



TESIS DOCTORAL

***PAPEL DEL REMODELADO DE LA
ENTRADA DE CALCIO EN EL
DESARROLLO TUMORAL***

***DOCTORADO EN BIOMARCADORES DE SALUD
Y ESTADOS PATOLÓGICOS***

Raquel Diez Bello

2019



TESIS DOCTORAL

PAPEL DEL REMODELADO DE LA ENTRADA DE CALCIO EN EL DESARROLLO TUMORAL

DOCTORADO EN BIOMARCADORES DE SALUD Y ESTADOS PATOLÓGICOS

D. Juan Antonio Rosado Dionisio, Doctor en Veterinaria, Catedrático del Departamento de Fisiología en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura y **D. Isaac Jardín Polo**, Doctor en Biología e Investigador Contratado “Juan de la Cierva” de la Universidad de Extremadura,

INFORMAN

Que la presente memoria presentada por Dña. Raquel Diez Bello, con el título “Papel del remodelado de la entrada de calcio en el desarrollo tumoral”, ha sido realizada bajo nuestra dirección, en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Extremadura. Durante el período de realización de la Tesis, la doctoranda realizó una estancia de tres meses en el Instituto Nacional de la Salud e Investigación Médica “INSERM” de la Universidad de Lille en Lille (Francia). La Tesis ha sido informada favorablemente por expertos europeos en el área de Fisiología. Por ello consideramos que la Tesis reúne los requisitos de originalidad para ser juzgada y optar a la mención “Doctor Internacional” y autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Cáceres, a 7 de Febrero de 2019:

Este trabajo de investigación ha sido realizado con cargo a los siguientes proyectos:

Proyectos de investigación **BFU2013-45564-C2-1-P** y **BFU2016-74932-C2-1-P** del
Ministerio de Economía y Competitividad.

Ayuda a grupos de investigación Junta de Extremadura-FEDER **GR15029**.

Proyecto de investigación **IB16046** de la Junta de Extremadura-FEDER.

Raquel Diez Bello ha disfrutado de una beca-contrato **BES-2014-067819** para la formación predoctoral de personal investigador del Ministerio de Economía y Competitividad.



JUNTA DE EXTREMADURA



Unión Europea
Fondo Europeo de
Desarrollo Regional

AGRADECIMIENTOS

Los agradecimientos, una sección de la Tesis en la que no es fácil plasmar tantas emociones que abarcan los años dentro y fuera del laboratorio. En estos cuatro años he tenido a mi lado familiares, amigos, compañeros y profesores que me han acompañado en los momentos buenos y en aquellos más complicados, sirviéndome de guía, soporte, apoyo constante e incondicional y un ejemplo a seguir para mi crecimiento personal y profesional y por ello me siento enormemente afortunada y agradecida.

Primero, expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis, los doctores Juan Antonio Rosado e Isaac Jardín, por dirigirme un trabajo tan novedoso y original; un trabajo que nos hacía estar inmersos por primera vez en la temática del cáncer y en el que hemos puesto toda nuestra confianza, dedicación, nuestro empeño, esfuerzo y ganas para hacer que cada día hiciéramos una mejor labor investigadora.

Al Dr. y Catedrático Ginés M. Salido, por sus buenos ánimos, apoyo, bromas y momentos de relajar las preocupaciones y tensiones por los experimentos fallidos y no dejar de apostar por la Ciencia y su equipo. Gracias, Ginés.

A Pedro Redondo, Peter!, no sólo has sido tutor y director desde mi llegada al Departamento de Fisiología, con mis inicios de Máster y luego Tesina, apostando y confiando en mi, alentando que un día llegaría a ser Doctora; sino que también has sido amigo. Gracias por tus ánimos y tu escucha.

A Mer!!! porque es el alma y espíritu vivo del laboratorio, capaz de sacarte la sonrisa y la risa! Siempre te adelantaré por los pasillos, Mer! No cambies, porque sin ti y esas canciones tan pegadizas desde primera hora, el lab se queda sin color!

J.J, Jose, Carlos y Sandra, compañeros de fatigas, por las horas compartidas de protocolos, experimentos, de reuniones (más de trabajo que de ocio!), de apoyos, de enseñanzas-aprendizajes. Perseguid vuestros sueños, no os rindáis, no sabéis si la última llave será la que abra la puerta! (en el lab a veces pasa!!).

I also want to thank Dra. Natacha Prevarskaya for welcoming me in her lab in Lille, France, for her help during my stay there. Also, thanks to the friends I met there, Valerio, Oksana, Alex, Alessandra, Lucile, Guillaume, Abigaël, Emilie, Pauline, who made those three months a great experience and made me feel at home in Lille. Thank you, guys!

Y no finalizo sin dedicar unas líneas a quienes han sufrido conmigo, tanto o más. Agradecer muchísimo a mis padres Ángel y Rosi, mi hermano y resto de familia. A mi pareja Juan Ramón, amor, compañero de viaje y de vida y su familia, que me acogió desde que llegué a Cáceres. Por los que no están, pero que igualmente recibí y me enseñaron tanto, aprendiendo que siempre se lucha hasta el final!! A mis amigos. A TODOS, gracias por vuestro apoyo, cariño y amor incondicionales, ayuda, ánimos, escucha, fuerza, sacrificio, comprensión, confianza, por ser lo mejor en lo bueno y en lo malo, por estar ahí, por teneros, por ser para mí lo más, lo mejor. A Blanquita, la perrina de la casa. OS QUIERO. Gracias por ocupar mi corazón.

A todos los que habéis hecho posible haber llegado a una de mis metas más altas.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN	17
INTRODUCTION	19
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	23
1. HOMEOSTASIS DEL CALCIO	23
1.1. Mecanismos que aumentan la $[Ca^{2+}]_c$	27
1.1.1. Liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares	27
1.1.2. Entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular	28
1.2. Mecanismos que disminuyen la $[Ca^{2+}]_c$	30
1.2.1. Bomba ATPasa de Ca^{2+} del RE (SERCA)	30
1.2.2. Bomba ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA)	32
1.2.3. Intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX)	33
1.3. Finalización de la señal de Ca^{2+}	35
2. ENTRADA CAPACITATIVA DE Ca^{2+} (ECC)	36
2.1. Mecanismos implicados en la entrada de Ca^{2+}	39
2.1.1. STIM1 (<i>Stromal Interaction Molecule 1</i>)	41
2.1.2. STIM2 (<i>Stromal Interaction Molecule 2</i>)	45
2.1.3. Orai1 (también conocida como CRACM1)	45
2.1.4. Orai2	48
2.1.5. TRPs	49
3. CÁNCER	55
3.1. Leucemia	56
3.1.1. Células troncales hematopoyéticas (CTH)	58
3.1.2. Células progenitoras hematopoyéticas (CPH)	58
3.1.3. Células precursoras	58
3.1.4. Leucemia Mieloide/ Mielógena/ Mielocítica	61
3.1.5. Leucemia Linfoide/ Linfoblástica/ Linfocítica	62
3.2. Cáncer de mama	64
3.2.1. Anatomía de la glándula mamaria	64
3.2.2. Tipos de cáncer de mama	66
3.2.3. Grados Histológicos y Etapas del Cáncer	71
3.2.4. Receptores hormonales en el cáncer de mama	74
3.2.5. Receptores estrogénicos y de progesterona	75
3.3. TERAPIAS CONTRA EL CÁNCER	78
4. ENTRADA CAPACITATIVA DE CALCIO Y CÁNCER	79
4.1. REMODELACIÓN DE LA ECC EN LA PATOGÉNESIS DEL CÁNCER	79
4.1.1. Expresión diferencial de los componentes moleculares de la ECC y cáncer	79
4.1.2. Angiogénesis	80
4.1.3. Apoptosis	81
4.1.4. Migración e invasión (metástasis)	81
4.1.5. Proliferación celular	82
4.2. PAPEL DE STIM Y LOS CANALES ASOCIADOS EN EL CÁNCER	83
4.2.1. Papel de STIM1 y SOC en procesos de migración e invasión (metástasis)	83
4.2.2. Papel de las proteínas STIM y los canales de calcio asociados en la apoptosis	84

4.2.3.	Papel de STIM y canales Orai en la migración y metástasis tumorales _____	85
4.2.4.	Papel de STIM y sus canales asociados en la proliferación celular _____	86
4.2.5.	Papel de STIM en la resistencia a fármacos _____	89
5.	OLEOCANTAL Y CÁNCER _____	90
5.1.	Vía de señalización hgf/c-met _____	91
HIPÓTESIS _____		99
OBJETIVOS _____		103
OBJECTIVES _____		104
MATERIALES Y MÉTODOS _____		107
RESULTADOS _____		137
	Orai1 and Orai2 mediate store-operated calcium entry that regulates HL60 cell migration and FAK phosphorylation _____	137
	TRPC6 Channels Are Required for Proliferation, Migration and Invasion of Breast Cancer Cell Lines by Modulation of Orai1 and Orai3 Surface Exposure _____	137
	(-)- Oleocanthal inhibits proliferation and migration by modulating Ca²⁺ entry through TRPC6 in breast cancer cells _____	137
DISCUSIÓN _____		141
CONCLUSIONES _____		149
CONCLUSIONS _____		150
BIBLIOGRAFÍA _____		153

