, pero esta vez utilizando como donadoras las propias células tumorales. Es decir, se aislaron mitocondrias de células tumorales HT29 y se transfirieron a las células tumorales, generando las células HT29 tumo-mitoceptadas. Se observó un aumento significativo de la SOCE en estas células con respecto a las células HT29 utilizadas como control. Es decir, la transferencia de mitocondrias tumorales a las células HT29 aumenta la entrada de Ca^{2+} vía SOCE. Por lo tanto, los cambios observados en SOCE se deben a las mitocondrias transferidas y no al proceso de mitocepción.

El hecho de que haya un mayor número de mitocondrias tumorales en las células tumorales HT29 podría explicar la mayor captación de Ca^{2+} mitocondrial en estas células descrita por nuestro grupo (Sobradillo *et al.*, 2014) y, por ende, una mayor retirada de Ca^{2+} del citosol y de las regiones cercanas a los canales de SOCE, previniendo así la inactivación de estos canales y resultando en una mayor entrada de Ca^{2+} . Sin embargo, los resultados indican que más que la cantidad de mitocondrias, el parámetro relevante es la naturaleza de las mitocondrias, ya que si el exceso mitocondrial deriva de células normales entonces SOCE decrece, posiblemente porque estas mitocondrias no capturan Ca^{2+} con la misma avidez que las mitocondrias tumorales. Además, cuando las mitocondrias aisladas de las células tumorales fueron introducidas en las células normales NCM460 – NCM460 tumo-mitoceptadas–, no se observaron cambios en la entrada de Ca^{2+} vía SOCE. Estos resultados indican la importancia tanto del origen mitocondrial como del fenotipo de las células receptoras. Sin embargo, son necesarios

más estudios para poder concluir de qué manera afectan las mitocondrias tumorales a las propias células tumorales HT29 y normales NCM460.

Resultados previos del grupo han descrito que las células tumorales HT29 presentan un potencial mitocondrial $\Delta\Psi_m$ más negativo que las células normales NCM460. Debido a ello, las mitocondrias de las células HT29 captan más Ca^{2+} del citosol y pueden prevenir la inactivación de los canales SOCs dependiente de Ca^{2+} , lo que da lugar a una entrada vía SOCE mayor y mantenida (Hernández-Morales *et al.*, 2017). Por ello, nos preguntamos si las diferencias en SOCE entre las células NCM460 y HT29 control, normo y tumor - mitoceptadas, se debían a diferencias en el $\Delta\Psi_m$ de las células mitoceptadas. Tras medir el $\Delta\Psi_m$ utilizando la sonda TMRM, observamos que aquellas células tumorales donde SOCE era menor (HT29 normo-mitoceptadas), presentaban un $\Delta\Psi_m$ más positivo que las células HT29 control, mientras que el $\Delta\Psi_m$ era más negativo en las células HT29 tumor-mitoceptadas. Las células NCM460 por su parte, presentaban un $\Delta\Psi_m$ más positivo que las células HT29, independientemente de si había recibido mitocondrias tumorales o no. Por tanto, estos resultados sugieren que la mitocepción con mitocondrias normales, vuelve más positivo el potencial mitocondrial promedio de las células tumorales, mientras que la mitocepción con más mitocondrias tumorales, hiperpolariza el potencial de membrana mitocondrial de las células tumorales, o al menos, el volumen subcelular polarizado capaz de capturar Ca^{2+} de modo eficaz. Sin embargo, las mitocondrias tumorales no son capaces de polarizar las células normales. Los efectos sobre el potencial podrían explicar los efectos de la mitocepción sobre SOCE. Una disminución en la fluorescencia del TMRM se asocia a una disminución en SOCE. Sin embargo, es necesario un estudio más profundo para determinar el efecto de la transferencia de mitocondrias sobre la entrada de Ca^{2+} por esta vía, como la medida de las corrientes I_{CRAC} e I_{SOC} , y su inactivación, en las células mitoceptadas.

Se conoce que la mayoría de las células tumorales epiteliales presentan un potencial mitocondrial alto en comparación con las células normales (Summerhayes *et al.*, 1982). El origen de esta diferencia en el $\Delta\Psi_m$ aún no es claro. Una posibilidad es que las células tumorales acumulan mutaciones, tanto en el genoma mitocondrial como en el nuclear, que resultan en el aumento de $\Delta\Psi_m$ (Begum and Shen, 2023). La actividad de ciertos oncogenes como *Myc*, *AKT* o *BRAF*, así como la reducción de supresores tumorales como p53, pueden afectar a diferentes vías metabólicas, incluidas las que afectan al metabolismo mitocondrial (Levine and Puzio-Kuter, 2010). Es posible que la

alteración del $\Delta\Psi_m$ en las células tumorales sea resultado de mutaciones específicas del cáncer, aunque también se pueda deber a mecanismos de señalización que tienen lugar dentro del microentorno tumoral (Begum and Shen, 2023). Es decir, las propias mitocondrias presentan diferencias según su origen que pueden modular la entrada de Ca^{2+} vía SOCE (HT29 normo-mitoceptadas vs HT29 tumo-mitoceptadas), pero también es importante el entorno celular donde se encuentren (HT29 tumo-mitoceptadas vs NCM460 tumo-mitoceptadas). Todo ello puede producir cambios en el potencial mitocondrial y, por lo tanto, en SOCE. Estos cambios en SOCE podrían estar asociados a cambios en el fenotipo tumoral como la proliferación celular, la migración y capacidad de invasión o la resistencia a apoptosis, características que podrían estar alteradas en las células mitoceptadas.

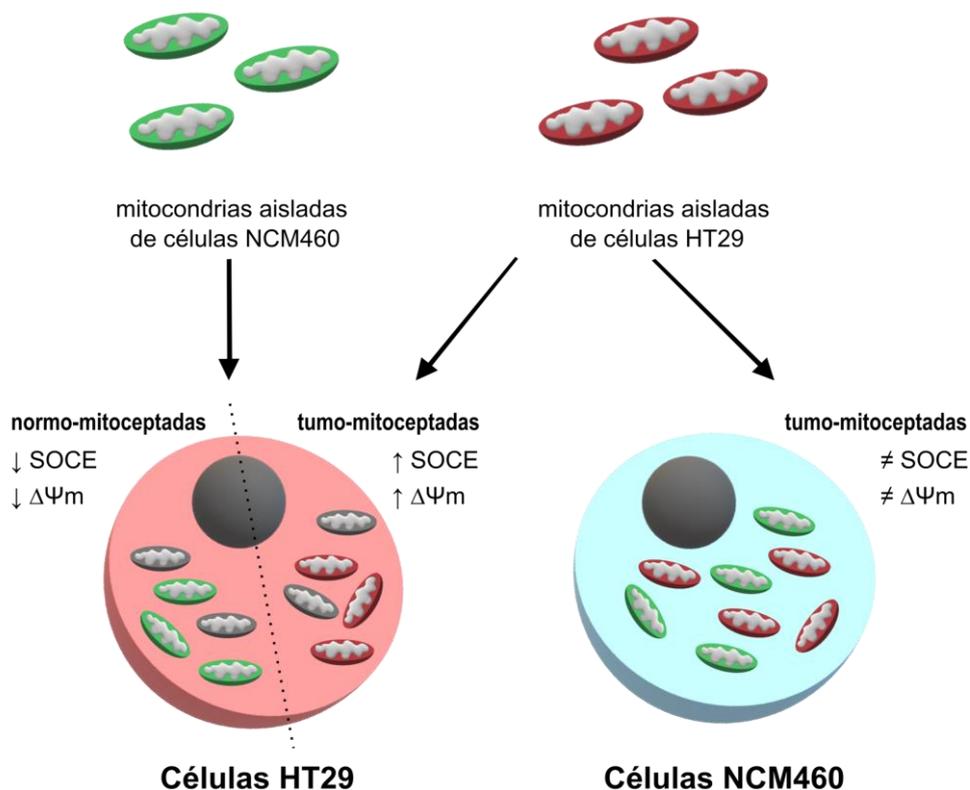


Figura 75. Resumen del efecto de la transferencia mitocondrial sobre SOCE en células HT29 y NCM460. La transferencia de mitocondrias aisladas sobre células HT29 tiene efectos diferentes según la procedencia de las mitocondrias: si las mitocondrias proceden de células NCM460, tanto SOCE como el potencial mitocondrial se reducen. Sin embargo, si las mitocondrias proceden de células HT29, se observa un aumento del potencial mitocondrial y de SOCE en las células tumo-mitoceptadas. El efecto de la transferencia de mitocondrias tumorales también depende de la célula receptora ya que, en células NCM460 tumo-mitoceptadas, no se observan diferencias ni en SOCE ni en el potencial mitocondrial con respecto a las células NCM460 utilizadas como control.

Durante los estudios de aislamiento y transferencia mitocondrial observamos que la masa de mitocondrias en las células tumorales era tres veces mayor que la masa en células normales. No obstante, no podemos determinar qué porcentaje de estas mitocondrias es funcional. Los procesos de biogénesis mitocondrial pueden estar influenciados por la actividad de ciertos oncogenes y supresores tumorales (Boland *et al.*, 2013). El oncogén *c-Myc* puede estimular la biogénesis mitocondrial a través de la inducción de PGC-1 β (Li *et al.*, 2005), mientras que el supresor tumoral p53 reprime la transcripción de PGC-1 α (Sahin *et al.*, 2011). Tanto PGC-1 α como PGC-1 β actúan como co-activadores de PPAR- γ , un cofactor de transcripción nuclear que promueve la biogénesis mitocondrial (Scarpulla *et al.*, 2012). Por lo tanto, es lógico pensar que, en células tumorales, donde hay una activación de oncogenes e inactivación de represores tumorales, se induzca la biogénesis mitocondrial, dando lugar a una mayor masa mitocondrial.

Por otra parte, debido a su actividad metabólica, las mitocondrias producen ROS que pueden modular SOCE mediante la inactivación de los canales Orai (Ben-Kasus Nissim *et al.*, 2017). En las células tumorales HT29, hay una mayor expresión de NCLX que evita la sobrecarga de Ca²⁺ en la mitocondria, por lo que la producción de ROS sería menor y no se inactivarían los canales Orai por este mecanismo, promoviendo SOCE en las células tumorales (Villalobos *et al.*, 2018). La producción de ROS en las células mitoceptadas no ha sido estudiada, pero sería otro punto importante a tener en cuenta, así como la actividad metabólica en estas células. Ambos procesos podrían estar alterados en las células mitoceptadas y tener efecto sobre alguno de los *hallmarks* que caracterizan los procesos tumorales.

En cualquier caso, los resultados muestran que la transferencia de mitocondrias de unas células a otras (mitocepción), un proceso que puede ocurrir en condiciones fisiológicas puede revertir parcialmente el fenotipo tumoral, al menos de forma temporal. Se necesitan más estudios para poder determinar los efectos de las mitocondrias sobre las células receptoras y la duración de los mismo. No obstante, estos resultados abren un gran interrogante acerca de una posible terapia mitocondrial. La reversión parcial del fenotipo tumoral podría aumentar la eficacia de algún tratamiento farmacológico. De ser así, estaríamos hablando de una nueva terapia mitocondrial frente al cáncer.

2. Papel de TRPC1 en la modulación de la entrada capacitativa de Ca^{2+} en las células tumorales HT29

Aparte de las mitocondrias, nuestro grupo ha propuesto al canal TRPC1 como actor fundamental en el aumento de SOCE en células de CCR debido, fundamentalmente, a su expresión aumentada en las células tumorales, la ausencia de corrientes en las células normales y la pérdida de las corrientes en células tratadas con DFMO (Hernández-Morales *et al.*, 2017). Además, el posible papel de la entrada de Na^+ en la extrusión de Ca^{2+} mitocondrial sugería que TRPC1 podría prevenir la inactivación de los canales Orai1 en las células tumorales. Por ello, uno de los objetivos de esta tesis fue tratar de eliminar TRPC1 en las células tumorales y estudiar su efecto sobre SOCE.