ABREVIATURAS

- **2-ABP:** 2-aminoetoxidifenil borato
- **7-AAD:** 7-aminoactinomicina D
- **AA:** ácido araquidónico
- **AC:** adenilato ciclasa
- **ADN:** ácido desoxirribonucleico
- **ADNc:** ADN complementario
- **ADP:** adenosín difosfato
- **ADPRc:** ADP ribosa cíclica
- **AINES:** antiinflamatorios no esteroideos
- **AKT:** proteína cinasa B
- **AM:** acetoximetilester
- **AMPc:** adenosín monofosfato cíclico
- **AMPK:** proteína cinasa activada por AMP
- **AMPS:** amonio persulfato
- **ANK:** ankirina
- **ARC:** canales selectivos de calcio regulados por AA
- **ARN:** ácido ribonucleico
- **ARNm:** ARN mensajero
- **ATP:** adenosín trifosfato
- **ATRA:** ácido holo-transretinoico (tretinoína, forma ácida de la vitamina A)
- **AOVE:** aceite de oliva virgen extra
- **Ba²⁺:** ion bario
- **BCA:** ácido bicinconínico
- **BRCA:** gen o proteína de cáncer de mama
- **BrdU:** bromodeoxiuridina
- **BRK:** cinasa de tumor de mama
- **BSA:** albúmina de suero bovino
- **BT474:** línea celular tumoral de glándula mamaria humana
- **BXPC3:** línea celular tumoral de páncreas en humanos
- **Ca²⁺:** ion calcio
- **[Ca²⁺]_c:** concentración de calcio libre citosólico
- **CAD:** dominio activador de CRAC
- **CaM:** calmodulina
- **Cav:** caveolina
- **CDI:** cáncer de mama ductal invasivo
- **CDIS:** cáncer de mama ductal *in situ*
- **CEP:** células epiteliales progenitoras
- **CIF:** factor de influjo de calcio
- **CIRB:** dominio de unión a CaM e IP₃R
- **CICR:** liberación de calcio inducida por calcio
- **CLI:** cáncer de mama lobular invasivo
- **CLIS:** cáncer de mama lobular *in situ*
- **CMD:** dominio modulador de CRAC
- **c-Met:** proteína Met tirosina cinasa o receptor del factor de crecimiento hepatocítico (HGFR)
- **COX:** ciclooxigenasa
- **CPH:** células progenitoras hematopoyéticas
- **CRAC:** canal de calcio activado por la liberación de calcio
- **CTH:** células troncales hematopoyéticas
- **CTID:** dominio inhibidor de C terminal
- **DAD:** detector por red de diodos
- **DAG:** diacilglicerol
- **DCM:** diclorometano
- **DCPA:** 3,4-dicloro propioanilida
- **DES:** dietilestilbestrol
- **DMEM F-12:** medio Eagle modificado por Dulbecco y mezcla de nutrientes Ham's F-12
- **DMEM:** medio Eagle modificado por Dulbecco
- **DMF:** dimetilformamida
- **DMSO:** dimetilsulfóxido
- **DTT (C₄H₁₀O₂S₂):** 1,4-ditiotreitól o reactivo de Cleland
- **DU145:** línea celular tumoral de próstata humana
- **ECC:** entrada capacitativa de calcio
- **EDTA:** ácido etilendiamino tetraacético
- **EFG:** factor de crecimiento epidérmico
- **EGTA:** ácido etilenglicol tetraacético
- **ENCC:** entrada de calcio no capacitativa
- **ERK1/2:** proteína cinasa 1 y 2 regulada por señales extracelulares
- **EVOO (extra virgin olive oil):** AOVE
- **FAK:** cinasa de adhesión focal
- **FBS:** suero fetal bovino
- **FCPC:** cromatografía de partición centrífuga rápida o cromatógrafo centrífugo líquido

- **fMLP**: N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
- **FSC (Forward Scattered Light)**: detector de luz dispersada hacia delante en un pulso de voltaje proporcional al tamaño celular
- **Fura-2/AM**: fura-2 acetoximetil éster
- **GMPc**: guanosín monofosfato cíclico
- **GTP**: guanosín trifosfato
- **HBS**: tampón HEPES salino
- **HDAC6**: deacetilasa histona 6
- **HEFG**: EFG humano
- **HEK293**: células embrionarias de riñón humano 293
- **HEPES**: tampón ácido hidroxietil-piperazinetano
- **HER2**: receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano
- **Hex**: hexano
- **HGF**: factor de crecimiento hepatocítico de mamíferos
- **HGFR**: receptor del HGF
- **HL60**: línea celular tumoral de leucemia mieloide promielocítica humana
- **HPLC**: cromatografía líquida de alto rendimiento
- **HRP**: peroxidasa de rábano picante
- **HS**: suero de caballo
- **Ig**: inmunoglobulina
- **Ig**: inmunoglobulina G
- **IP**: inmunoprecipitación
- **IP₃**: inositol 1,4,5-trifosfato
- **IP₃R**: receptor de IP₃
- **LB**: Tampón Laemmli
- **LMA**: leucemia mieloide aguda
- **LMC**: leucemia mieloide crónica
- **LLA**: leucemia linfoide aguda
- **LLC**: leucemia linfoide crónica
- **LPA**: leucemia promielocítica aguda
- **MAPK**: proteína cinasa activada por mitógeno
- **MCF10A**: línea celular epitelial no tumorigénica de glándula mamaria humana
- **MCF7 (Michigan Cancer Foundation 7)**: línea celular de adenocarcinoma de glándula mamaria humana
- **MDA-MB-231 (cáncer de mama triple negativo)**: línea celular de adenocarcinoma de glándula mamaria humana
- **MIP1α**: proteína inflamatoria 1 α macrófaga
- **Mn²⁺**: ion manganeso
- **MP**: membrana plasmática
- **mTOR**: proteína diana de la rapamicina en células de mamífero
- **Na⁺**: ion sodio
- **NAADP**: nicotinato de adenina dinucleótido fosfato
- **NADP**: nicotadenín dinucleótido fosfato
- **Na₃VO₄**: sodio ortovanadato
- **NCX**: intercambiador sodio/calcio
- **NMDA**: receptores del ácido N-metil-D-aspartico
- **NO**: monóxido de nitrógeno
- **OAG**: 1-oleoil-2-acetil-*sn*-glicerol
- **OASF**: fragmento pequeño activador de Orai
- **PA**: ácido fosfatídico
- **PARP**: poli ADP-ribosa polimerasa escindida
- **PBS**: tampón fosfato salino
- **PC3**: línea celular de cáncer de próstata humana
- **PCR**: reacción en cadena de la polimerasa
- **PDGF**: factor de crecimiento derivado de plaquetas
- **P2X₁**: receptores purinérgicos de las plaquetas
- **PIP₂**: fosfatidil inositol bifosfato
- **PKA**: proteína cinasa A
- **PKC**: proteína cinasa C
- **PKG**: proteína cinasa G
- **PLA2**: fosfolipasa A2
- **PLC**: fosfolipasa C
- **PMCA**: bomba de Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática
- **PR**: receptor de progesterona

- **qPCR:** PCR cuantitativa
- **qRT-PCR:** PCR a tiempo real
- **RE:** retículo endoplasmático
- **RE:** receptor de estrógeno
- **RE⁻:** RE negativo
- **RE⁺:** RE positivo
- **ROCs:** canales iónicos activados por receptor
- **ROS:** especie reactiva de oxígeno
- **RP:** receptor de progesterona
- **RP⁻:** RP negativo
- **RP⁺:** RP positivo
- **RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute):** medio de cultivo celular
- **RT:** temperatura ambiente
- **RTK:** receptor heterodimérico de tirosina cinasa
- **RyR:** receptor de rianodina
- **SAM:** dominio alfa estéril de STIM1
- **SCaMPER:** canal liberador de calcio sensible a esfingolípidos
- **SICS:** síndrome de inmunodeficiencia combinada severa
- **SDS:** dodecilsulfato sódico
- **SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
- **SERCA:** bomba de Ca²⁺- ATPasa del retículo sarco endoplásmico
- **shRNA:** ácido ribonucleico de horquilla pequeña
- **shRNAcv:** vector control de shRNA
- **shTRPC6:** plásmido de silenciamiento del TRPC6
- **siRNA:** ARN pequeño de interferencia
- **SMOCs:** canales iónicos activados por segundos mensajeros
- **SOAR:** región de STIM activadora de Orai
- **SOC (store operated calcium):** canal activado por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca²⁺
- **SOCE (store operated calcium entry):** canales iónicos de calcio operados por la entrada de calcio
- **Sr²⁺:** ion estroncio
- **STAT3:** transductor de señal y activador de la transcripción 3 o factor de transcripción codificado en humanos por el gen *STAT3*
- **STIM1:** *stromal interaction molecule 1*
- **STIM2:** *stromal interaction molecule 2*
- **Sulfo-NHS-LC-Biotin:** sulfosuccinimidil-6-Sulfónico [biotin-amido] hexanoato
- **TBS:** tampón tris salino
- **TBST:** solución salina de trizma con detergente Tween-20
- **TEM:** transición epitelial-mesenquimal
- **TEMED:** tetrametil-etilen-diamina
- **TG:** tapsigargina
- **TM:** membrana
- **TMB:** 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina
- **TPC:** canales de dos dominios de poro
- **TRP (Transient Receptor Potential):** receptor de potencial transitorio
- **TRPA1:** canal catiónico potencial del receptor transitorio, subfamilia A, miembro 1 o potencial receptor transitorio ankirina 1
- **TRPC:** canal catiónico con receptor transitorio en humanos
- **TRPC1:** canal 1 de potencial receptor transitorio
- **TRPC3:** canal 3 de potencial receptor transitorio
- **TRPC6:** canal 6 de potencial receptor transitorio
- **TRPC6dn:** plásmido dominante negativo del TRPC6
- **TRPM:** canal iónico de receptor transitorio melastatina
- **TRPM7:** canal iónico de receptor transitorio melastatina miembro 7
- **TRPP:** receptor transitorio potencial poliquístico
- **TRPV:** canales de cationes con receptores transitorios potenciales del subtipo vaniloide
- **TRPV4:** receptor de potencial transiente subfamilia V, miembro 4
- **VOCs:** canales de calcio activados por voltaje
- **WB:** western blotting

INTRODUCCIÓN



“Las ciencias aplicadas no existen; sólo las aplicaciones de la Ciencia”,

Louis Pasteur.

INTRODUCCIÓN

El ion calcio (Ca^{2+}) y la entrada de éste desde el medio extracelular hasta el citoplasma, a través de canales localizados en la membrana plasmática, juegan un papel muy importante en la fisiología y la fisiopatología de las células animales. Los miembros de las familias de proteínas STIM (STIM1 y STIM2), Orai (Orai1-3) y TRPC (TRPC1-7), modulan la entrada capacitativa de calcio (ECC), principal mecanismo de entrada de calcio en células no excitables. La existencia de un elevado número de isoformas, que aumenta en función de los diferentes *splicing* alternativos que cada proteína puede sufrir, da una idea del control tan preciso que requiere este mecanismo fundamental para el mantenimiento de la salud.

Las células tumorales comparten una serie de características particulares y comunes. De entre ellas, cabe destacar la alta tasa proliferativa, una elevada capacidad de migración, una capacidad alta de invadir órganos y tejidos de manera muy agresiva (metástasis) y la habilidad de formar nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) con el fin de asegurarse el aporte de nutrientes y presentar resistencia a la muerte celular programada o apoptosis. Todos ellos, son procesos que se regulan por la entrada de calcio desde el medio extracelular. Sin embargo, todavía no se tiene un conocimiento preciso del papel de las proteínas STIM, Orai y TRPC en la biología de las células tumorales. El estudio de los ratios de expresión entre las variantes de los componentes de la ECC en células tumorales y sanas no se ha considerado aún, pero su análisis proporcionaría información más actualizada sobre el papel biológico de la ECC en el cáncer.

Dada la importancia de la entrada de Ca^{2+} en la fisiopatología de las células tumorales, el principal objetivo de esta tesis es esclarecer la alteración de los mecanismos que median y regulan la entrada de calcio en los diferentes tipos de cáncer (leucemia y cáncer de mama) y el papel de dichos mecanismos en procesos de proliferación, migración e invasión de dichas células tumorales.

Para ello, empleando modelos de líneas celulares de cultivo no tumorigénicas y tumorales de los diferentes tipos de cáncer estudiados (leucemia y cáncer de mama), hemos investigado las bases moleculares del remodelado de la entrada de Ca^{2+} y de sus principales componentes, las proteínas STIM, Orai y TRPC, en el desarrollo tumoral mediante técnicas fisiológicas, de biología molecular y bioquímicas.

En el primer trabajo demostramos que los canales Orai1 y Orai2 están sobreexpresados en la línea celular de leucemia mieloide aguda HL60, mediando la entrada capacitativa de Ca^{2+} y la migración en estas células. En el segundo trabajo, presentamos evidencias del papel del canal TRPC6 en la regulación de la expresión de los canales Orai1 y Orai3 en la membrana plasmática y su función como modulador de la entrada capacitativa de Ca^{2+} , y por tanto la proliferación, la migración

y la invasión en células tumorales mamarias. En el último trabajo hemos estudiado el papel del oleocantal, un extracto fenólico del aceite de oliva virgen extra, que presenta propiedades antitumorales regulando la expresión del canal TRPC6 en las líneas celulares de cáncer de mama.

Los resultados de esta tesis pueden ayudar a identificar marcadores de diagnóstico o pronóstico del desarrollo tumoral u objetivos potenciales para estrategias quimioterapéuticas.

INTRODUCTION

Calcium (Ca^{2+}) and the entry of this ion from the extracellular medium to the cytoplasm, through channels located in the plasma membrane, play a very important role in the physiology and pathophysiology of animal cells. The members of the STIM protein families (STIM1 and STIM2), Orai (Orai1-3) and TRPC (TRPC1-7), modulate the capacitative calcium entry (CCE), the main calcium entry mechanism in non-excitable cells. The existence of a high number of isoforms, which increases depending on the different alternative splicing that each protein can suffer, gives an idea of the precise control required by this fundamental mechanism for the maintenance of health.

Tumoral cells share some particular and common characteristics or hallmarks. Among them, we can highlight the high proliferative rate, a high ability for migration, a high capacity to invade organs and tissues in a very aggressive way (metastasis) and the ability to form new blood vessels (angiogenesis) in order to ensure the contribution of nutrients and present resistance to programmed cell death or apoptosis. All of them are processes that are regulated by the entry of calcium from the extracellular medium. However, there is still no precise knowledge of the role of STIM, Orai and TRPC proteins in the biology of tumor cells. The study of expression ratios between variants of the CCE components in tumor and healthy cells has not been considered yet, but their analysis would provide more up-to-date information on the biological role of CCE in cancer.

Due to the importance of the Ca^{2+} entry in the pathophysiology of tumor cells, the main objective of this thesis is to clarify the alteration of the mechanisms that mediate and regulate the entry of calcium in different types of cancer (leukemia and breast cancer) and the role of that mechanisms in processes of proliferation, migration and invasion of tumor cells mentioned before.

To do this and using models of non-tumorigenic and tumoral culture cell lines of different types of cancer studied (leukemia and breast cancer), we have investigated the molecular basis of the Ca^{2+} entry remodeling and its main components, STIM, Orai and TRPC proteins, in tumor development through physiological, molecular biology and biochemistry techniques.

In the first work we show that the Orai1 and Orai2 channels are overexpressed in the acute myeloid leukemia cell line HL60, mediating both the capacitative entry of Ca^{2+} and migration in these cells. In the second article, we present evidences of the role of the TRPC6 channel in the regulation of the expression of the Orai1 and Orai3 channels in the plasma membrane and its function as a modulator of the capacitative calcium entry, and therefore proliferation, migration and invasion in mammary tumor cells. In the last study we studied the role of oleocanthal, a phenolic extract of olive extra virgin oil, which has antitumor properties by regulating the expression of the TRPC6 channel in breast cancer cell lines.

The results of this Thesis can help to identify markers of diagnosis or prognosis of tumor development or potential targets for chemotherapeutic strategies.

ANTECEDENTES

BIBLIOGRÁFICOS



“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano”,

Isaac Newton.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1. HOMEOSTASIS DEL CALCIO

El ion calcio (Ca^{2+}) es uno de los segundos mensajeros intracelulares más universales y ampliamente distribuidos en el Reino Animal, constituyendo la señal más versátil de las implicadas en el control de procesos y funciones celulares en eucariotas.

Mediante variaciones en la concentración de Ca^{2+} libre citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) se controlan y regulan un gran número de procesos fisiológicos, entre los que se incluyen respuestas rápidas como la contracción muscular, la motilidad celular (incluyendo movimiento de cilios y flagelos), fecundación, proliferación y apoptosis, regulación de actividades enzimáticas o funciones metabólicas, regulación de las bombas ATPasas iónicas y de componentes del citoesqueleto (filamentos de actina y microtúbulos), secreción y agregación plaquetaria y otras más lentas, como la regulación de la expresión génica, el crecimiento celular y los procesos de quimiotaxis (Berridge, M.J. y cols. 2003; Parkash, J. y cols. 2010).

Son muchas las señales específicas que pueden inducir un incremento súbito de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, de hasta 500-1000 nM, mediante la apertura de canales del retículo endoplásmico (RE) y de la membrana plasmática (MP). La vía más común por la que se incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ es la de la fosfolipasa C (PLC). Diversos receptores de la superficie celular, incluyendo los receptores acoplados a proteínas G y los receptores tirosina cinasa, activan la enzima PLC. Ésta, a su vez, hidroliza al fosfolípido fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) en la membrana, produciendo inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG), dos segundos mensajeros clásicos. El DAG activa la enzima proteína cinasa C (PKC), mientras que el IP_3 difunde en el citosol y se une a su receptor en el RE, el receptor de IP_3 (IP_3R), que actúa como un canal para Ca^{2+} , liberando el ion almacenado en el RE (Mikoshiba, K. 2015).

En mamíferos, este sistema de señalización celular se basa en incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ transitorios, a modo de oscilaciones que están muy localizados en pequeñas zonas del citoplasma conocidas como microdominios subcelulares. Para generar estas oscilaciones, la célula recurre a la liberación controlada de Ca^{2+} previamente almacenado en determinadas organelas internas y/o a la entrada de una parte del Ca^{2+} extracelular al citoplasma, todo ello a través de moléculas especializadas que se localizan en la membrana plasmática y que actúan como canales de Ca^{2+} (Berna-Erro, A. y cols. 2012). En definitiva, la regulación de estas funciones se ve alterada por cambios

en la concentración de Ca^{2+} . La concentración sérica de Ca^{2+} está modulada de manera muy precisa, siendo la concentración de Ca^{2+} total de 2,2-2,6 mM y la del Ca^{2+} iónico de 1,1-1,8 mM. La $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se mantiene normalmente en el rango de 10-100 nM en situación de reposo. Cuando la célula es estimulada, bien por agonistas, bien por estímulos físico-químicos, la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ puede alcanzar concentraciones del orden micromolar (μM) (Parekh, A.B. y cols. 2005). Las concentraciones del medio extracelular y de los depósitos intracelulares (principalmente el RE) son mucho más elevadas, en torno a 1,1-1,8 mM y 1 mM, respectivamente. Esto genera un elevado gradiente electroquímico que la célula deberá contrarrestar a través de una maquinaria celular compleja, encargada de mantener y almacenar el Ca^{2+} en los depósitos o expulsarlo al medio extracelular (Lopez, E. y cols. 2013). Ambos procesos requieren de un gasto energético, ya que los transportadores (ATPasas) situados en la membrana plasmática o en las membranas de los depósitos requieren de moléculas de adenosín trifosfato (ATP) para realizar su función (Furuichi, T. y cols. 1989). Además, hay determinadas proteínas citosólicas, como la calmodulina (CaM) y algunas organelas, como los compartimentos ácidos o las mitocondrias que actúan como tampones de Ca^{2+} . Muchos de los eventos mediados por Ca^{2+} tienen lugar cuando el Ca^{2+} libre citosólico se une y activa a la proteína reguladora CaM. Ésta, por su parte, puede activar proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} /CaM o puede actuar directamente sobre otras proteínas efectoras.