Los primeros estudios situaban a TRPC1 como canal SOC responsable de la entrada de Ca^{2+} activada por el vaciado de depósitos (Wes *et al.*, 1995). Más adelante se demostró que TRPC1 no era el responsable principal de SOCE, sino que lo era Orai1 (Feske *et al.*, 2006). Sin embargo, en ciertos tipos celulares TRPC1 contribuye a la entrada de Ca^{2+} vía SOCE en combinación con STIM1 y Orai1 (Cheng *et al.*, 2011). Resultados previos del grupo correlacionan el aumento de SOCE en las células de adenocarcinoma de colon HT29 con el aumento en la expresión de TRPC1 (Sobradillo *et al.*, 2014). En las células de colon normales NCM460, SOCE se compone de una corriente I_{CRAC} mediada por Orai1, mientras que en las células tumorales HT29, la entrada de Ca^{2+} vía SOCE es una combinación de corriente I_{CRAC} y una corriente no selectiva I_{SOC} , mediada por Orai1 y el canal TRPC1 (Sobradillo *et al.*, 2014). El papel concreto de la contribución de TRPC1 al aumento de SOCE en las células de CCR aún no es claro, pero la modulación de este canal podría revertir el remodelado de la homeostasis del Ca^{2+} en CCR y otros tipos de cáncer (Villalobos *et al.*, 2019). Por ello, es posible que el canal TRPC1 tenga un papel relevante en la entrada de Ca^{2+} vía SOCE en las células tumorales específicamente, lo que le convertiría en una posible diana antitumoral.

Para ver la contribución de TRPC1 en SOCE eliminamos el canal mediante edición génica utilizando el sistema CRISPR/Cas9. Éste fue un trabajo bastante laborioso en el que comenzamos con la delección de los exones 8 y 9 del canal (no se muestran los resultados en la tesis) basándonos en estudios donde se había generado un ratón TRPC1 KO (Dietrich *et al.*, 2007). Sin embargo, esta estrategia no dio resultados, por lo que se decidió atacar una región mayor del genoma de TRPC1 que incluyese el poro

del canal. Para ello, editamos los últimos exones del canal TRPC1 (exones del 10 al 13) donde estaba localizado el poro del canal, intercambiando este fragmento de la secuencia genómica por un casete de resistencia a blasticidina que nos permitiese seleccionar las células editadas. Este fragmento fue eliminado, aunque el resto del canal seguía presente y obteníamos una proteína del mismo tamaño que la proteína WT. Sería necesario comprobar mediante *patch-clamp* si el canal editado es o no conductor de la corriente TRPC. La eliminación del poro de TRPC1 no tuvo efectos sobre la entrada de Ca^{2+} vía SOCE ni sobre la proliferación celular, lo que indica que el aumento de la entrada de Ca^{2+} vía SOCE que se observa en las células HT29 no se produce directamente a través del canal TRPC1.

Los estudios previos han atribuido al canal TRPC1 la corriente no selectiva de Ca^{2+} I_{SOC} . Sin embargo, no se han descrito corrientes mediadas únicamente por este canal, sin interacción con otros, por lo que el mecanismo exacto por el que TRPC1 contribuye a la entrada de Ca^{2+} no es claro (Ambudkar *et al.*, 2017). Se han propuesto modelos donde TRPC1 por sí solo no es suficiente para formar un canal, sino que forma heterómeros con otros miembros de la familia TRPC como TRPC4 o TRPC5 en combinaciones TRPC1-TRPC4, TRPC1-TRPC5 o TRPC1-TRPC4-TRPC5. Se ha propuesto que estos heterómeros sí pueden mediar la entrada de Ca^{2+} (Elzamzamy *et al.*, 2020). Nótese que todas estas combinaciones presentan TRPC1 por lo que la eliminación de la actividad de TRPC1 debería, en principio, eliminar la actividad de estos canales. Sin embargo, cabría la posibilidad de que, incluso eliminando el poro de TRPC1, los heterómeros presenten actividad de canal. Por lo tanto, se hacen necesarios estudios futuros de electrofisiología para determinar la función y actividad del canal.

Estudiamos la entrada de Ca^{2+} vía SOCE en células NCM460 y HT29 tratadas con Pico145, un inhibidor específico de los canales TRPC1/4/5 que actúa a concentraciones muy bajas (Rubaiy *et al.*, 2017). No observamos efecto alguno sobre SOCE con Pico145 10 nM, aunque a concentraciones 10 veces superiores (100 nM) SOCE disminuye significativamente tanto en células tumorales HT29 como en células normales NCM460.

Los estudios de las corrientes mediadas por canales TRPC llevaron a resultados similares. Tal como se había descrito previamente, las corrientes eran mayores en células tumorales HT29 que en las células normales NCM460. Además, solo a concentraciones notablemente altas de Pico145 (200 nM) se observó una inhibición parcial de las corrientes. Este efecto era bastante variable y solo se observó en una

fracción de células. Por lo tanto, o bien Pico145 no es específico, o los canales de las células HT29 no son sensibles al inhibidor. Para comprobarlo, se podrían realizar, por ejemplo, experimentos de expresión del canal TRPC1 en células HEK para comprobar la especificidad del compuesto Pico145. Los resultados del estudio de TRPC1, tanto con la edición génica del canal, como con la inhibición farmacológica, no muestran un papel claro de esta proteína en la entrada de Ca^{2+} activada por el vaciado de los depósitos, por lo que serán necesarios más estudios para poder determinar el papel exacto de TRPC1 en SOCE y la homeostasis del Ca^{2+} de las células tumorales.

Diferentes estudios con TRPC1 apoyan la teoría de que no forma un canal por sí mismo, sino que modula otros canales de la familia TRPC, ya que no se observaron diferencias en las corrientes de células transfectadas con TRPC1 y otras transfectadas con un vector vacío, en la entrada de Ca^{2+} en células procedentes del ratón TRPC1-KO (Kim *et al.*, 2019). De hecho, también existen estudios que indican que la expresión de TRPC1 y la formación de heterómeros con otros canales de la familia TRPC puede reducir la permeabilidad de Ca^{2+} en estos canales (Storch *et al.*, 2012), y que su regulación puede estar controlada por la activación de la PLC de la membrana a través de diferentes subunidades de los GPCR (Myeong *et al.*, 2018). Además, persisten muchas dudas acerca de la especificidad y calidad de los anticuerpos utilizados para la detección de TRPC1 (Dietrich *et al.*, 2014) y la falta de herramientas específicas para el estudio esta proteína (Kim *et al.*, 2019). Por lo tanto, el papel de TRPC1 tanto en homeostasis del Ca^{2+} no queda muy claro y no se sabe muy bien si TRPC1 forma parte del canal o bien actúa como subunidad reguladora de otros canales.

3. Papel de otros sistemas de transporte en el remodelado de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en células tumorales HT29 inducido por poliaminas

Está claro que en el CCR existe un remodelado de la homeostasis del Ca^{2+} y más concretamente de la entrada operada por depósitos. Estudios previos del grupo reportaron que el DFMO, un inhibidor de la ODC, la enzima limitante de la vía de biosíntesis de poliaminas, revierte el remodelado de los canales SOC y SOCE en células de CCR (Gutiérrez *et al.*, 2019). Concretamente, DFMO aumenta el contenido en Ca^{2+} de los depósitos y disminuye SOCE en células HT29, además de suprimir la corriente I_{SOC} mediada por TRPC1. A nivel molecular, DFMO reduce la expresión de TRPC1 y STIM1 en células HT29 (Gutiérrez *et al.*, 2019). Estos resultados sugieren que las

poliaminas tienen un papel importante en el remodelado del Ca^{2+} en CCR y que su depleción podría revertirlo. Por ello, se investigó más a fondo el papel de las poliaminas en CCR en relación con el Ca^{2+} . Se llevó a cabo un estudio transcriptómico para ver qué ocurría con la expresión de diferentes moléculas relacionadas con el transporte de Ca^{2+} . Observamos que, entre otros, cuatro miembros de la superfamilia de canales TRP y dos bombas encargadas de retirar Ca^{2+} del citoplasma se encontraban diferencialmente expresados en las células tumorales y que la depleción de poliaminas con DFMO revertía la expresión diferencial. Por tanto, este análisis transcriptómico reveló una serie de moléculas relacionadas con el transporte candidatas a contribuir al remodelado de la homeostasis del Ca^{2+} en cáncer de un modo dependiente de poliaminas. Estos genes candidatos se corresponden con las proteínas TRPC5, TRPV6, TRPP1, TRPP2, PMCA4 y SPCA2. También se observó una expresión diferencial tumoral que se revierte con DFMO en las proteínas reguladoras ORMDL3 y SEPTINA6, moduladoras de los canales Orai, así como las proteínas mitocondriales VDAC3 y MCU, principales responsables de la captación de Ca^{2+} mitocondrial.

Para confirmar los datos anteriores procedentes del análisis transcriptómico, se llevó a cabo un estudio basado en qPCR y silenciamiento génico. Los datos indicaron una expresión diferencial de los genes que codifican para VDAC3, TRPV6, TRPP1, SPCA2 y PMCA4 en células HT29 en comparación con células NCM460, y esta expresión diferencial se revertía con el tratamiento con DFMO de las células tumorales. Se estudiaron por separado alguno de ellos para ver su contribución en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. Concretamente, se estudiaron TRPV6 y SPCA2.

TRPV6 tiene una alta selectividad por el Ca^{2+} en comparación con el resto de los canales de su misma subfamilia. TRPV6 se expresa predominantemente en el tracto gastrointestinal donde se encarga de introducir Ca^{2+} a la célula (Stewart, 2020). Se ha descrito una sobreexpresión de TRPV6 en los primeros estadios del CCR y su inhibición parece reducir la proliferación en células de carcinoma de colon (Peleg *et al.*, 2010). Se estudió el papel de TRPV6 en el CCR mediante el silenciamiento en células HT29 utilizando siRNA. La disminución de la expresión de TRPV6 por debajo del 50% no alteró los niveles basales de Ca^{2+} , pero provocó un aumento significativo de la entrada de Ca^{2+} vía SOCE en las células tumorales HT29, sin modificar el nivel de llenado de los depósitos. La interpretación de estos resultados no es sencilla. Una posibilidad es que el silenciamiento de TRPV6 en las células HT29 contribuye a que los niveles de Ca^{2+} citosólico en las células siTRPV6 sean menores a nivel local y, por lo tanto, se prevenga

la inactivación de SOCE dependiente de Ca^{2+} , lo que concuerda con el aumento de la entrada por esta vía. Es decir, la entrada de Ca^{2+} a través de TRPV6 rápidamente puede inactivar los canales SOC, por lo que la disminución de la expresión de TRPV6, reduce esta entrada y, por lo tanto, previene la inactivación de los canales. Sin embargo, esto nos deja la duda de por qué TRPV6 está sobreexpresado en CCR. En células de cáncer de próstata se ha visto que la entrada de Ca^{2+} a través de STIM1/Orai1/TRPC1 promueve la translocación a la MP de TRPV6, contribuyendo al aumento del Ca^{2+} citosólico y a un fenotipo más agresivo (Raphaël *et al.*, 2014). En el caso del CCR, los niveles de SOCE son elevados debido al aumento de varias moléculas implicadas en el proceso (Sobradillo *et al.*, 2014), lo que provocaría el aumento de la expresión de TRPV6. Al silenciar este canal, las células de CCR podrían compensar esta pérdida con el aumento en la entrada de Ca^{2+} vía SOCE. Sería interesante estudiar qué ocurre en las células HT29 siTRPV6 con la expresión del resto de transportadores de Ca^{2+} y, más concretamente, con aquellos implicados en SOCE. Son necesarios estudios posteriores para determinar el papel de TRPV6 en el remodelado de la homeostasis del Ca^{2+} en CCR y más concretamente en SOCE.

SPCA2, la ATPasa de la vía secretora de Ca^{2+} , es otro de los transportadores diferencialmente expresados en cáncer que revertía su expresión diferencial con el tratamiento con DFMO. Esta ATPasa se encarga de retirar Ca^{2+} del citoplasma hacia el interior de Golgi, pero también se ha relacionado con la activación de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales Orai1 de un modo independiente del estado de los depósitos. Para ver su contribución en la homeostasis de Ca^{2+} en células tumorales HT29, disminuimos su expresión utilizando siRNA. Observamos que las células HT29 siSPCA2 presentaban un menor nivel de llenado de Ca^{2+} en los depósitos consistentemente con su papel como bomba de Ca^{2+} . Sin embargo, estas células silenciadas presentaban también paradójicamente un aumento en la entrada de Ca^{2+} vía SOCE. SPCA2 es el transportador encargado de retirar Ca^{2+} del citoplasma e introducirlo al lumen de Golgi. La sobreexpresión de SPCA2 en cáncer puede reducir los niveles de Ca^{2+} citoplasmático, de manera que previene la inactivación dependiente de Ca^{2+} de SOCE. Por otra parte, SPCA2 puede activar la entrada de Ca^{2+} a través de Orai1 independientemente del nivel de llenado de los depósitos. Por lo tanto, una mayor expresión de SPCA2 en las células puede estar provocando una mayor entrada de Ca^{2+} vía SICE, de manera que los niveles de Ca^{2+} citosólico se elevan, pero, a su vez SPCA2 retira Ca^{2+} del citoplasma hacia el interior de Golgi y previene la inactivación dependiente de Ca^{2+} de los canales implicados en SOCE. Estudios en cáncer de mama indican que

un aumento de la expresión de SPCA2 aumenta el contenido de Ca^{2+} en los depósitos que no son retículo endoplásmico (Smaardijk *et al.*, 2017), por lo que cabe pensar que la menor expresión de SPCA2, reduce el contenido de Ca^{2+} de estos depósitos. En células de mamíferos se ha descrito un compartimento intermedio entre el RE y Golgi, denominado ERGIC (del inglés *ER-Golgi intermediate compartment*) a través del cual se puede producir un tráfico de proteínas entre ambos compartimentos (Appenzeller-Herzog and Hauri, 2006). Puede que el efecto que estamos viendo en las células HT29 al silenciar SPCA2 en relación con el tamaño de los depósitos se deba a una inhibición inespecífica del CPA, que esté provocando un vaciado tanto del RE como de otros compartimentos – ERGIC, Golgi – cuyo contenido en Ca^{2+} es menor debido al silenciamiento de SPCA2. También es posible que este tráfico de proteínas (y puede que Ca^{2+}) entre RE y Golgi altere los niveles de Ca^{2+} en el RE en favor de Golgi. Quizás el silenciamiento de SPCA2 provoque cambios en la expresión de otras proteínas relacionadas con el contenido en Ca^{2+} de los depósitos como SERCA o receptores de IP_3 y la reducción del tamaño de los depósitos se deba a una desregulación de estas proteínas como consecuencia del silenciamiento de SPCA2. No se sabe bien por qué el silenciamiento de SPCA2 en las células HT29 provoca una disminución del contenido de Ca^{2+} en los depósitos que puede ser la responsable del aumento de SOCE en las células HT29 siSPCA2.