En la célula en reposo, por tanto, la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se mantiene a bajas concentraciones (nM), mientras que cuando las células son estimuladas con determinados agonistas, incrementa de forma rápida hasta alcanzar concentraciones del rango de micromolar (μM). Las células tienen dos fuentes principales de Ca^{2+} , los depósitos intracelulares, principalmente el RE, que constituyen una fuente finita de Ca^{2+} y el medio extracelular, que supone una fuente inagotable de Ca^{2+} para la célula.

Cuando, tras un estímulo, es necesario aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, el ion difunde desde los depósitos intracelulares y se favorece la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de la membrana plasmática. Por otra parte, cuando las células necesitan reducir dicha elevación en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, ponen en marcha mecanismos que reintroducen el Ca^{2+} en los depósitos intracelulares o lo bombean al medio extracelular a través de la membrana plasmática, mediante bombas ATPasas, con el consiguiente gasto energético, para realizar su función (Berridge, M.J. 1997).

En determinados modelos celulares, la cantidad de Ca^{2+} almacenada en el interior celular no es suficiente para desempeñar esas funciones, de manera que las

células activan mecanismos de entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular. Estos mecanismos, requieren la participación de multitud de canales que están regulados por diferentes proteínas, las cuales van a modular la apertura o cierre de dichos canales, controlando así la homeostasis del Ca^{2+} intracelular (Parekh, A.B. y cols. 2005).

Una vez que la concentración de Ca^{2+} aumenta transitoriamente en el citoplasma, ésta ejerce efectos reguladores alostéricos de muchas enzimas y proteínas. Además, el ion Ca^{2+} puede actuar en la transducción de señales tras su entrada al citoplasma desde el medio extracelular, como resultado de la activación de canales iónicos localizados en la MP o como un segundo mensajero liberado desde depósitos intracelulares, fundamentalmente desde el RE, mediante las vías de transducción de señales en las que participan los receptores de membrana acoplados a proteínas G.

El principal mecanismo de entrada de Ca^{2+} extracelular en células no excitables es la entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC), modulada por las familias de proteínas STIM, Orai y TRPC. La ECC está regulada por el estado de relleno de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} y su vaciamiento induce la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de la activación de los canales CRAC (compuestos exclusivamente por STIM1 y Orai1) y de los canales SOC (formados por STIM1, Orai1 y TRPC1) (Figura 1). La proteína STIM1 ha sido identificada como el sensor de Ca^{2+} del RE y la activadora de los canales en la MP; la proteína Orai1 como el componente principal del canal que media las corrientes I_{CRAC} , corriente de Ca^{2+} activada por la liberación de Ca^{2+} (del inglés *Ca²⁺-release-activated Ca²⁺ current*) y la primera corriente capacitativa descrita; y a los homólogos en mamíferos de los canales TRP (*Transient Receptor Potential*) de *Drosophila* como canales permeables a cationes que generan otro tipo de corriente capacitativa no selectiva para Ca^{2+} , denominada I_{SOC} , entrada de Ca^{2+} operada por los depósitos (SOCE, del inglés *Store-Operated Calcium Entry*) (Rosado, J.A. 2017).

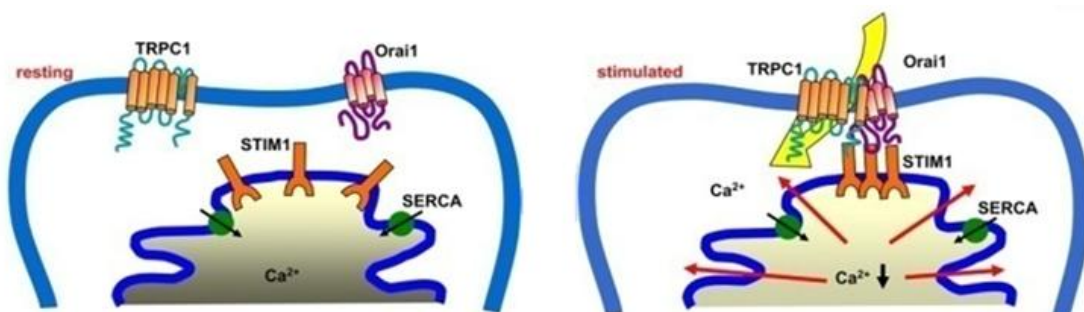


Figura 1. Esquema de la disposición de los canales TRPC1 y Orai 1 y STIM1 (Ong, H.L. y cols. 2007).

1.1. MECANISMOS QUE AUMENTAN LA $[Ca^{2+}]_c$

La liberación de Ca^{2+} desde los compartimentos intracelulares produce un incremento en la $[Ca^{2+}]_c$. Sin embargo, determinados procesos celulares, así como el relleno de los depósitos internos, requieren un incremento mayor y sostenido en la $[Ca^{2+}]_c$, por lo que los mecanismos de entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular tienen también un papel esencial en la fisiología celular.

Estos mecanismos pueden ser divididos a su vez en dos subgrupos: los que liberan el Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares y los que permiten la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular.

1.1.1. Liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares

En la membrana plasmática, cuando se produce la unión de un agonista a su receptor, se activa la PLC, que generará dos segundos mensajeros intracelulares como el IP_3 y el DAG. El IP_3 va a liberar Ca^{2+} desde el RE a través de la unión a su receptor localizado en la membrana de dicho orgánulo, que cambia su conformación permitiendo la salida masiva de Ca^{2+} al citoplasma (Streb, H. y cols. 1983). Por su parte, el DAG activa la PKC (Berridge, M.J. 1997).

a) Receptores de IP_3 (IP_3R): fueron descritos por primera vez por Furuichi (Furuichi, T. y cols. 1989). Se encuentran localizados en la membrana del RE (además de en la membrana nuclear, en el aparato de Golgi y en las vesículas secretoras) y cuando son activados por el IP_3 , sufren un cambio conformacional, de tal manera que permiten la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares (Berridge, M.J. y cols. 2003). En su estructura presentan tres dominios: un dominio N-terminal (de unión al IP_3), un dominio regulador de unión para ATP y residuos susceptibles de fosforilación y un dominio C-terminal con seis regiones transmembrana, responsables de la agregación de las cuatro subunidades necesarias para formar el canal activo (Chadwick, C.C. y cols. 1990; Taylor, C.W. y cols. 1991). Una elevada concentración de Ca^{2+} en el lumen del RE hace que el IP_3R sea muy sensible a IP_3 , disminuyendo esta sensibilidad tras el vaciamiento de los depósitos (Missiaen, L. y cols. 1991). Por otra parte, estos canales están regulados por la $[Ca^{2+}]_c$ de forma que, ante incrementos en esta $[Ca^{2+}]_c$ (300-600 nM), el IP_3R se abre y permite que se libere Ca^{2+} (Bezprozvanny, I. y cols. 1991). Por último, el ATP tiene un efecto dual sobre el IP_3R , actuando como co-activante hasta una concentración de ATP de 4 nM

e inhibiendo la apertura de los mismos a concentraciones de ATP superiores, lo cual se debe posiblemente a competición al sitio de unión del IP₃ (Bezprozvanny, I. y cols. 1993).

- b) Receptores de rianodina (RyR):** se localizan en el RE y tanto en estructura como en función, son similares al IP₃R. Los RyR se activan por rianodina a concentraciones inferiores a 10 μM, cafeína, ADP ribosa cíclica y por Ca²⁺ a concentraciones menores de 1 mM, produciendo un proceso de liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ (CICR). La calmodulina (CaM) actúa como modulador de este canal, anulando incluso el efecto conjunto que produce la rianodina, el ADP y la cafeína (Endo, M. 2009).
- c) Receptores del nicotinato de adenina dinucleótido fosfato (NAADP):** el NAADP, derivado desaminado del nicotiadénin dinucleótido fosfato (NADP) y sintetizado por la propia célula en la mitocondria, es un mensajero capaz de liberar Ca²⁺ de los depósitos ácidos (endosomas, lisosomas y vesículas secretoras), liberándolo de forma independiente al IP₃ y a la ADP ribosa cíclica (ADPRc) al DAG (Lopez, J.J. y cols. 2005), a través de sus receptores, identificados recientemente como los canales de dos dominios de poro (TPC) (Patel, S. y cols. 2010; Zhu, M.X. y cols. 2010) (Dionisio, N. y cols. 2011).
- d) Canal liberador de Ca²⁺ sensible a esfingolípidos (SCaMPER):** este canal libera Ca²⁺ intracitoplasmático, como respuesta a la unión de lípidos derivados de la esfingosina, cuya concentración se incrementa ante factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). No se conocen aún las funciones fisiológicas que producen su apertura (Young, K.W. y cols. 2000).