Serían necesarios más estudios para esclarecer el papel de cada una de las moléculas diferencialmente expresadas en células HT29 en relación con la homeostasis del Ca^{2+} y el papel que juegan las poliaminas en su expresión y, en relación, en el control del remodelado en CCR. El tratamiento con DFMO revierte la expresión de varios genes relacionados con el transporte de Ca^{2+} , pero su papel por separado aún no es claro. Para profundizar más en la reversión del remodelado del Ca^{2+} intracelular en CCR, nos planteamos estudiar su inhibición en otro modelo celular de cáncer de colon, las células SW480. En estas células observamos unos niveles de poliaminas significativamente mayores que en las células HT29, los cuales se reducen drásticamente tras el tratamiento durante 96 horas con DFMO 5 mM. Por lo tanto, SW480 puede constituir un buen modelo celular para el estudio del papel de las poliaminas, y su depleción, en el fenotipo tumoral y el remodelado del Ca^{2+} intracelular asociado.

De un modo similar a lo que ocurría en las células HT29 descrito previamente por nuestro grupo (Gutiérrez *et al.*, 2019), la inhibición de la síntesis de poliaminas en células SW480 mediante el tratamiento con DFMO, aumentó el contenido de Ca^{2+} de los

depósitos de las células tumorales hasta niveles similares a los de las células normales NCM460. Sin embargo, el tratamiento con DFMO no tuvo efecto sobre la entrada de Ca^{2+} vía SOCE en las células SW480, lo que sugiere que las poliaminas no son las responsables directas del aumento de SOCE en las células tumorales SW480. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales a diferentes tiempos y concentraciones de DFMO para confirmar esta posibilidad. Se estudió la expresión de algunos de los genes relacionados con el remodelado del Ca^{2+} y su reversión por DFMO también en las células SW480. Los resultados mostraron que los transportadores SPCA2, TRPC5, TRPP1 y TRPV6 se encontraban sobreexpresados en las células tumorales SW480. La depleción de poliaminas con DFMO redujo la expresión de todos ellos salvo TRPC5. Estos resultados son muy similares a los obtenidos en células HT29 y sugieren que la expresión diferencial en células tumorales de TRPV6 y SPCA2, además de TRPP1, está determinada por el exceso de poliaminas.

Aunque TRPC5 no parece modulado por poliaminas (DFMO no induce cambios en sus niveles de expresión) este canal está sobreexpresado en las células tumorales SW480. TRPC5, al igual que TRPC4, puede estar modulado por TRPC1 y contribuir a la entrada de Ca^{2+} vía SOCE (Kim *et al.*, 2019; Myeong *et al.*, 2018), por lo que la mayor expresión de TRPC5 puede dar lugar a una mayor entrada de Ca^{2+} . Algo similar ocurre con TRPV6. Sin embargo, la expresión de este canal depende fuertemente de la presencia de poliaminas al igual que SPCA2. Concluimos que la expresión de TRPV6 y SPCA2 está regulada por poliaminas y ambas moléculas pueden contribuir al remodelado de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular a nivel de llenado de los depósitos y SOCE aunque sus efectos moduladores deben ser aclarados mediante estudios posteriores.

4. Remodelado de los canales de K^+ en células tumorales y reversión por la depleción de poliaminas

La homeostasis del Ca^{2+} intracelular no está determinada solo por los sistemas de transporte de Ca^{2+} . Los sistemas de transporte de K^+ son también determinantes para, por ejemplo, fijar el potencial de membrana en reposo de las células (Comes *et al.*, 2015), esencial para el mantenimiento de la fuerza electromotriz para la entrada de Ca^{2+} al citosol. La entrada de Ca^{2+} vía SOCE viene determinada no solo por la actividad de canales Orai1 regulados por la interacción con Stim1 y/o TRPC1, sino que ciertos

canales de K⁺ como los canales SK3 pueden formar parte también del complejo multiproteico (Guéguinou *et al.*, 2016; Tiffner *et al.*, 2023) y contribuir al remodelado del Ca²⁺ intracelular y los *hallmarks* del cáncer. Por ello, en esta tesis se investigaron las corrientes de K⁺ en células normales NCM460 y células tumorales HT29 y su posible modulación por poliaminas. Además, se ha relacionado la sobreexpresión de algunos canales como Kv10.1 y Kv11.1 con oncogénesis y desarrollo tumoral (Gómez-Varela *et al.*, 2007; Lastraioli *et al.*, 2004). Los resultados mostraron que las células tumorales presentaban una corriente total de K⁺ significativamente menor que las células normales. Estos resultados son consecuentes con el estudio transcriptómico llevado a cabo con las células HT29 y NCM460 donde se observó la menor expresión de una quinta parte de los canales de K⁺ estudiados en las células tumorales HT29 en comparación con las células normales NCM460.

Al aislar las corrientes de los canales Kv10.1 (hEAG1) y Kv11.1 (hERG1) utilizando el bloqueante astemizol, se observó una corriente significativamente mayor en las células tumorales HT29 en comparación con las células normales NCM460, lo que indica que la contribución de estos dos tipos de canales a la corriente total de K⁺ es cercana al 50% en las células tumorales y muy poco significativa en las células normales. Sin embargo, la expresión del canal Kv11.1 o hERG, codificado por el gen *KCNH2*, es menor en las células HT29 según el estudio transcriptómico. No tenemos datos suficientes para saber qué ocurre con la expresión del resto de canales de la familia EAG en las células HT29 y NCM460. Estos canales podrían ser los responsables de la mayor corriente observada en las células HT29. Tampoco podemos asegurar la especificidad del bloqueante astemizol en nuestras células de estudio.

Por otra parte, se ha descrito que las poliaminas pueden regular diferentes canales de K⁺, como los canales Kir. Las poliaminas pueden bloquear estos canales través de cambios en el potencial de membrana (Nichols and Lee, 2018). También se ha visto que las poliaminas son esenciales en la restitución epitelial, mediante la regulación de canales de la subfamilia Kv importantes en procesos de migración celular y que el tratamiento con DFMO reduce la migración celular (Wang *et al.*, 2000). Por lo tanto, estudiamos el efecto de la inhibición de la síntesis de poliaminas sobre las corrientes de K⁺ en las células HT29. El tratamiento con DFMO induce el aumento de la corriente total de K⁺ en las células HT29 hasta valores similares a los observados en las células NCM460. Es decir, la inhibición de la síntesis de poliaminas revierte el fenotipo tumoral en términos de corriente total de K⁺. Además, el aumento de corriente se debe al

aumento de las corrientes sensibles a astemizol, es decir las corrientes Kv10.1 y Kv11.1. Esto invita a especular que, quizás, la disminución de la corriente total en las células tumorales sea debida a la regulación negativa de las corrientes Kv10.1 y Kv11.1 a través de un mecanismo dependiente de poliaminas.

A nivel transcriptómico, el tratamiento con DFMO de las células tumorales HT29 moduló la expresión únicamente de seis genes de los cerca de 90 genes de canales de K⁺ estudiados. La expresión de los genes *KCNV2*, *KCNJ3*, *KCNK1* y *KCNE3* se vio aumentada, mientras que en los genes *KCNN4* y *KCNK6* disminuyó la expresión tras el tratamiento con DFMO. Sólo dos de ellos, *KCNJ3* y *KCNK1*, que codifican para los canales Kir3.1 (o GIRK1) y K2P6.1, respectivamente, revierten su expresión diferencial tumoral tras el tratamiento. Estos datos sugieren que el aumento en la corriente de Kv10.1 y Kv11.1 inducido por la inhibición de la síntesis de poliaminas podría deberse a los cambios en la expresión de estos genes. Sin embargo, la sobreexpresión del canal GIRK1 se ha asociado al desarrollo y progresión en estudios con células de cáncer de mama (Pelzmann et al., 2022; Schratte et al., 2019) e incluso se ha propuesto como biomarcador (Kammerer et al., 2016). Algo similar ocurre con el gen *KCNK1*, sobreexpresado en varios tipos de cáncer y utilizado como marcador del pronóstico de la patología (Lin et al., 2020; Sun et al., 2023; Zou et al., 2022), y con el gen *KCNE3*, que codifica una subunidad reguladora de canales Kv, cuya expresión se ha visto aumentada en tumores sólidos (Biasiotta et al., 2016; Li et al., 2021).

El aumento de la corriente de K⁺ observado en las células HT29 tras el tratamiento con DFMO, concretamente el aumento de las corrientes de Kv10.1 y Kv11.1, y los resultados del análisis transcriptómico en estas células parecen no ser concordantes. Podríamos relacionar el aumento de la corriente en estos dos canales con una mayor expresión de los canales de K⁺ codificados por los genes *KCNV2*, *KCNJ3*, *KCNK1* y *KCNE3*. En otras palabras, la pérdida de corriente total de K⁺ en células HT29 asociada al exceso de poliaminas en el tumor podría deberse a la pérdida de actividad de canales Kv10.1 y Kv11.1 mediada por la expresión de otros canales de K⁺. Sin embargo, estos resultados preliminares necesitan ser confirmados con experimentos adicionales. Además, es necesario confirmar que el bloqueante utilizado para aislar las corrientes Kv10.1 y Kv11.1, astemizol, inhibe específicamente la actividad de estos dos canales y no otros, y que tiene efecto sobre nuestras células de estudio. También sería interesante comprobar si la expresión mostrada por los análisis transcriptómicos se corresponde

con un aumento o disminución de la expresión a nivel de proteína de los canales de K^+ diferencialmente expresados.

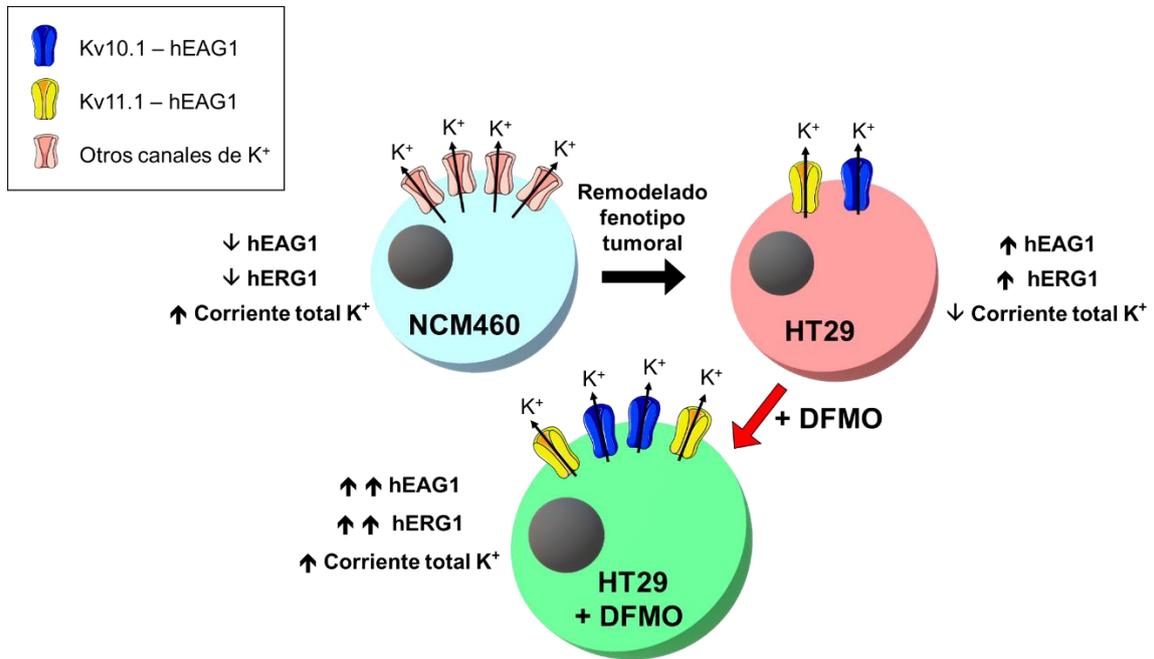


Figura 76. Resumen del efecto de la depleción de poliaminas sobre las corrientes de K^+ en células HT29. Las células normales NCM460 tienen una mayor corriente de K^+ total que las células tumorales HT29. Sin embargo, las células tumorales tienen mayor corriente mediada por los canales hEAG1 y hERG1. El tratamiento con DFMO aumenta la corriente total de K^+ y la corriente mediada por hEAG1 y hERG1 en células HT29.