Además de por estos canales situados en las membranas de los depósitos intracelulares de Ca²⁺, la concentración de este ion está regulada por una serie de proteínas existentes en estos depósitos que son capaces de unir el Ca²⁺ en su estructura. Algunas de estas proteínas son la calsecuestrina o la calreticulina.

1.1.2. Entrada de Ca²⁺ desde el medio extracelular

Al activarse ciertas funciones celulares como las destacadas anteriormente mediante la generación de la señal de Ca²⁺, las células requieren que se llegue a una [Ca²⁺]_c sostenida y prolongada y en muchos casos no es suficiente con el Ca²⁺ acumulado en los depósitos para completar este requerimiento. Es por ello que la entrada de Ca²⁺ desde el medio extracelular a través de canales de membrana es esencial para la fisiología de la célula. En la membrana plasmática existen diferentes canales permeables

a Ca^{2+} que presentan diferentes propiedades biofísicas. Según el tipo celular, existen distintos mecanismos para activar esta entrada de Ca^{2+} .

a) Entrada de Ca^{2+} activada por voltaje (VOCs): se produce sobre todo en células eléctricamente excitables, como neuronas, células cardíacas, células musculares y muchas células endocrinas. En estos tipos celulares, la apertura de estos canales se produce tras una despolarización de la membrana que permite la entrada breve de Ca^{2+} desde el medio extracelular. Estos canales están regulados por receptores y mensajeros intracelulares (McDonald, T.F. y cols. 1994). Recientemente, se ha descubierto que el canal activado por voltaje Cav1.2, es además regulado por la región SOAR de STIM1, que activa la apertura de Orai1, uno de los canales de Ca^{2+} más importantes activados por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} (Wang, Y. y cols. 2010).

En células no excitables, la entrada de Ca^{2+} se produce a través de canales iónicos activados por segundos mensajeros (SMOC), por receptor (ROC) o por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} (SOC).

b) Entrada de Ca^{2+} activada por segundos mensajeros (SMOCs): fisiológicamente, algunos segundos mensajeros (DAG) inducen la apertura de canales (TRPC3 y TRPC6) sensibles a moléculas producidas tras la activación de un receptor en la membrana, que permite el flujo de cationes monovalentes o divalentes. Algunas de estas moléculas son el IP_4 en células endoteliales, la PKC en plaquetas o el DAG en diversos tipos celulares (Irvine, R.F. y cols. 1999; Jardin, I. y cols. 2008; Rosado, J.A. y cols. 2000).

c) Entrada de Ca^{2+} activada por receptor (ROC): estos canales operados por receptor son muy ubicuos y se sitúan principalmente en células secretoras y en las terminaciones nerviosas. Este tipo de entrada se produce por la unión de un agonista, generalmente neurotransmisores como el glutamato, ATP o ADP al dominio extracelular del receptor ionotrópico. Algunos ejemplos de ROC son los receptores del ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), que en respuesta al glutamato se abren (Benarroch, E.E. 2011) o los receptores purinérgicos de las plaquetas P2X_1 (P-2X_1), que se abren tras ser activados por ATP (Gachet, C. 2008).

- d) Entrada de Ca^{2+} activada por el vaciamiento de los depósitos intracelulares (SOC):**
 esta entrada se produce tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} y es uno de los principales mecanismos de entrada de Ca^{2+} en células no excitables, estando regulado por el estado de relleno de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} . Este mecanismo de entrada de Ca^{2+} en la célula será explicado con mayor detalle en el siguiente apartado.

1.2. MECANISMOS QUE DISMINUYEN LA $[\text{Ca}^{2+}]_c$

Una vez realizada la función celular que requería el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, las células necesitan recuperar sus concentraciones basales de Ca^{2+} para evitar la activación de procesos apoptóticos que conllevarían a la muerte celular como consecuencia de un exceso de Ca^{2+} en el citosol. Además, algunos de estos procesos permanecen activados de forma continua para mantener la pequeña $[\text{Ca}^{2+}]_c$ característica de una célula en reposo. Los mecanismos que disminuyen la concentración de Ca^{2+} se pueden agrupar en: los que devuelven el Ca^{2+} a los depósitos intracelulares y los que expulsan el Ca^{2+} al exterior. Todo tipo de transporte de Ca^{2+} citoplasmático requiere el uso de bombas e intercambiadores (Berridge, M.J. 2005).

1.2.1. Bomba ATPasa de Ca^{2+} del RE (SERCA)

En el proceso de recuperación de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basal, tiene especial importancia el papel que desempeña la bomba ATPasa de Ca^{2+} del RE (SERCA) (Figura 3). Esta bomba, es un polipéptido de 110 kDa que se localiza en las membranas de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} , hacia donde lo reintroduce en un proceso realizado en contra de gradiente con el consecuente consumo de ATP como forma de energía. En el lumen presenta pequeños dominios con forma de lazo, diez dominios de hélice transmembrana y en su parte citosólica, presenta tres dominios principales:

- Dominio de fosforilación (P), en los residuos Asp351 y Asp703
 - Dominio de unión a nucleótidos (N)
 - Dominio ejecutor (A), al que se une el Ca^{2+} y favorece los cambios conformacionales de la proteína.
- } Sitio catalítico

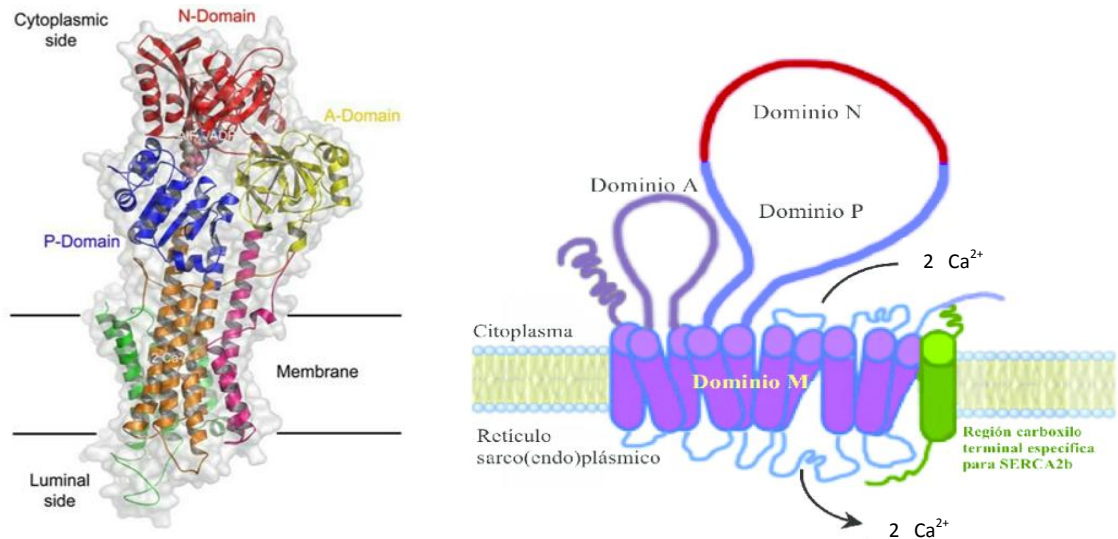


Figura 3. Dominios de la bomba SERCA. (Figuras obtenidas de Contreras-Leal, E. y cols 2010).

Cuando SERCA une dos iones Ca^{2+} en su dominio citosólico, sufre un cambio conformacional que permitirá que el ATP ceda un fósforo al residuo Asp351, el cual induce el cambio conformacional de SERCA, de forma que queda el dominio A en el lumen del almacén de Ca^{2+} y los sitios de unión de Ca^{2+} pierden su afinidad por el ion, liberándolo. Dicho dominio queda orientado hacia el lumen del almacén de Ca^{2+} , donde disminuye la afinidad de los sitios de unión a Ca^{2+} por el ion, liberándolo en el interior. La disociación de los iones de Ca^{2+} causará la hidrólisis del fósforo en el residuo de aspartato (Asp, D), de forma que se produce un nuevo cambio en la estructura proteica, en la que el dominio A volverá a situarse en el citoplasma (Toyoshima, C. 2008).

Esta disociación induce un nuevo cambio de conformación por el cual SERCA retorna a su estado inicial (Periasamy, M. y cols. 2007).

Se han identificado tres genes diferentes que dan lugar a las isoformas SERCA1, SERCA2 y SERCA3 y a una diversidad adicional de variantes de estas isoformas mediante *splicing* alternativo (Pozzan, T. y cols. 1994).

La regulación de esta bomba es llevada a cabo por la proteína de membrana fosfolamban, de un tamaño aproximado de 6 kDa, que inhibe la actividad de SERCA1 y SERCA2, reduciendo así su afinidad por Ca^{2+} , (Simmernan, H.K. y cols. 1998), pero no inhibe la actividad de SERCA3 por bloqueo de su sitio activo. Esta inhibición se relaja cuando fosfolamban es fosforilada por PKA o proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} y CaM (CaM cinasa II) (Metcalf, E.E. y cols. 2005). La desfosforilación de fosfolamban inhibe SERCA.