Estos resultados dejan abierta una nueva vía de estudio en la reversión del fenotipo tumoral mediante la depleción de la síntesis de poliaminas en relación con la homeostasis iónica en el cáncer. A lo largo de todo este proyecto de tesis se han abordado diferentes estrategias para conocer mejor el remodelado del Ca^{2+} intracelular que se produce en el CCR y buscar dianas para su reversión hacia un fenotipo menos tumoral. Una de las estrategias más prometedoras es la transferencia de mitocondrias sanas a células tumorales para disminuir la entrada de Ca^{2+} vía SOCE y tratar de disminuir características tumorales. En este caso serían necesarios estudios para comprobar la permanencia de las mitocondrias exógenas en el receptor y abordar nuevas vías de transferencia. La inhibición de la síntesis de poliaminas también presenta un gran potencial como estrategia moduladora del remodelado en el CCR, no solo de la homeostasis del Ca^{2+} sino también de la del K^+ .

CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un método simple para transferir eficazmente mitocondrias (mitocepción) de una célula donadora a una célula receptora y estudiar el impacto de la transferencia sobre el fenotipo celular resultante.
2. La mitocepción de células tumorales HT29 con mitocondrias aisladas de células normales NCM460 reduce la entrada de Ca^{2+} vía SOCE. Sin embargo, SOCE aumenta si las células HT29 son mitoceptadas con mitocondrias tumorales. Los efectos son significativos a las 3 h de la mitocepción, alcanzan su máximo a las 48 h, y desaparecen en una semana. Estos cambios se relacionan con cambios en el potencial mitocondrial, más positivo cuando las mitocondrias transferidas son aisladas de células normales, y más negativo cuando proceden las mitocondrias transferidas se aíslan de células tumorales.
3. La mitocepción de células normales NCM460 con mitocondrias aisladas de células tumorales HT29 no produce cambios ni en el potencial mitocondrial ni en la entrada de Ca^{2+} vía SOCE de las células normales de colon.
4. La eliminación génica del canal TRPC1 no tiene efecto sobre SOCE ni sobre la proliferación en células HT29. La inhibición farmacológica de TRPC1 con el antagonista selectivo Pico145 tampoco tiene un efecto claro sobre SOCE ni sobre las corrientes TRPC en células HT29 y NCM460.
5. La inhibición de la síntesis de poliaminas con DFMO revierte la expresión diferencial de diferentes sistemas de transporte de Ca^{2+} codificados por TRPC5, TRPP1, TRPV6 y SPCA2 en las células HT29 y SW480.
6. El silenciamiento del canal TRPV6 aumenta SOCE en células tumorales HT29, mientras que el silenciamiento de la bomba SPCA2 disminuye el Ca^{2+} de los depósitos y aumenta SOCE en las mismas células, por lo que ambos sistemas de transporte podrían contribuir al remodelado de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en el cáncer colorrectal de un modo dependiente de poliaminas.
7. Existe un remodelado en los canales de K^+ en el cáncer colorrectal. A nivel electrofisiológico, las células tumorales HT29 presentan una corriente de K^+ total menor que las células normales NCM460. Sin embargo, la corriente mediada por los canales Kv10.1 y Kv11.1, vinculados al cáncer, es mayor en las células tumorales

HT29. Consistentemente, se observa una expresión diferencial de genes de canales de K⁺ entre células normales NCM460 y tumorales HT29.

8. La depleción de poliaminas con DFMO aumenta significativamente la corriente total de K⁺ en células HT29, un efecto asociado al aumento de la actividad de los canales Kv10.1 y Kv11.1 que podría asociarse a cambios en la expresión de KCNV2 y KCNE3.

REFERENCIAS

Ahmed, D., Eide, P.W., Eilertsen, I.A., Danielsen, S.A., Eknæs, M., Hektoen, M., Lind, G.E., Lothe, R.A., 2013. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* 2, e71–e71. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.35>

Albarran, L., Regodón, S., Salido, G.M., Lopez, J.J., Rosado, J.A., 2017. Role of STIM1 in the surface expression of SARAF. *Channels* 11, 84–88. <https://doi.org/10.1080/19336950.2016.1212141>

Al-Khannaq, M., Lytton, J., 2023. Regulation of K⁺-Dependent Na⁺/Ca²⁺-Exchangers (NCKX). *International Journal of Molecular Sciences* 24, 598. <https://doi.org/10.3390/ijms24010598>

Alshaer, W., Zureigat, H., Al Karaki, A., Al-Kadash, A., Gharaibeh, L., Hatmal, M.M., Aljabali, A.A.A., Awidi, A., 2021. siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches. *Eur J Pharmacol* 905, 174178. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174178>

Alway, S.E., Paez, H.G., Pitzer, C.R., Ferrandi, P.J., Khan, M.M., Mohamed, J.S., Carson, J.A., Deschenes, M.R., 2023. Mitochondria transplant therapy improves regeneration and restoration of injured skeletal muscle. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 14, 493. <https://doi.org/10.1002/jcsm.13153>

Ambudkar, I.S., de Souza, L.B., Ong, H.L., 2017. TRPC1, Orai1, and STIM1 in SOCE: Friends in tight spaces. *Cell Calcium* 63, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.12.009>

Antigny, F., Sabourin, J., Saüc, S., Bernheim, L., Koenig, S., Frieden, M., 2017. TRPC1 and TRPC4 channels functionally interact with STIM1L to promote myogenesis and maintain fast repetitive Ca²⁺ release in human myotubes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864, 806–813. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.02.003>

Appenzeller-Herzog, C., Hauri, H.-P., 2006. The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J Cell Sci* 119, 2173–2183. <https://doi.org/10.1242/jcs.03019>

Archer, S.L., 2013. Mitochondrial dynamics--mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N Engl J Med* 369, 2236–2251. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1215233>

Armaghany, T., Wilson, J.D., Chu, Q., Mills, G., 2012. Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastrointestinal Cancer Research : GCR* 5, 19.

Aung, C.S., Ye, W., Plowman, G., Peters, A.A., Monteith, G.R., Roberts-Thomson, S.J., 2009. Plasma membrane calcium ATPase 4 and the remodeling of calcium homeostasis in human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 30, 1962–1969. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp223>

Bachmann, A.S., Geerts, D., 2018. Polyamine synthesis as a target of MYC oncogenes. *J Biol Chem* 293, 18757–18769. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003336>

Badaoui, M., Mimsy-Julienne, C., Saby, C., Van Gulick, L., Peretti, M., Jeannesson, P., Morjani, H., Ouadid-Ahidouch, H., 2017. Collagen type 1 promotes survival of human breast cancer cells by overexpressing Kv10.1 potassium and Orai1 calcium channels through DDR1-dependent pathway. *Oncotarget* 9, 24653–24671. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19065>

Banerjee, S., Hasan, G., 2005. The InsP3 receptor: its role in neuronal physiology and neurodegeneration. *BioEssays* 27, 1035–1047. <https://doi.org/10.1002/bies.20298>

Barker, N., Clevers, H., 2006. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 5, 997–1014. <https://doi.org/10.1038/nrd2154>

Barros, F., de la Peña, P., Domínguez, P., Sierra, L.M., Pardo, L.A., 2020. The EAG Voltage-Dependent K⁺ Channel Subfamily: Similarities and Differences in Structural Organization and Gating. *Front Pharmacol* 11, 411. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00411>

Bauer, C.K., Schwarz, J.R., 2018. Ether-à-go-go K⁺ channels: effective modulators of neuronal excitability. *J Physiol* 596, 769–783. <https://doi.org/10.1113/JP275477>

Becchetti, A., Arcangeli, A., 2010. Integrins and Ion Channels in Cell Migration: Implications for Neuronal Development, Wound Healing and Metastatic Spread, in: Becchetti, A., Arcangeli, A. (Eds.), *Integrins and Ion Channels: Molecular Complexes and Signaling*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, New York, NY, pp. 107–123. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6066-5_10

Becchetti, A., Crescioli, S., Zanieri, F., Petroni, G., Mercatelli, R., Coppola, S., Gasparoli, L., D'Amico, M., Pillozzi, S., Crociani, O., Stefanini, M., Fiore, A., Carraresi, L., Morello, V., Manoli, S., Brizzi, M.F., Ricci, D., Rinaldi, M., Masi, A., Schmidt, T., Quercioli, F., Defilippi, P., Arcangeli, A., 2017. The conformational state of hERG1 channels determines integrin association, downstream signaling, and cancer progression. *Sci Signal* 10, eaaf3236. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf3236>

Begum, H.M., Shen, K., 2023. Intracellular and microenvironmental regulation of mitochondrial membrane potential in cancer cells. *WIREs Mechanisms of Disease* 15, e1595. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1595>

Ben-Kasus Nissim, T., Zhang, X., Elazar, A., Roy, S., Stolwijk, J.A., Zhou, Y., Motiani, R.K., Gueguinou, M., Hempel, N., Hershfinkel, M., Gill, D.L., Trebak, M., Sekler, I., 2017. Mitochondria control store-operated Ca²⁺ entry through Na⁺ and redox signals. *The EMBO Journal* 36, 797–815. <https://doi.org/10.15252/embj.201592481>

Bernardi, P., 1999. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79, 1127–1155. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1127>

Berridge, M.J., 2014. Module 3: Ion Channels. *Cell Signalling Biology* 6, csb0001003. <https://doi.org/10.1042/csb0001003>

Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 517–529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>

Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D., 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11–21. <https://doi.org/10.1038/35036035>

Bers, D.M., Ginsburg, K.S., 2007. Na:Ca stoichiometry and cytosolic Ca-dependent activation of NCX in intact cardiomyocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1099, 326–338. <https://doi.org/10.1196/annals.1387.060>

Bettington, M., Walker, N., Clouston, A., Brown, I., Leggett, B., Whitehall, V., 2013. The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology* 62, 367–386. <https://doi.org/10.1111/his.12055>

Beutner, G., Sharma, V.K., Giovannucci, D.R., Yule, D.I., Sheu, S.-S., 2001. Identification of a Ryanodine Receptor in Rat Heart Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 276, 21482–21488. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101486200>

Beutner, G., Sharma, V.K., Lin, L., Ryu, S.-Y., Dirksen, R.T., Sheu, S.-S., 2005. Type 1 ryanodine receptor in cardiac mitochondria: transducer of excitation-metabolism coupling. *Biochim Biophys Acta* 1717, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.09.016>

Biasiotta, A., D'Arcangelo, D., Passarelli, F., Nicodemi, E.M., Facchiano, A., 2016. Ion channels expression and function are strongly modified in solid tumors and vascular malformations. *J Transl Med* 14, 285. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1038-y>

Bielanska, J., Hernández-Losa, J., Moline, T., Somoza, R., Ramón y Cajal, S., Condom, E., Ferreres, J.C., Felipe, A., 2012. Differential expression of Kv1.3 and Kv1.5 voltage-dependent K⁺ channels in human skeletal muscle sarcomas. *Cancer Invest* 30, 203–208. <https://doi.org/10.3109/07357907.2012.654872>

Bogaert, J., Prenen, H., 2014. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol* 27, 9–14.

Boland, M.L., Chourasia, A.H., Macleod, K.F., 2013. Mitochondrial Dysfunction in Cancer. *Front Oncol* 3, 292. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00292>

Boyman, L., Williams, G.S.B., Khananshvili, D., Sekler, I., Lederer, W.J., 2013. NCLX: The Mitochondrial Sodium Calcium Exchanger. *J Mol Cell Cardiol* 59, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.03.012>

Brandman, O., Liou, J., Park, W.S., Meyer, T., 2007. STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels. *Cell* 131, 1327–1339. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.039>

Braschi, E., McBride, H.M., 2010. Mitochondria and the culture of the Borg. *Bioessays* 32, 958–966. <https://doi.org/10.1002/bies.201000073>

Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E., Soerjomataram, I., 2021. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer* 127, 3029–3030. <https://doi.org/10.1002/cncr.33587>

Brini, M., Carafoli, E., 2011. The Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase and the Plasma Membrane Sodium Calcium Exchanger Cooperate in the Regulation of Cell Calcium. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a004168. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004168>

Brini, M., Carafoli, E., 2009. Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev* 89, 1341–1378. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2008>

Brini, M., Di Leva, F., Ortega, C.K., Domi, T., Ottolini, D., Leonardi, E., Tosatto, S.C.E., Carafoli, E., 2010. Deletions and Mutations in the Acidic Lipid-binding Region of the Plasma Membrane Ca²⁺ Pump. *J Biol Chem* 285, 30779–30791. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.140475>

Brocardo, M., Näthke, I.S., Henderson, B.R., 2005. Redefining the subcellular location and transport of APC: new insights using a panel of antibodies. *EMBO Rep* 6, 184–190. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400329>

Cabrera, F., Ortega, M., Velarde, F., Parra, E., Gallardo, S., Barba, D., Soto, L., Peña, G., Pedroza, L.A., Jorgensen, C., Khoury, M., Caicedo, A., 2019. Primary allogeneic mitochondrial mix (PAMM) transfer/transplant by MitoCeption to address damage in PBMCs caused by ultraviolet radiation. *BMC Biotechnol* 19, 42. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0534-6>

Cai, X., Zhou, Y., Nwokonko, R.M., Loktionova, N.A., Wang, X., Xin, P., Trebak, M., Wang, Y., Gill, D.L., 2016. The Orai1 Store-operated Calcium Channel Functions as a Hexamer. *J Biol Chem* 291, 25764–25775. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.758813>

Caicedo, A., Fritz, V., Brondello, J.-M., Ayala, M., Dennemont, I., Abdellaoui, N., de Fraipont, F., Moisan, A., Prouteau, C.A., Boukhaddaoui, H., Jorgensen, C., Vignais, M.-L., 2015. MitoCeption as a new tool to assess the effects of mesenchymal stem/stromal cell mitochondria on cancer cell metabolism and function. *Sci Rep* 5, 9073. <https://doi.org/10.1038/srep09073>

Cantoneo, C., Sanchez-Collado, J., Gonzalez-Nuñez, M.A., Salido, G.M., Lopez, J.J., Jardin, I., Rosado, J.A., 2019. Store-independent Orai1-mediated Ca²⁺ entry and cancer. *Cell Calcium* 80, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.02.012>

Carreras-Sureda, A., Cantero-Recasens, G., Rubio-Moscardo, F., Kiefer, K., Peinelt, C., Niemeyer, B.A., Valverde, M.A., Vicente, R., 2013. ORMDL3 modulates store-operated calcium entry and lymphocyte activation. *Human Molecular Genetics* 22, 519–530. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds450>

Casero, R.A., Marton, L.J., 2007. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat Rev Drug Discov* 6, 373–390. <https://doi.org/10.1038/nrd2243>

Catterall, W.A., 2011. Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a003947. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>

Chamero, P., Villalobos, C., Alonso, M.T., García-Sancho, J., 2002. Dampening of Cytosolic Ca²⁺ Oscillations on Propagation to Nucleus*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 50226–50229. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200522200>

Chamlali, M., Rodat-Despoix, L., Ouadid-Ahidouch, H., 2021. Store-Independent Calcium Entry and Related Signaling Pathways in Breast Cancer. *Genes (Basel)* 12, 994. <https://doi.org/10.3390/genes12070994>

Chang, Y., Bruni, R., Kloss, B., Assur, Z., Kloppmann, E., Rost, B., Hendrickson, W.A., Liu, Q., 2014. Structural Basis for a pH Sensitive Calcium Leak across Membranes. *Science* 344, 1131–1135. <https://doi.org/10.1126/science.1252043>

Cheng, K.T., Liu, X., Ong, H.L., Swaim, W., Ambudkar, I.S., 2011. Local Ca²⁺ Entry Via Orai1 Regulates Plasma Membrane Recruitment of TRPC1 and Controls Cytosolic Ca²⁺ Signals Required for Specific Cell Functions. *PLoS Biol* 9, e1001025. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001025>

Cheng, Y., Ling, Z., Li, L., 2020. The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. *Front Immunol* 11, 615056. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.615056>

Ciapa, B., Pesando, D., Wilding, M., Whitaker, M., 1994. Cell-cycle calcium transients driven by cyclic changes in inositol trisphosphate levels. *Nature* 368, 875–878. <https://doi.org/10.1038/368875a0>

Clapham, D.E., 2007. Calcium Signaling. *Cell* 131, 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>

Clapham, D.E., Runnels, L.W., Strübing, C., 2001. The trp ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2, 387–396. <https://doi.org/10.1038/35077544>

Comes, N., Serrano-Albarrás, A., Capera, J., Serrano-Novillo, C., Condom, E., Ramón y Cajal, S., Ferreres, J.C., Felipe, A., 2015. Involvement of potassium channels in the progression of cancer to a more malignant phenotype. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Membrane Channels and Transporters in Cancers* 1848, 2477–2492. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.12.008>

Concordet, J.-P., Haeussler, M., 2018. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Research* 46, W242–W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gky354>

Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., Zhang, F., 2013. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* 339, 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>

Crabtree, G.R., 2001. Calcium, Calcineurin, and the Control of Transcription*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 2313–2316. <https://doi.org/10.1074/jbc.R000024200>

De Filippo, C., Luceri, C., Caderni, G., Pacini, M., Messerini, L., Biggeri, A., Mini, E., Tonelli, F., Cianchi, F., Dolara, P., 2002. Mutations of the APC gene in human sporadic colorectal cancers. *Scand J Gastroenterol* 37, 1048–1053. <https://doi.org/10.1080/003655202320378248>

De La Fuente, S., Fonteriz, R.I., Montero, M., Alvarez, J., 2013. Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum measured with a new low-Ca²⁺-affinity targeted aequorin. *Cell Calcium* 54, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2013.04.001>

Dietrich, A., Fahlbusch, M., Gudermann, T., 2014. Classical Transient Receptor Potential 1 (TRPC1): Channel or Channel Regulator? *Cells* 3, 939–962. <https://doi.org/10.3390/cells3040939>

Dietrich, A., Kalwa, H., Storch, U., Mederos y Schnitzler, M., Salanova, B., Pinkenburg, O., Dubrovskaya, G., Essin, K., Gollasch, M., Birnbaumer, L., Gudermann, T., 2007. Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells

is independent of TRPC1. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 455, 465–477. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0314-3>

Ding, X.-W., Yan, J.-J., An, P., Lü, P., Luo, H.-S., 2007. Aberrant expression of ether à go-go potassium channel in colorectal cancer patients and cell lines. *World J Gastroenterol* 13, 1257–1261. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i8.1257>

Dohke, Y., Oh, Y.S., Ambudkar, I.S., Turner, R.J., 2004. Biogenesis and Topology of the Transient Receptor Potential Ca²⁺ Channel TRPC1. *Journal of Biological Chemistry* 279, 12242–12248. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312456200>

Downie, B.R., Sánchez, A., Knötgen, H., Contreras-Jurado, C., Gymnopoulos, M., Weber, C., Stühmer, W., Pardo, L.A., 2008. Eag1 Expression Interferes with Hypoxia Homeostasis and Induces Angiogenesis in Tumors. *J Biol Chem* 283, 36234–36240. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801830200>

Elzamzamy, O.M., Penner, R., Hazlehurst, L.A., 2020. The Role of TRPC1 in Modulating Cancer Progression. *Cells* 9, 388. <https://doi.org/10.3390/cells9020388>

Endele, S., Fuhry, M., Pak, S.J., Zabel, B.U., Winterpacht, A., 1999. LETM1, a novel gene encoding a putative EF-hand Ca(2+)-binding protein, flanks the Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) critical region and is deleted in most WHS patients. *Genomics* 60, 218–225. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5881>

Endo, M., 2009. Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Physiol Rev* 89, 1153–1176. <https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2008>

Feng, M., Grice, D.M., Faddy, H.M., Nguyen, N., Leitch, S., Wang, Y., Muend, S., Kenny, P.A., Sukumar, S., Roberts-Thomson, S.J., Monteith, G.R., Rao, R., 2010. Store-Independent Activation of Orai1 by SPCA2 in Mammary Tumors. *Cell* 143, 84–98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.040>

Ferrari, M.B., Ribbeck, K., Hagler, D.J., Spitzer, N.C., 1998. A Calcium Signaling Cascade Essential for Myosin Thick Filament Assembly in *Xenopus* Myocytes. *J Cell Biol* 141, 1349–1356.

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, 179–185. <https://doi.org/10.1038/nature04702>

Fnu, G., Weber, G.F., 2021. Alterations of Ion Homeostasis in Cancer Metastasis: Implications for Treatment. *Front Oncol* 11, 765329. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.765329>

Fogh, J., Trempe, G., 1975. New Human Tumor Cell Lines, in: Fogh, J. (Ed.), *Human Tumor Cells in Vitro*. Springer US, Boston, MA, pp. 115–159. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1647-4_5

Garbincius, J.F., Elrod, J.W., 2022. Mitochondrial calcium exchange in physiology and disease. *Physiol Rev* 102, 893–992. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2020>

Gerner, E.W., Bruckheimer, E., Cohen, A., 2018. Cancer pharmacoprevention: Targeting polyamine metabolism to manage risk factors for colon cancer. *J Biol Chem* 293, 18770–18778. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003343>

Giglia, M.D., Chu, D.I., 2016. Familial Colorectal Cancer: Understanding the Alphabet Soup. *Clin Colon Rectal Surg* 29, 185–195. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584290>

Gilibert, J.A., Parekh, A.B., 2000. Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca²⁺ current ICRAC. *EMBO J* 19, 6401–6407. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.23.6401>

Gilio, K., van Kruchten, R., Braun, A., Berna-Erro, A., Feijge, M.A.H., Stegner, D., van der Meijden, P.E.J., Kuijpers, M.J.E., Varga-Szabo, D., Heemskerk, J.W.M., Nieswandt, B., 2010. Roles of platelet STIM1 and Orai1 in glycoprotein VI- and thrombin-dependent procoagulant activity and thrombus formation. *J Biol Chem* 285, 23629–23638. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.108696>

Giovannucci, E., 2002. Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterology Clinics* 31, 925–943. [https://doi.org/10.1016/S0889-8553\(02\)00057-2](https://doi.org/10.1016/S0889-8553(02)00057-2)

Gómez-Varela, D., Zwick-Wallasch, E., Knötgen, H., Sánchez, A., Hettmann, T., Ossipov, D., Weseloh, R., Contreras-Jurado, C., Rothe, M., Stühmer, W., Pardo, L.A., 2007. Monoclonal Antibody Blockade of the Human Eag1 Potassium Channel Function

Exerts Antitumor Activity. *Cancer Research* 67, 7343–7349. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0107>

Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* 260, 3440–3450. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)83641-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)83641-4)

Guéguinou, M., Harnois, T., Crottes, D., Uguen, A., Deliot, N., Gambade, A., Chantôme, A., Haelters, J.P., Jaffrès, P.A., Jourdan, M.L., Weber, G., Soriani, O., Bognoux, P., Mignen, O., Bourmeyster, N., Constantin, B., Lecomte, T., Vandier, C., Potier-Cartereau, M., 2016. SK3/TRPC1/Orai1 complex regulates SOCE-dependent colon cancer cell migration: a novel opportunity to modulate anti-EGFR mAb action by the alkyl-lipid Ohmlin. *Oncotarget* 7, 36168–36184. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8786>

Gutiérrez, L.G., Hernández-Morales, M., Núñez, L., Villalobos, C., 2019. Inhibition of Polyamine Biosynthesis Reverses Ca²⁺ Channel Remodeling in Colon Cancer Cells. *Cancers (Basel)* 11, 83. <https://doi.org/10.3390/cancers11010083>

Gwack, Y., Srikanth, S., Feske, S., Cruz-Guilloty, F., Oh-hora, M., Neems, D.S., Hogan, P.G., Rao, A., 2007. Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *J Biol Chem* 282, 16232–16243. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609630200>

Half, E., Bercovich, D., Rozen, P., 2009. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis* 4, 22. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-4-22>

Hamilton, S.L., 2005. Ryanodine receptors. *Cell Calcium* 38, 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.037>

Hammadi, M., Chopin, V., Matifat, F., Dhennin-Duthille, I., Chasseraud, M., Sevestre, H., Ouadid-Ahidouch, H., 2012. Human ether à-gogo K⁺ channel 1 (hEag1) regulates MDA-MB-231 breast cancer cell migration through Orai1-dependent calcium entry. *Journal of Cellular Physiology* 227, 3837–3846. <https://doi.org/10.1002/jcp.24095>

Hanahan, D., 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* 12, 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

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, 55332–55352. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19430>

Hogan, P.G., Lewis, R.S., Rao, A., 2010. Molecular Basis of Calcium Signaling in Lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu Rev Immunol* 28, 491–533. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132550>

Hoth, M., Button, D.C., Lewis, R.S., 2000. Mitochondrial control of calcium-channel gating: A mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 10607–10612. <https://doi.org/10.1073/pnas.180143997>

Hoth, M., Fanger, C.M., Lewis, R.S., 1997. Mitochondrial Regulation of Store-operated Calcium Signaling in T Lymphocytes. *The Journal of Cell Biology* 137, 633–648. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.3.633>

Hoth, M., Penner, R., 1993. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol* 465, 359–386.