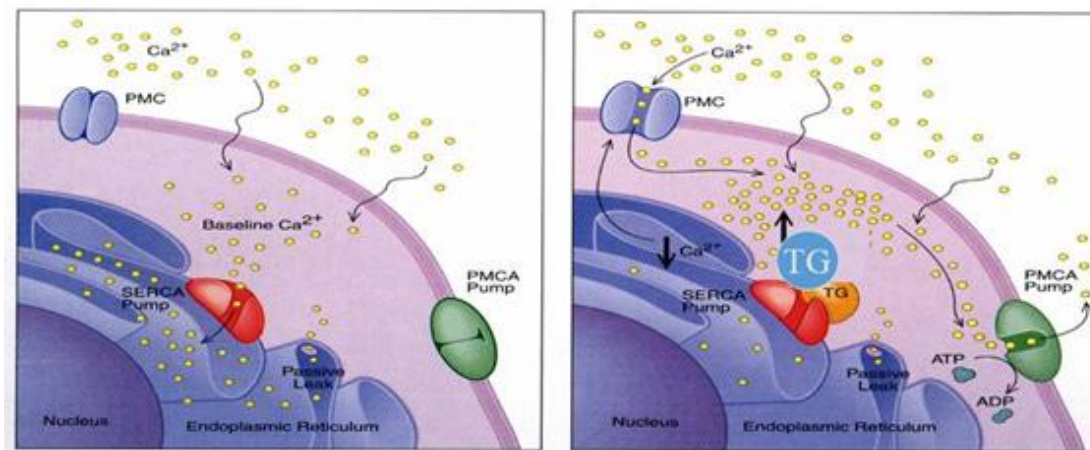


Figura 4. Inhibición de la bomba SERCA por TG. La bomba ATPasa de Ca^{2+} del RE transfiere Ca^{2+} desde el citosol hacia el lumen del RE (Chen, D. y cols. 2017).

El inhibidor farmacológico más selectivo de SERCA (Figura 4) que se conoce no afecta a otras bombas de Ca^{2+} y se denomina con el nombre de taspigargina (TG) (Thastrup, O. y cols. 1989), una lactona sesquiterpénica que lleva a la proteína a un estado inactivo irreversible. Otros inhibidores menos específicos son el vanadato, que sólo inhibe a la bomba SERCA a concentraciones superiores a $20 \mu\text{M}$ (Caroni, P. y cols. 1981); el lantano, que inhibe la formación de fosfoproteína SERCA (Wuytack, F. y cols. 1992); el ácido ciclopiazónico, de carácter inhibitorio reversible y la 2,5-di (ter-butil)-1,4-hidroquinona (TBHQ), de actuación similar a la primera pero con potencia de inhibición variable en función de las diferentes isoformas de SERCA (Cavallini, L. y cols. 1995), de manera que es uno de los inhibidores más versátiles para analizar la funcionalidad de las diferentes isoformas de SERCA.

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

La extrusión de Ca^{2+} al medio extracelular se lleva a cabo principalmente mediante la bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP de la membrana plasmática (PMCA) (Figura 5). Presenta una estructura y funcionalidad similar a las de la bomba SERCA, con diez dominios transmembrana (TM), que se localizan en los extremos amino y carboxilo en la parte citoplasmática de ésta. En el bucle localizado entre el dominio TM4 y TM5 se encuentra el dominio catalítico, que incluye el sitio de unión a ATP. El extremo C presenta una larga cola de aminoácidos (aa) (70-200 aa) y además, se localiza el sitio de unión a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, constituyendo el principal dominio regulador de PMCA (Penniston, J.T. y cols. 1998), así como otros dominios de unión a moléculas como fosfolípidos ácidos y proteínas cinasas como PKA y PKC (Strehler, E.E. y cols. 2001). Uno de los

principales factores moduladores de la PMCA es el propio ion Ca^{2+} . Así, después del aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la velocidad de salida de Ca^{2+} a través de la PMCA también aumenta (Bautista, D.M. y cols. 2002).

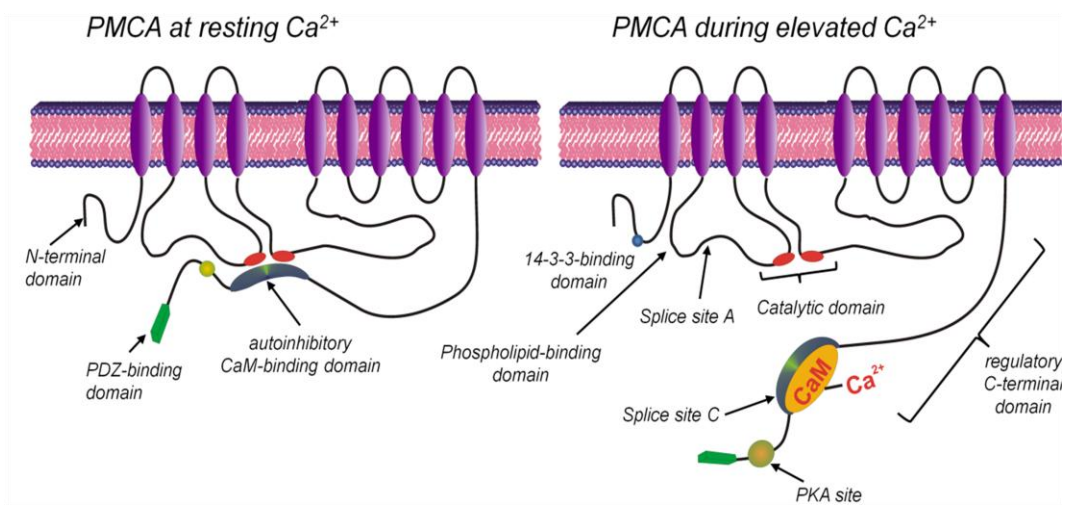


Figura 5. Modelo de la bomba ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) como regulador de la vía de transducción de señales. La PMCA extrae Ca^{2+} de la célula y genera un microambiente donde las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ intracelular son muy bajas. La interacción con los dominios intracelulares de PMCA une las proteínas asociadas a este microambiente con bajo contenido de Ca^{2+} , lo que resulta en una regulación a la baja de la actividad enzimática de las proteínas dependientes de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. (Holton, M.L. y cols. 2010).

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

Este intercambiador (Figura 6) es una proteína localizada en la membrana plasmática que también contribuye al proceso de eliminación de Ca^{2+} hacia el medio extracelular. Presenta un tamaño aproximado de 108 kDa. Está constituido por once dominios TM, con sus extremos N y C orientados hacia el citosol. Está constituido por un péptido inicial (M0), seguido de cinco regiones TM (M1-M5), un bucle intracelular grande donde se localizan tanto el sitio de unión a Ca^{2+} como el sitio de inactivación de Na^+ y seis regiones TM más (M6-M11) con el extremo C en el citoplasma.

Este tipo de proteína de membrana se regula por proteínas cinasas de la familia de la PKA y PKC (Blaustein, M.P. y cols. 1999).

El intercambio de estos iones es electrogénico, es decir, transporta el ion Ca^{2+} hacia el exterior de la célula empleando para ello el gradiente del ion Na^+ . De esta manera, usa la energía almacenada como gradiente electroquímico de Na^+ , con una estequiometría 3 Na^+ :1 Ca^{2+} (por cada tres cationes Na^+ que incorpora al citosol, saca un

1.3. FINALIZACIÓN DE LA SEÑAL DE Ca^{2+}

Una vez producido el estímulo, la movilización de Ca^{2+} y la respuesta, la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma debe disminuir (20 nM) y los almacenes de Ca^{2+} deben rellenarse para responder al siguiente estímulo. Asimismo, el exceso de Ca^{2+} debe expulsarse al medio extracelular. Además de estos mecanismos que están encauzados a reducir la concentración de Ca^{2+} , se debe cortar la señal que ha causado el vaciamiento de los reservorios y la apertura de los canales. Para que la célula metabolice el IP_3 , ésta utiliza dos vías. En la primera de ellas, el IP_3 es desfosforilado a inositol 1,4-bisfosfato (IP_2) por la acción de una enzima 5-fosfatasa o bien, es fosforilada por una enzima 3-cinasa, obteniéndose IP_4 . El DAG es inactivado rápidamente por fosforilación a través de la enzima DAG cinasa, transformándose en ácido fosfatídico (PA), un precursor de la biosíntesis de fosfolípidos.

Una vez que la célula es activada por un agonista y se ha producido el incremento en $[Ca^{2+}]_c$, se producirá la inhibición de la adenilato ciclasa (AC) y por lo tanto, la disminución de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) (Adunyah, S.E. y cols. 1987). Cuando el estímulo y la señal de Ca^{2+} cesan, la AC empieza a sintetizar AMPC de forma rápida, activando la proteína cinasa A (PKA) o también conocida como proteína cinasa dependiente de AMPC, la cual inhibirá la fosfolipasa C (PLC) y fosfolipasa asociada a lipoproteína (PLA_2), así como la polimerización de actina (Jardin, I. y cols. 2009). Al mismo tiempo, tiene lugar la síntesis de guanosín monofosfato cíclico (GMPC) por monóxido de nitrógeno (NO), lo cual activará la proteína cinasa G (PKG) o también llamada proteína cinasa dependiente de guanosín monofosfato cíclico (GMPC) (Moore, C. y cols. 2010).

La siguiente figura (Figura 7), representa el modelo de interacción entre las proteínas Orai, STIM y TRPC. Los TRPC son estabilizadores en un estado inactivo cuando interactúan con las proteínas Orai. La señalización del receptor causa una rápida disociación de Orai-TRPC, promoviendo su activación. Esta activación, inducida por el agotamiento de Ca^{2+} de los depósitos, hace que queden atrapados los complejos TRPC-STIM-Orai, así como la disociación del Ca^{2+} luminal de STIM. El agrupamiento de STIM-Orai se asocia con TRPC activados y estabilizan su conformación en un estado en el que opera como un canal I_{CRAC} .