Hoth, M., Penner, R., 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355, 353–356. <https://doi.org/10.1038/355353a0>

Hou, X., Pedi, L., Diver, M.M., Long, S.B., 2012. Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. *Science* 338, 1308–1313. <https://doi.org/10.1126/science.1228757>

Hu, Z., Bonifas, J.M., Beech, J., Bench, G., Shigihara, T., Ogawa, H., Ikeda, S., Mauro, T., Epstein, E.H., 2000. Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nat Genet* 24, 61–65. <https://doi.org/10.1038/71701>

Huang, C.-Y., Fang, Y.-J., Abulimiti, A., Yang, X., Li, L., Liu, K.-Y., Zhang, X., Feng, X.-L., Chen, Y.-M., Zhang, C.-X., 2020. Dietary Polyamines Intake and Risk of Colorectal Cancer: A Case-Control Study. *Nutrients* 12, 3575. <https://doi.org/10.3390/nu12113575>

Huang, D., Sun, W., Zhou, Y., Li, P., Chen, F., Chen, H., Xia, D., Xu, E., Lai, M., Wu, Y., Zhang, H., 2018. Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 37, 173–187. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9726-5>

Jain, R., Begum, N., Tryphena, K.P., Singh, S.B., Srivastava, S., Rai, S.N., Vamanu, E., Khatri, D.K., 2023. Inter and intracellular mitochondrial transfer: Future of mitochondrial transplant therapy in Parkinson's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 159, 114268. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114268>

Jakob, R., Beutner, G., Sharma, V.K., Duan, Y., Gross, R.A., Hurst, S., Jhun, B.S., O-Uchi, J., Sheu, S.-S., 2014. Molecular and functional identification of a mitochondrial ryanodine receptor in neurons. *Neurosci Lett* 575, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.05.026>

James W Putney, J., 1999. Ca²⁺ Stores and Ca²⁺ Pools, in: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th Edition. Lippincott-Raven.

Jenkins, J., Papkovsky, D.B., Dmitriev, R.I., 2016. The Ca²⁺/Mn²⁺-transporting SPCA2 pump is regulated by oxygen and cell density in colon cancer cells. *Biochemical Journal* 473, 2507–2518. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160477>

Jiang, D., Zhao, L., Clapham, D.E., 2009. Genome-Wide RNAi Screen Identifies Letm1 as a Mitochondrial Ca²⁺/H⁺ Antiporter. *Science* 326, 144–147. <https://doi.org/10.1126/science.1175145>

Jiang, F., Doudna, J.A., 2017. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys* 46, 505–529. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E., 2012. A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>

Johnstone, L.S., Graham, S.J.L., Dziadek, M.A., 2010. STIM proteins: integrators of signalling pathways in development, differentiation and disease. *J Cell Mol Med* 14, 1890–1903. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01097.x>

Kammerer, S., Sokolowski, A., Hackl, H., Platzer, D., Jahn, S.W., El-Heliebi, A., Schwarzenbacher, D., Stiegelbauer, V., Pichler, M., Rezania, S., Fiegl, H., Peintinger, F., Regitnig, P., Hoefler, G., Schreibmayer, W., Bauernhofer, T., 2016. KCNJ3 is a new independent prognostic marker for estrogen receptor positive breast cancer patients. *Oncotarget* 7, 84705–84717. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13224>

Kesner, E.E., Saada-Reich, A., Lorberboum-Galski, H., 2016. Characteristics of Mitochondrial Transformation into Human Cells. *Sci Rep* 6, 26057. <https://doi.org/10.1038/srep26057>

Khattar, V., Wang, L., Peng, J.-B., 2022. Calcium Selective Channel TRPV6: Structure, Function, and Implications in Health and Disease. *Gene* 817, 146192. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146192>

Kim, J., Ko, J., Myeong, J., Kwak, M., Hong, C., So, I., 2019. TRPC1 as a negative regulator for TRPC4 and TRPC5 channels. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 471, 1045–1053. <https://doi.org/10.1007/s00424-019-02289-w>

Kirichok, Y., Krapivinsky, G., Clapham, D.E., 2004. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427, 360–364. <https://doi.org/10.1038/nature02246>

Korosec, B., Glavac, D., Rott, T., Ravnik-Glavac, M., 2006. Alterations in the ATP2A2 gene in correlation with colon and lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 171, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2006.06.016>

Korthals, M., Tech, L., Langnaese, K., Gottfried, A., Hradsky, J., Thomas, U., Zenclussen, A.C., Brunner-Weinzierl, M.C., Tedford, K., Fischer, K.-D., 2021. Plasma membrane Ca²⁺ ATPase 1 (PMCA1) but not PMCA4 is critical for B-cell development and Ca²⁺ homeostasis in mice. *Eur J Immunol* 51, 594–602. <https://doi.org/10.1002/eji.202048654>

Kreir, M., Farre, C., Beckler, M., George, M., Fertig, N., 2008. Rapid screening of membrane protein activity: electrophysiological analysis of OmpF reconstituted in proteoliposomes. *Lab Chip* 8, 587–595. <https://doi.org/10.1039/B713982A>

Lastraioli, E., Guasti, L., Crociani, O., Polvani, S., Hofmann, G., Witchel, H., Bencini, L., Calistri, M., Messerini, L., Scatizzi, M., Moretti, R., Wanke, E., Olivotto, M., Mugnai, G., Arcangeli, A., 2004. hERG1 Gene and HERG1 Protein Are Overexpressed in Colorectal Cancers and Regulate Cell Invasion of Tumor Cells. *Cancer Research* 64, 606–611. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2360>

Leibovitz, A., Stinson, J.C., McCombs, W.B., McCoy, C.E., Mazur, K.C., Mabry, N.D., 1976. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 36, 4562–4569.

Lenis, Y.Y., Elmetwally, M.A., Maldonado-Estrada, J.G., Bazer, F.W., 2017. Physiological importance of polyamines. *Zygote* 25, 244–255. <https://doi.org/10.1017/S0967199417000120>

Lepage, P.K., Lussier, M.P., Barajas-Martinez, H., Bousquet, S.M., Blanchard, A.P., Francoeur, N., Dumaine, R., Boulay, G., 2006. Identification of two domains involved in the assembly of transient receptor potential canonical channels. *J Biol Chem* 281, 30356–30364. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603930200>

Levine, A.J., Puzio-Kuter, A.M., 2010. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* 330, 1340–1344. <https://doi.org/10.1126/science.1193494>

Li, F., Wang, Y., Zeller, K.I., Potter, J.J., Wonsey, D.R., O'Donnell, K.A., Kim, J., Yustein, J.T., Lee, L.A., Dang, C.V., 2005. Myc Stimulates Nuclearly Encoded Mitochondrial Genes and Mitochondrial Biogenesis. *Mol Cell Biol* 25, 6225–6234. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.14.6225-6234.2005>

Li, Y., Meng, L., Shi, T., Ren, J., Deng, Q., 2021. Diagnosis and prognosis potential of four gene promoter hypermethylation in prostate cancer. *Cell Biology International* 45, 117–126. <https://doi.org/10.1002/cbin.11474>

Lin, X., Wu, J.-F., Wang, D.-M., Zhang, J., Zhang, W.-J., Xue, G., 2020. The correlation and role analysis of KCNK2/4/5/15 in Human Papillary Thyroid Carcinoma microenvironment. *J Cancer* 11, 5162–5176. <https://doi.org/10.7150/jca.45604>

Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E., Meyer, T., 2005. STIM Is a Ca²⁺ Sensor Essential for Ca²⁺-Store-Depletion-Triggered Ca²⁺ Influx. *Curr Biol* 15, 1235–1241. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.055>

Lis, A., Peinelt, C., Beck, A., Parvez, S., Monteilh-Zoller, M., Fleig, A., Penner, R., 2007. CRACM1, CRACM2, and CRACM3 Are Store-Operated Ca²⁺ Channels with Distinct Functional Properties. *Curr Biol* 17, 794–800. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.03.065>

Liu, Q., 2017. TMBIM-mediated Ca²⁺ homeostasis and cell death. *Biochim Biophys Acta* 1864, 850–857. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.12.023>

Liu, X., Yao, X., Tsang, S.Y., 2020. Post-Translational Modification and Natural Mutation of TRPC Channels. *Cells* 9, 135. <https://doi.org/10.3390/cells9010135>

Lopez, J.J., Jardin, I., Albarrán, L., Sanchez-Collado, J., Cantonero, C., Salido, G.M., Smani, T., Rosado, J.A., 2020a. Molecular Basis and Regulation of Store-Operated Calcium Entry, in: Islam, Md.S. (Ed.), *Calcium Signaling, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 445–469. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1_17

Lopez, J.J., Jardin, I., Sanchez-Collado, J., Salido, G.M., Smani, T., Rosado, J.A., 2020b. TRPC Channels in the SOCE Scenario. *Cells* 9, 126. <https://doi.org/10.3390/cells9010126>

Lytton, J., 2007. Na⁺/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport. *Biochem J* 406, 365–382. <https://doi.org/10.1042/BJ20070619>

Makena, M.R., Ko, M., Mekile, A.X., Senoo, N., Dang, D.K., Warrington, J., Buckhaults, P., Talbot, C.C., Claypool, S.M., Rao, R., 2022. Secretory pathway Ca²⁺-ATPase SPCA2 regulates mitochondrial respiration and DNA damage response through store-independent calcium entry. *Redox Biol* 50, 102240. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102240>

Mallilankaraman, K., Doonan, P., Cárdenas, C., Chandramoorthy, H.C., Muller, M., Miller, R., Hoffman, N.E., Gandhirajan, R., Molgó, J., Birnbaum, M.J., Rothberg, B., Mak, D.-O.D., Foskett, J.K., Madesh, M., 2012. MICU1 is an Essential Gatekeeper for MCU-Mediated Mitochondrial Ca²⁺ Uptake That Regulates Cell Survival. *Cell* 151, 630–644. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.011>

Malvezzi, M., Carioli, G., Bertuccio, P., Boffetta, P., Levi, F., Vecchia, C.L., Negri, E., 2018. European cancer mortality predictions for the year 2018 with focus on colorectal cancer. *Annals of Oncology* 29, 1016–1022. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy033>

Mamont, P.S., Duchesne, M.-C., Grove, J., Bey, P., 1978. Anti-proliferative properties of DL- α -difluoromethyl ornithine in cultured cells. A consequence of the irreversible inhibition of ornithine decarboxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 81, 58–66. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(78\)91630-3](https://doi.org/10.1016/0006-291X(78)91630-3)

Maniewska, J., Jeżewska, D., 2021. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Colorectal Cancer Chemoprevention. *Cancers (Basel)* 13, 594. <https://doi.org/10.3390/cancers13040594>

Maxwell, P.H., 2012. Tumor strengths and frailties: Aspiring to prevent colon cancer. *Nat Med* 18, 32–33. <https://doi.org/10.1038/nm.2637>

McFadzean, I., Gibson, A., 2002. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* 135, 1–13. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704468>

McKinnon, K.M., 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* 120, 5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>

Meissner, G., 2004. Molecular regulation of cardiac ryanodine receptor ion channel. *Cell Calcium* 35, 621–628. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2004.01.015>

Miyazaki, S., Shirakawa, H., Nakada, K., Honda, Y., 1993. Essential Role of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor/Ca²⁺ Release Channel in Ca²⁺ Waves and Ca²⁺ Oscillations at Fertilization of Mammalian Eggs. *Developmental Biology* 158, 62–78. <https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1168>

Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., Soria, E., 2005. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J Mol Evol* 60, 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>

Molinari, C., Marisi, G., Passardi, A., Matteucci, L., De Maio, G., Ulivi, P., 2018. Heterogeneity in Colorectal Cancer: A Challenge for Personalized Medicine? *Int J Mol Sci* 19, 3733. <https://doi.org/10.3390/ijms19123733>

Montell, C., 2005. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005, re3. <https://doi.org/10.1126/stke.2722005re3>

Montero, M., Alonso, M.T., Carnicero, E., Cuchillo-Ibáñez, I., Albillos, A., García, A.G., García-Sancho, J., Alvarez, J., 2000. Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* 2, 57–61. <https://doi.org/10.1038/35000001>

Montes de Oca Balderas, P., 2021. Mitochondria–plasma membrane interactions and communication. *J Biol Chem* 297, 101164. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101164>

Moyer, M.P., Manzano, L.A., Merriman, R.L., Stauffer, J.S., Tanzer, L.R., 1996. NCM460, a normal human colon mucosal epithelial cell line. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* 32, 315–317. <https://doi.org/10.1007/BF02722955>

Muik, M., Fahrner, M., Derler, I., Schindl, R., Bergsmann, J., Frischauf, I., Groschner, K., Romanin, C., 2009. A Cytosolic Homomerization and a Modulatory Domain within STIM1 C Terminus Determine Coupling to ORAI1 Channels. *J Biol Chem* 284, 8421–8426. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800229200>

Myeong, J., Ko, J., Kwak, M., Kim, J., Woo, J., Ha, K., Hong, C., Yang, D., Kim, H.J., Jeon, J.-H., So, I., 2018. Dual action of the Gαq-PLCβ-PI(4,5)P₂ pathway on TRPC1/4 and TRPC1/5 heterotetramers. *Sci Rep* 8, 12117. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30625-0>

Nesin, V., Tsiokas, L., 2014. TRPC1. *Handb Exp Pharmacol* 222, 15–51. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_2

Nichols, C.G., Lee, S., 2018. Polyamines and potassium channels: A 25-year romance. *J Biol Chem* 293, 18779–18788. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003344>

Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S., Hedge, P., 1991. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 253, 665–669. <https://doi.org/10.1126/science.1651563>

Noble, M., Lin, Q.-T., Sirko, C., Houpt, J.A., Novello, M.J., Stathopoulos, P.B., 2020. Structural Mechanisms of Store-Operated and Mitochondrial Calcium Regulation: Initiation Points for Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 3642. <https://doi.org/10.3390/ijms21103642>

Nwokonko, R.M., Cai, X., Loktionova, N.A., Wang, Y., Zhou, Y., Gill, D.L., 2017. The STIM-Orai Pathway: Conformational Coupling Between STIM and Orai in the Activation of Store-Operated Ca²⁺ Entry, in: Groschner, K., Graier, W.F., Romanin, C. (Eds.), *Store-Operated Ca²⁺ Entry (SOCE) Pathways: Emerging Signaling Concepts in Human (Patho)Physiology*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 83–98. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57732-6_5

Ong, E.-C., Nesin, V., Long, C.L., Bai, C.-X., Guz, J.L., Ivanov, I.P., Abramowitz, J., Birnbaumer, L., Humphrey, M.B., Tsiokas, L., 2013. A TRPC1 Protein-dependent Pathway Regulates Osteoclast Formation and Function. *J Biol Chem* 288, 22219–22232. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.459826>

Palty, R., Raveh, A., Kaminsky, I., Meller, R., Reuveny, E., 2012. SARAF Inactivates the Store Operated Calcium Entry Machinery to Prevent Excess Calcium Refilling. *Cell* 149, 425–438. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.055>

Palty, R., Silverman, W.F., Hershinkel, M., Caporale, T., Sensi, S.L., Parnis, J., Nolte, C., Fishman, D., Shoshan-Barmatz, V., Herrmann, S., Khananshvilii, D., Sekler, I., 2010. NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 436–441. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908099107>

Parekh, A.B., 2017. Regulation of CRAC channels by Ca²⁺-dependent inactivation. *Cell Calcium* 63, 20–23. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.12.003>

Parekh, A.B., Putney, J.W., 2005. Store-Operated Calcium Channels. *Physiological Reviews* 85, 757–810. <https://doi.org/10.1152/physrev.00057.2003>

Park, C.Y., Hoover, P.J., Mullins, F.M., Bachhawat, P., Covington, E.D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K.C., Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., 2009. STIM1 Clusters and Activates CRAC Channels via Direct Binding of a Cytosolic Domain to Orai1. *Cell* 136, 876–890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.014>

Patrushev, M.V., Mazunin, I.O., Vinogradova, E.N., Kamenski, P.A., 2015. Mitochondrial fission and fusion. *Biochemistry Moscow* 80, 1457–1464. <https://doi.org/10.1134/S0006297915110061>

Peleg, S., Sellin, J.H., Wang, Y., Freeman, M.R., Umar, S., 2010. Suppression of aberrant transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6 expression in hyperproliferative colonic crypts by dietary calcium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299, G593-601. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00193.2010>

Pelzmann, B., Hatab, A., Scheruebel, S., Langthaler, S., Rienmueller, T., Sokolowski, A., Gorischek, A., Platzer, D., Zorn-Pauly, K., Jahn, S.W., Bauernhofer, T., Schreibmayer, W., 2022. Consequences of somatic mutations of GIRK1 detected in primary malign tumors on expression and function of G-protein activated, inwardly rectifying, K⁺ channels. *Front Oncol* 12, 998907. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.998907>

Penna, A., Demuro, A., Yeromin, A.V., Zhang, S.L., Safrina, O., Parker, I., Cahalan, M.D., 2008. The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* 456, 116–120. <https://doi.org/10.1038/nature07338>

Peretti, M., Badaoui, M., Girault, A., Van Gulick, L., Mabile, M.-P., Tebbakha, R., Sevestre, H., Morjani, H., Ouadid-Ahidouch, H., 2019. Original association of ion transporters mediates the ECM-induced breast cancer cell survival: Kv10.1-Orai1-SPCA2 partnership. *Sci Rep* 9, 1175. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37602-7>

Pérez-Riesgo, E., Gutiérrez, L.G., Ubierna, D., Acedo, A., Moyer, M.P., Núñez, L., Villalobos, C., 2017. Transcriptomic Analysis of Calcium Remodeling in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 18, 922. <https://doi.org/10.3390/ijms18050922>

Pérez-Riesgo, E., Hernando-Pérez, E., Feijóo, V., Tajada, S., Núñez, L., Villalobos, C., 2023. Transcriptional Basis of Ca²⁺ Remodeling Reversal Induced by

Polyamine Synthesis Inhibition in Colorectal Cancer Cells. *Cancers (Basel)* 15, 1600. <https://doi.org/10.3390/cancers15051600>

Perry, S.W., Norman, J.P., Barbieri, J., Brown, E.B., Gelbard, H.A., 2011. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* 50, 98–115. <https://doi.org/10.2144/000113610>

Philipson, K.D., Nicoll, D.A., Ottolia, M., Quednau, B.D., Reuter, H., John, S., Qiu, Z., 2002. The Na⁺/Ca²⁺ exchange molecule: an overview. *Ann N Y Acad Sci* 976, 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04708.x>

Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., Rizzuto, R., 2008. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 27, 6407–6418. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.308>

Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 1992. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359, 235–237. <https://doi.org/10.1038/359235a0>

Prakriya, M., 2013. Store-Operated Orai Channels: Structure and Function. *Curr Top Membr* 71, 1–32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407870-3.00001-9>

Prakriya, M., 2009. The molecular physiology of CRAC channels. *Immunol Rev* 231, 88–98. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00820.x>

Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., Hogan, P.G., 2006. Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 443, 230–233. <https://doi.org/10.1038/nature05122>

Putney, J.W., 2017. Store-Operated Calcium Entry: An Historical Overview, in: Krebs, J. (Ed.), *Membrane Dynamics and Calcium Signaling, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 205–214. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55858-5_9

Putney, J.W., 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7, 1–12. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0143-4160(86)90026-6)

Quednau, B.D., Nicoll, D.A., Philipson, K.D., 2004. The sodium/calcium exchanger family-SLC8. *Pflugers Arch* 447, 543–548. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1065-4>

R Core Team, 2020. R: A language and Environment for Statistical Computing.

Rao, J.N., Rathor, N., Zhuang, R., Zou, T., Liu, L., Xiao, L., Turner, D.J., Wang, J.-Y., 2012. Polyamines regulate intestinal epithelial restitution through TRPC1-mediated Ca^{2+} signaling by differentially modulating STIM1 and STIM2. *Am J Physiol Cell Physiol* 303, C308-317. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00120.2012>

Raphaël, M., Lehen'kyi, V., Vandenberghe, M., Beck, B., Khalimonchyk, S., Vanden Abeele, F., Farsetti, L., Germain, E., Bokhobza, A., Mihalache, A., Gosset, P., Romanin, C., Clézardin, P., Skryma, R., Prevarskaya, N., 2014. TRPV6 calcium channel translocates to the plasma membrane via Orai1-mediated mechanism and controls cancer cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E3870–E3879. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413409111>

Rizzuto, R., Pozzan, T., 2006. Microdomains of Intracellular Ca^{2+} : Molecular Determinants and Functional Consequences. *Physiological Reviews* 86, 369–408. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2005>

Roderick, H.L., Cook, S.J., 2008. Ca^{2+} signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca^{2+} for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer* 8, 361–375. <https://doi.org/10.1038/nrc2374>

Romero-Garcia, S., Prado-Garcia, H., 2019. Mitochondrial calcium: Transport and modulation of cellular processes in homeostasis and cancer (Review). *International Journal of Oncology* 54, 1155–1167. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4696>

Roos, J., DiGregorio, P.J., Yeromin, A.V., Ohlsen, K., Liudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J.A., Wagner, S.L., Cahalan, M.D., Velichelebi, G., Stauderman, K.A., 2005. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function. *J Cell Biol* 169, 435–445. <https://doi.org/10.1083/jcb.200502019>

Rubaiy, H.N., Ludlow, M.J., Henrot, M., Gaunt, H.J., Miteva, K., Cheung, S.Y., Tanahashi, Y., Hamzah, N., Musialowski, K.E., Blythe, N.M., Appleby, H.L., Bailey, M.A., McKeown, L., Taylor, R., Foster, R., Waldmann, H., Nussbaumer, P., Christmann, M., Bon, R.S., Muraki, K., Beech, D.J., 2017. Picomolar, selective, and subtype-specific

small-molecule inhibition of TRPC1/4/5 channels. *J Biol Chem* 292, 8158–8173. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.773556>

Rudolph, H.K., Antebi, A., Fink, G.R., Buckley, C.M., Dorman, T.E., LeVitre, J., Davidow, L.S., Mao, J.I., Moir, D.T., 1989. The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca²⁺ ATPase family. *Cell* 58, 133–145. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90410-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90410-8)

Sage, S.O., 1992. Three routes for receptor-mediated Ca²⁺ entry. *Current Biology* 2, 312–314. [https://doi.org/10.1016/0960-9822\(92\)90885-E](https://doi.org/10.1016/0960-9822(92)90885-E)

Sahin, E., Colla, S., Liesa, M., Moslehi, J., Müller, F.L., Guo, M., Cooper, M., Kotton, D., Fabian, A.J., Walkey, C., Maser, R.S., Tonon, G., Foerster, F., Xiong, R., Wang, Y.A., Shukla, S.A., Jaskelioff, M., Martin, E.S., Heffernan, T.P., Protopopov, A., Ivanova, E., Mahoney, J.E., Kost-Alimova, M., Perry, S.R., Bronson, R., Liao, R., Mulligan, R., Shirihai, O.S., Chin, L., DePinho, R.A., 2011. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* 470, 359–365. <https://doi.org/10.1038/nature09787>

Samanta, A., Hughes, T.E.T., Moiseenkova-Bell, V.Y., 2018. Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *Subcell Biochem* 87, 141–165. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_6

Santellal, L., Risol, L.D., 1998. protease action, and the of the cell cycle. *Cell Calcium*.