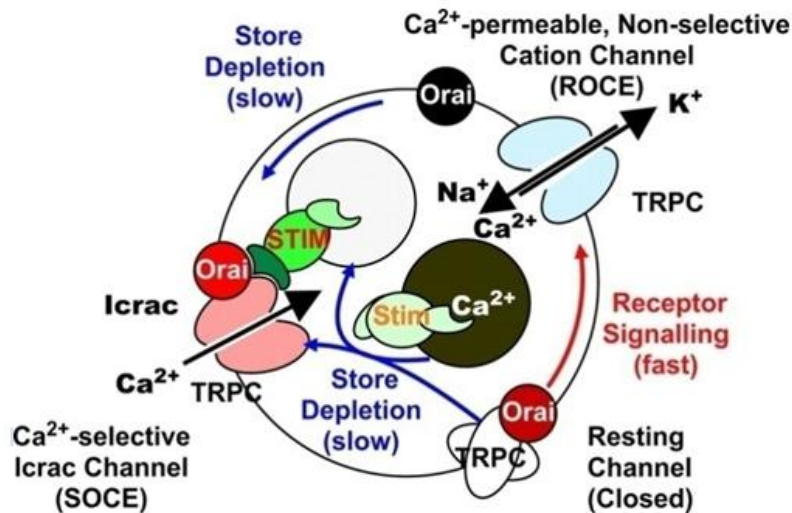


Figura 7. Esquema de los canales SOCE, Orai, STIM y TRPC (Liao, Y. y cols. 2008).

2. ENTRADA CAPACITATIVA DE Ca²⁺ (ECC)

Fue descrita por vez primera en 1986 por Putney (Putney, J.W., Jr. 1986), quien observó que una vez vaciados los reservorios intracelulares de Ca²⁺, se origina la apertura de los canales de Ca²⁺ que se localizan en la membrana plasmática, los cuales estaban cerrados cuando la célula se encontraba en reposo. Estos canales permitirán una entrada masiva de Ca²⁺ al citoplasma, así como el relleno de los depósitos de Ca²⁺ y el cierre de los canales bloqueando la entrada de Ca²⁺ (Putney, J.W., Jr. 1986). La ECC también tiene un papel importante en células excitables (Dominguez-Rodriguez, A. y cols. 2012; Koss, D.J. y cols. 2013; Xia, J. y cols. 2014). Originalmente, se propusieron cuatro modelos (Fig. 8) para explicar la ECC:

A. Modelo difusible: Sugiere que, al producirse el vaciamiento de los depósitos, se generan moléculas que activan los canales SOC en la membrana plasmática y se inicia la ECC. Las posibles moléculas difusibles que se propusieron para este modelo fueron cambios en la concentración citosólica de GMPc (Pandol, S.J. y cols. 1990), algunas tirosinas cinasas (Sargeant, P. y cols. 1993) o pequeñas proteínas unidas a guanosín trifosfato (GTP) (Bird, G.S. y cols. 1993; Fasolato, C. y cols. 1993), la generación de un producto del citocromo P450 (Alvarez, J. y cols. 1992), algún producto derivado del metabolismo de la mitocondria, algunas vías de Ca²⁺ dependientes de CaM o el factor del influjo de Ca²⁺ (CIF), un factor no proteico aún no caracterizado (Parekh, A.B. y cols. 1997). Sin embargo y tras la imposibilidad de identificar esta molécula, este modelo se fue abandonando.

B. Modelo de acoplamiento conformacional constitutivo: Este modelo establece que hay una interacción entre los IP₃R en el RE y los canales de membrana plasmática una vez que se produce el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca²⁺. Para que se produzca esta interacción, el RE debe situarse cerca de la membrana plasmática (Berridge, M.J. 1995).

C. Modelo de acoplamiento conformacional *de novo*: Tomando como base el modelo propuesto por Berridge, Rosado et al., propusieron una modificación a éste, en la cual estaba involucrado el tráfico de membranas en las células. Así, una vez vaciados los depósitos intracelulares, el RE, que no está situado cerca de la membrana plasmática, se acerca a ésta con ayuda del citoesqueleto de actina, de forma que se produce la interacción entre los IP₃R y los canales de Ca²⁺ en la membrana plasmática (Rosado, J.A. y cols. 2000).

D. Modelo de secreción: Este modelo sugiere que, una vez producido el vaciamiento de los depósitos de Ca²⁺, se produce una translocación e inserción de canales ya formados desde el RE hasta la membrana plasmática (Fasolato, C. y cols. 1993). Esto se apoya en diferentes trabajos que demuestran que la ECC necesita la colaboración de proteínas involucradas en el tráfico y fusión de vesículas con la membrana plasmática (Yao, Y. y cols. 1999).

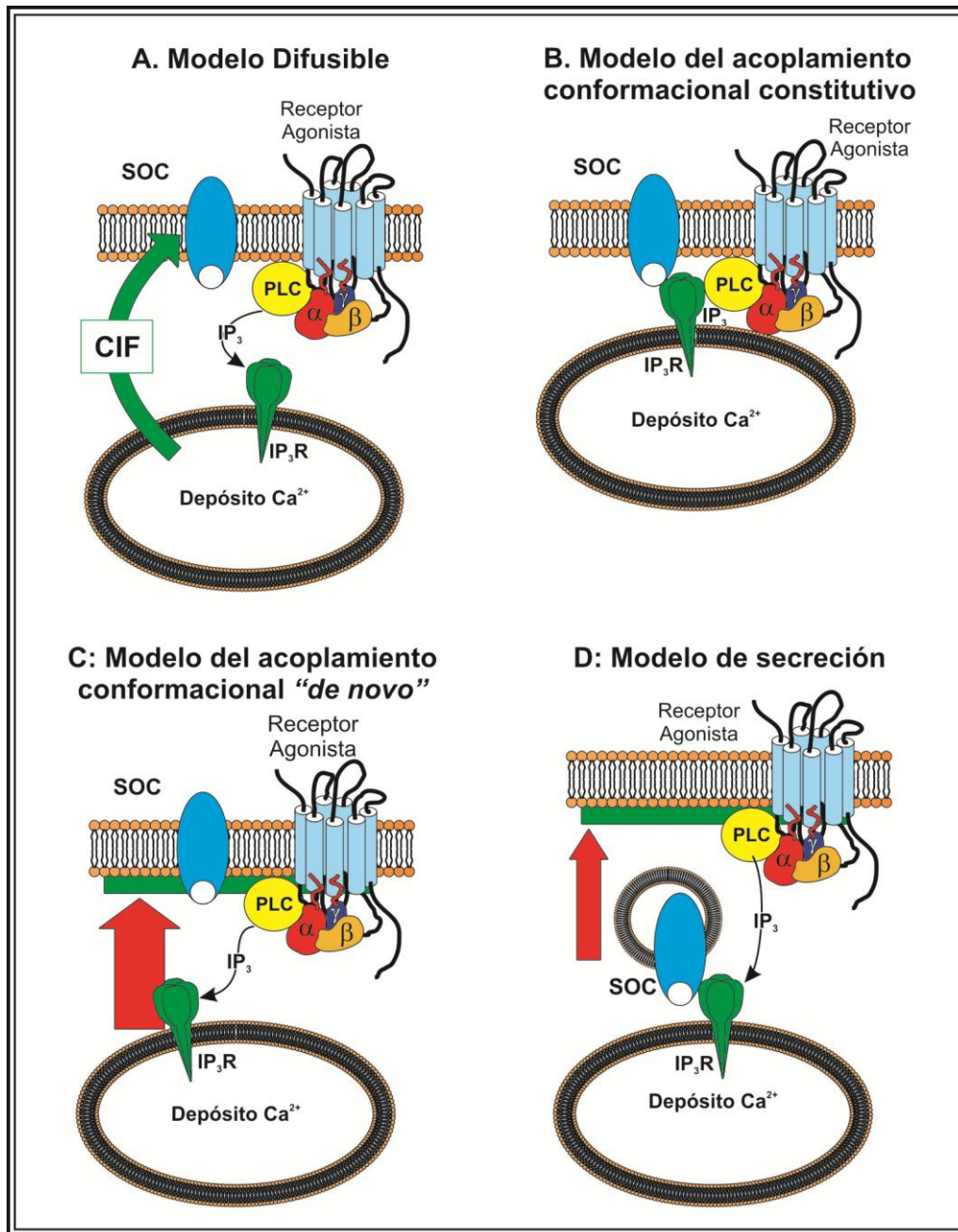


Figura 8. Modelos propuestos para la ECC (Tomada de la Tesis Doctoral "Complejos STIM-Orai1-TRPC en la entrada de Ca^{2+} en plaquetas humanas", 2011).

Las proteínas involucradas en la ECC y el paso de información desde el RE hasta los canales de la membrana plasmática se han ido investigando en los últimos años, como es el caso del sensor de Ca^{2+} del RE, STIM1, que fue descrito en 2005, de manera que estas hipótesis tuvieron que ser reconsideradas y reformuladas. La ECC es un mecanismo complejo en el que se encuentran involucradas diferentes proteínas que interactúan entre sí.