Santucci, C., Boffetta, P., Levi, F., Vecchia, C.L., Negri, E., Malvezzi, M., 2021. Colorectal Cancer Mortality in Young Adults Is Rising in the United States, Canada, United Kingdom, and Australia but Not in Europe and Asia. *Gastroenterology* 160, 1860-1862.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.12.070>

Scarpulla, R.C., Vega, R.B., Kelly, D.P., 2012. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 23, 459–466. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.006>

Schratter, G., Scheruebel, S., Langthaler, S., Ester, K., Pelzmann, B., Ghaffari-Tabrizi-Wizsy, N., Rezanian, S., Gorischek, A., Platzer, D., Zorn-Pauly, K., Ahammer, H., Prokesch, A., Stanzer, S., Devaney, T.T.J., Schmidt, K., Jahn, S.W., Prassl, R.,

Bauernhofer, T., Schreibmayer, W., 2019. GIRK1 triggers multiple cancer-related pathways in the benign mammary epithelial cell line MCF10A. *Sci Rep* 9, 19277. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55683-w>

Shi, J., Miralles, F., Kinet, J.-P., Birnbaumer, L., Large, W.A., Albert, A.P., 2017. Evidence that Orai1 does not contribute to store-operated TRPC1 channels in vascular smooth muscle cells. *Channels (Austin)* 11, 329–339. <https://doi.org/10.1080/19336950.2017.1303025>

Shoshan-Barmatz, V., De Pinto, V., Zweckstetter, M., Raviv, Z., Keinan, N., Arbel, N., 2010. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Molecular Aspects of Medicine* 31, 227–285. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.03.002>

Siegel, R.L., Miller, K.D., Goding Sauer, A., Fedewa, S.A., Butterly, L.F., Anderson, J.C., Cercek, A., Smith, R.A., Jemal, A., 2020. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 70, 145–164. <https://doi.org/10.3322/caac.21601>

Smaardijk, S., Chen, J., Wuytack, F., Vangheluwe, P., 2017. SPCA2 couples Ca²⁺ influx via Orai1 to Ca²⁺ uptake into the Golgi/secretory pathway. *Tissue Cell* 49, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.09.004>

Sobradillo, D., Hernández-Morales, M., Ubierna, D., Moyer, M.P., Núñez, L., Villalobos, C., 2014. A Reciprocal Shift in Transient Receptor Potential Channel 1 (TRPC1) and Stromal Interaction Molecule 2 (STIM2) Contributes to Ca²⁺ Remodeling and Cancer Hallmarks in Colorectal Carcinoma Cells. *Journal of Biological Chemistry* 289, 28765–28782. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.581678>

Srikanth, S., Jung, H.-J., Kim, K.-D., Souda, P., Whitelegge, J., Gwack, Y., 2010. A novel EF-hand protein, CRACR2A, is a cytosolic Ca²⁺ sensor that stabilizes CRAC channels in T cells. *Nat Cell Biol* 12, 436–446. <https://doi.org/10.1038/ncb2045>

Stafford, N., Wilson, C., Oceandy, D., Neyses, L., Cartwright, E.J., 2017. The Plasma Membrane Calcium ATPases and Their Role as Major New Players in Human Disease. *Physiological Reviews* 97, 1089–1125. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2016>

Stathopoulos, P.B., Zheng, L., Li, G.-Y., Plevin, M.J., Ikura, M., 2008. Structural and Mechanistic Insights into STIM1-Mediated Initiation of Store-Operated Calcium Entry. *Cell* 135, 110–122. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.006>

Stauch, K.L., Totusek, S., Trease, A.J., Estrella, L.D., Emanuel, K., Fangmeier, A., Fox, H.S., 2023. Longitudinal in vivo metabolic labeling reveals tissue-specific mitochondrial proteome turnover rates and proteins selectively altered by parkin deficiency. *Sci Rep* 13, 11414. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38484-0>

Stewart, J.M., 2020. TRPV6 as A Target for Cancer Therapy. *J Cancer* 11, 374–387. <https://doi.org/10.7150/jca.31640>

Storch, U., Forst, A.-L., Philipp, M., Gudermann, T., Mederos y Schnitzler, M., 2012. Transient Receptor Potential Channel 1 (TRPC1) Reduces Calcium Permeability in Heteromeric Channel Complexes. *J Biol Chem* 287, 3530–3540. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.283218>

Strehler, E.E., Zacharias, D.A., 2001. Role of Alternative Splicing in Generating Isoform Diversity Among Plasma Membrane Calcium Pumps. *Physiological Reviews* 81, 21–50. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.1.21>

Summerhayes, I.C., Lampidis, T.J., Bernal, S.D., Nadakavukaren, J.J., Nadakavukaren, K.K., Shepherd, E.L., Chen, L.B., 1982. Unusual retention of rhodamine 123 by mitochondria in muscle and carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 5292–5296. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.17.5292>

Sun, X., Li, Y., Lan, H., Jiang, T., Wan, X., Cheng, Y., 2023. Identification of KCNK1 as a potential prognostic biomarker and therapeutic target of breast cancer. *Pathology - Research and Practice* 241, 154286. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.154286>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71, 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Syngal, S., Brand, R.E., Church, J.M., Giardiello, F.M., Hampel, H.L., Burt, R.W., 2015. ACG Clinical Guideline: Genetic Testing and Management of Hereditary

Gastrointestinal Cancer Syndromes. *Am J Gastroenterol* 110, 223–263. <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.435>

Szalai, G., Krishnamurthy, R., Hajnóczky, G., 1999. Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. *EMBO J* 18, 6349–6361. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.22.6349>

Takemura, H., Hughes, A.R., Thastrup, O., Putney, J.W., 1989. Activation of Calcium Entry by the Tumor Promoter Thapsigargin in Parotid Acinar Cells. *Journal of Biological Chemistry* 264, 12266–12271. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63852-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63852-9)

Takemura, H., Putney, J.W., 1989. Capacitative calcium entry in parotid acinar cells. *Biochem J* 258, 409–412.

Tan, W., Colombini, M., 2007. VDAC closure increases calcium ion flux. *Biochim Biophys Acta* 1768, 2510–2515. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.06.002>

Taylor, C.W., Tovey, S.C., 2010. IP3 Receptors: Toward Understanding Their Activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a004010. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004010>

Thompson, J.L., Shuttleworth, T.J., 2013. How Many Orai's Does It Take to Make a CRAC Channel? *Sci Rep* 3, 1961. <https://doi.org/10.1038/srep01961>

Tiffner, A., Hopf, V., Derler, I., 2023. CRAC and SK Channels: Their Molecular Mechanisms Associated with Cancer Cell Development. *Cancers* 15, 101. <https://doi.org/10.3390/cancers15010101>

Tirendi, S., Marengo, B., Domenicotti, C., Bassi, A.M., Almonti, V., Vernazza, S., 2023. Colorectal cancer and therapy response: a focus on the main mechanisms involved. *Front Oncol* 13, 1208140. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1208140>

Tjalsma, H., Boleij, A., Marchesi, J.R., Dutilh, B.E., 2012. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol* 10, 575–582. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2819>

Toplak, Ž., Hendrickx, L.A., Abdelaziz, R., Shi, X., Peigneur, S., Tomašič, T., Tytgat, J., Peterlin-Mašič, L., Pardo, L.A., 2022. Overcoming challenges of HERG potassium channel liability through rational design: Eag1 inhibitors for cancer treatment. *Medicinal Research Reviews* 42, 183–226. <https://doi.org/10.1002/med.21808>

Tsien, R.W., 1983. Calcium Channels in Excitable Cell Membranes. *Annual Review of Physiology* 45, 341–358. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.45.030183.002013>

Valero, R.A., Senovilla, L., Núñez, L., Villalobos, C., 2008. The role of mitochondrial potential in control of calcium signals involved in cell proliferation. *Cell Calcium* 44, 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.12.002>

Vanoevelen, J., Dode, L., Van Baelen, K., Fairclough, R.J., Missiaen, L., Raeymaekers, L., Wuytack, F., 2005. The Secretory Pathway Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase 2 Is a Golgi-localized Pump with High Affinity for Ca²⁺ Ions*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 22800–22808. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501026200>

Varughese, J.T., Buchanan, S.K., Pitt, A.S., 2021. The Role of Voltage-Dependent Anion Channel in Mitochondrial Dysfunction and Human Disease. *Cells* 10, 1737. <https://doi.org/10.3390/cells10071737>

Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D.L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R., Kinet, J.-P., 2006. CRACM1 Is a Plasma Membrane Protein Essential for Store-Operated Ca²⁺ Entry. *Science* 312, 1220–1223. <https://doi.org/10.1126/science.1127883>

Villalobos, C., Gutiérrez, L.G., Hernández-Morales, M., Del Bosque, D., Núñez, L., 2018. Mitochondrial control of store-operated Ca²⁺ channels in cancer: Pharmacological implications. *Pharmacol Res* 135, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.08.001>

Villalobos, C., Hernández-Morales, M., Gutiérrez, L.G., Núñez, L., 2019. TRPC1 and ORAI1 channels in colon cancer. *Cell Calcium* 81, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.06.003>

Villalobos, C., Sobradillo, D., Hernández-Morales, M., Núñez, L., 2017. Calcium remodeling in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864, 843–849. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.01.005>

Villalobos, C., Sobradillo, D., Hernández-Morales, M., Núñez, L., 2016. Remodeling of Calcium Entry Pathways in Cancer. *Adv Exp Med Biol* 898, 449–466. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26974-0_19

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., Kinzler, K.W., 2013. Cancer Genome Landscapes. *Science* 339, 1546–1558. <https://doi.org/10.1126/science.1235122>

Wang, J.-Y., Wang, J., Golovina, V.A., Li, L., Platoshyn, O., Yuan, J.X.-J., 2000. Role of K⁺ channel expression in polyamine-dependent intestinal epithelial cell migration. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 278, C303–C314. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.2.C303>

Wang, Q.-C., Zheng, Qiaoxia, Tan, H., Zhang, B., Li, X., Yang, Y., Yu, J., Liu, Y., Chai, H., Wang, X., Sun, Z., Wang, J.-Q., Zhu, S., Wang, F., Yang, M., Guo, C., Wang, H., Zheng, Qingyin, Li, Y., Chen, Q., Zhou, A., Tang, T.-S., 2016. TMCO1 Is an ER Ca(2+) Load-Activated Ca(2+) Channel. *Cell* 165, 1454–1466. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.051>

Wang, Z., 2004. Roles of K⁺ channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 448, 274–286. <https://doi.org/10.1007/s00424-004-1258-5>

Warburg, O., 1925. The Metabolism of Carcinoma Cells¹. *The Journal of Cancer Research* 9, 148–163. <https://doi.org/10.1158/jcr.1925.148>

Watson, R., Parekh, A.B., 2012. Mitochondrial regulation of CRAC channel-driven cellular responses. *Cell Calcium, Special issue on Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in health and disease states* 52, 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.02.003>

Wes, P.D., Chevesich, J., Jeromin, A., Rosenberg, C., Stetten, G., Montell, C., 1995. TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9652–9656.

Wickenden, A.D., 2000. Overview of Electrophysiological Techniques. *Current Protocols in Pharmacology* 11, 11.1.1-11.1.17. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph1101s64>

Wissenbach, U., Niemeyer, B.A., Fixemer, T., Schneidewind, A., Trost, C., Cavalié, A., Reus, K., Meese, E., Bonkhoff, H., Flockerzi, V., 2001. Expression of CaT-like, a Novel Calcium-selective Channel, Correlates with the Malignancy of Prostate Cancer. *Journal of Biological Chemistry* 276, 19461–19468. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009895200>

Wu, M., Wu, C., Song, T., Pan, K., Wang, Y., Liu, Z., 2023. Structure and transport mechanism of the human calcium pump SPCA1. *Cell Res* 33, 533–545. <https://doi.org/10.1038/s41422-023-00827-x>

Yang, M., Brackenbury, W., 2013. Membrane potential and cancer progression. *Frontiers in Physiology* 4.

Yen, M., Lokteva, L.A., Lewis, R.S., 2016. Functional Analysis of Orai1 Concatemers Supports a Hexameric Stoichiometry for the CRAC Channel. *Biophys J* 111, 1897–1907. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.09.020>

Yeromin, A.V., Zhang, S.L., Jiang, W., Yu, Y., Safrina, O., Cahalan, M.D., 2006. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* 443, 226–229. <https://doi.org/10.1038/nature05108>

Yuan, J.P., Zeng, W., Dorwart, M.R., Choi, Y.-J., Worley, P.F., Muallem, S., 2009. SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nat Cell Biol* 11, 337–343. <https://doi.org/10.1038/ncb1842>

Zhai, X., Sterea, A.M., El Hiani, Y., 2020. Lessons from the Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Transporters—A Cancer Connection. *Cells* 9, 1536. <https://doi.org/10.3390/cells9061536>

Zhang, T., Miao, C., 2023. Mitochondrial transplantation as a promising therapy for mitochondrial diseases. *Acta Pharm Sin B* 13, 1028–1035. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.10.008>

Zou, Y., Xie, J., Tian, W., Wu, L., Xie, Y., Huang, S., Tang, Y., Deng, X., Wu, H., Xie, X., 2022. Integrative Analysis of KCNK Genes and Establishment of a Specific Prognostic Signature for Breast Cancer. *Front Cell Dev Biol* 10, 839986. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.839986>