La entrada capacitativa de calcio (ECC) o entrada de Ca^{2+} activada por el vaciamiento de los depósitos intracelulares, es un mecanismo que promueve una entrada de Ca^{2+} extracelular al citoplasma una vez se han vaciado o agotado las reservas de Ca^{2+} almacenadas en sus depósitos intracelulares, tales como el retículo endoplasmático (RE) o almacenes de naturaleza acídica. A nivel molecular, unas moléculas sensoras de Ca^{2+} alojadas en las membranas de estos almacenes, llamadas STIM1 y STIM2, detectan la reducción del contenido de Ca^{2+} almacenado y activan los canales de Ca^{2+} , CRAC y SOC localizados en la membrana plasmática (Lopez, J. y cols. 2012) y formados por las proteínas de la familia Orai (Orai1, 2 y 3) y algunos miembros de la subfamilia de canales TRPC, tales como TRPC1, TRPC3 y TRPC6 (Berna-Erro, A. y cols. 2012; Salido, G.M. y cols. 2011). La ECC participa básicamente en el relleno de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , cuyo agotamiento llevaría a la célula a un estado patológico (Mekahli, D. y cols. 2011) y en vías de señalización intracelular dependientes de Ca^{2+} (Berna-Erro, A. y cols. 2012). La función fisiológica de la ECC es extremadamente importante, ya que personas que poseen una deficiencia hereditaria en la ECC presentan un cuadro clínico muy similar al síndrome de inmunodeficiencia combinada severa (SCID), el cual se caracteriza por un fallo generalizado de las defensas inmunológicas que resulta fatal si no se realiza un trasplante de médula ósea a tiempo. Este síndrome inmunológico, va acompañado de deficiencias motoras de origen muscular o nervioso y de otras deficiencias asociadas, indicando que la ECC es también importante para la fisiología de otros tejidos (Berna-Erro, A. y cols. 2012). En estos últimos años se viene demostrando, de manera incipiente, que la ECC participa en distintos aspectos funcionales de las células cancerosas o tumorales.

2.1. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA ENTRADA DE Ca^{2+}

Una vez que el agonista se une a su receptor de membrana acoplado a proteínas G, se produce la activación de la PLC, que hidroliza PIP_2 y lo transforma en IP_3 y DAG. El IP_3 , por su parte, se une a su receptor localizado en el RE dando lugar a un cambio conformacional en el mismo que permitirá la liberación desde el RE al citosol, desencadenándose así la activación de varias rutas (Berridge, M.J. 1995). La liberación de Ca^{2+} almacenado en los depósitos, provoca que el Ca^{2+} que se encontraba unido al dominio *EF-hand* de STIM1 se separe, provocando un cambio conformacional en STIM1 que activa los canales de la membrana plasmática. En reposo, STIM1 tiene ocultos los dominios *coiled-coil* por los que se activa a Orai1 y el dominio rico en prolina (Pro, P) que

activa a TRPC1. El cambio de conformación sufrido por STIM1 le permite, en primer lugar, formar homómeros con otras moléculas de STIM1 y heterómeros con moléculas de STIM2. Estas uniones se formarán mediante el dominio SAM, situado en el extremo amino (N) de las STIMs (Muik, M. y cols. 2011). Una vez que se han vaciado los reservorios de Ca^{2+} , ambas proteínas se reorganizan en regiones del RE próximas a las balsas lipídicas de la membrana plasmática, microdominios con un alto contenido en colesterol y esfingolípidos (Pani, B. y cols. 2008). La interacción entre STIM1 y Orai1 se produce en puntos muy concretos y localizados de la célula, denominados regiones punctae, donde la separación entre la membrana plasmática y el RE es menor de 100 nm (Liou, J. y cols. 2005; Baba, Y. y cols. 2006). STIM1 se une a Orai1 mediante los dominios *coiled-coil* de los extremos carboxilo (C) de ambas proteínas y el dominio SOAR de STIM1 activa Orai1, permitiendo la entrada de Ca^{2+} desde el exterior (Yuan, J.P. y cols. 2009). Así mismo, STIM1 se une a la membrana por su dominio K en el extremo C-terminal, de forma que estabiliza las uniones con las proteínas de membrana. Este mismo dominio es esencial para la activación de los canales TRPC1 y TRPC3 mediante interacción electrostática (Yuan, J.P. y cols. 2007). Se ha visto que STIM1 se transloca a la membrana plasmática una vez que se han vaciado los depósitos (Lopez, J.J. y cols. 2006; Zhang, S.L. y cols. 2005) y que STIM1 es necesario en la membrana plasmática para las. Hay autores que se oponen a la idea de la translocación de STIM1 a la membrana plasmática y sugieren que como la distancia entre las membranas del RE y la membrana plasmática es muy pequeña (100 nm), STIM1 actuaría como si estuviera en la membrana plasmática cuando en realidad se sitúa en el RE (Mercer, J.C. y cols. 2006; Soboloff, J. y cols. 2006). Actualmente, se cree que la falta de detección de STIM1 en la membrana plasmática en modelos celulares transfectados con STIM1 se debe a la conjugación de STIM1 con proteínas fluorescentes, que de algún modo, impedirían la expresión de STIM1 en la membrana plasmática. Existen dos poblaciones de STIM1, en la membrana del RE (la primera identificada) y en la membrana plasmática. El papel de STIM1 localizada en la membrana plasmática estaría relacionada con la modulación de la entrada de Ca^{2+} a través de canales capacitativos (Jardin, I. y cols. 2009) y canales regulados por AA (ácido araquidónico) (Zhang, X. y cols. 2014).

2.1.1. STIM1 (*Stromal Interaction Molecule 1*)

Es una proteína que fue identificada en 2005 como el sensor de Ca^{2+} del RE responsable de la comunicación del estado de relleno del mismo a los canales SOC de la membrana plasmática (Liou, J. y cols. 2005; Roos, J. y cols. 2005; Zhang, S.L. y cols. 2005). STIM1 (Figura 9) es una proteína muy ubicua que contiene 685 aminoácidos (aa) y cuya masa molecular está alrededor de 90 kDa. Se expresa en la mayoría de las células animales y posee diferentes dominios tanto en el extremo amino (N) como en el extremo carboxilo (C). En el extremo N, localizado en el lumen, diferenciamos:

Dominio EF-hand, que comprende los aa 76-87 y actúa como sensor de Ca^{2+} . La afinidad de este dominio por el Ca^{2+} es muy baja (0,5-1 mM) (Stathopoulos, P.B. y cols. 2009), de forma que, con los depósitos llenos, la alta concentración de Ca^{2+} en el interior de los mismos favorece la unión, pero una vez que se produce el vaciamiento de estos depósitos y la concentración de Ca^{2+} disminuye en el RE, queda libre el dominio EF-hand. Cuando esto sucede, STIM1 sufre un cambio conformacional que le permitirá unirse y activar a los canales en la membrana plasmática (Liou, J. y cols. 2005). La mutación del dominio EF-hand (D76A) y su incapacidad para unir Ca^{2+} favorece una ECC constitutiva que puede ser letal para la célula (Deng, X. y cols. 2009).

Dominio alfa (α) estéril (SAM), por el que STIM1 forma homómeros (Stathopoulos, P.B. y cols. 2006). Esta proteína tiene una masa molecular de 75 kDa y posee una región transmembrana altamente conservada. Este dominio está implicado en la respuesta conformacional de STIM1 al vaciamiento de los depósitos.

STIM1 presenta un único dominio transmembrana altamente conservado (Soboloff, J. y cols. 2006). En el extremo carboxilo (C), localizado en el citoplasma, STIM1 tiene varios dominios importantes. De entre ellos, destacamos:

Dominios coiled-coil (CC), son tres (CC1, aa238-343; CC2, aa 363-389; CC3, aa 363-389) y participan en la oligomerización de STIM1.

SOAR (STIM1 Orai1-activating region), comprende los aa 344-442 (Yuan, J.P. y cols. 2009). Es la región más pequeña con capacidad de activar la ECC sin tener que vaciar los depósitos.

OASF (Orai-activating small fragment), comprende los aa 233-474 (Muik, M. y cols. 2009).

CAD (*CRAC-activating domain*), comprende los aa 342-448 (Park, C.Y. y cols. 2009).

CMD (*CRAC-modulatory domain*), contiene los aa 448-530 que interaccionan con un sitio para calmodulina en el extremo N de Orai1 (Mullins, F.M. y cols. 2009) e interacciona a su vez con residuos de glutamato (Glu, E) conservados en el extremo C de los tres Oraís que regula la inactivación rápida de Orai1 por Ca^{2+} (Lee, K.P. y cols. 2009) (Yuan, J.P. y cols. 2009).

Dominio polibásico rico en lisina (Lys, K), aa 671-685 facilita la unión de STIM1 a la membrana plasmática (Hogan, P.G. y cols. 2010; Liou, J. y cols. 2007) y activa la apertura de los canales TRPC (Huang, G.N. y cols. 2006).

Región rica en serina/prolina (Ser/Pro), aa 600-629.

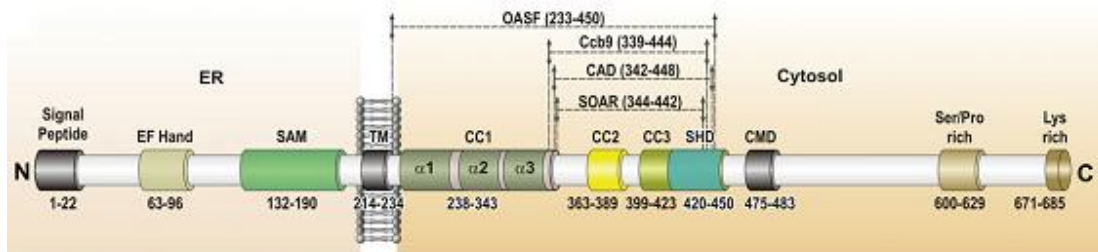


Figura 9. Representación esquemática de la estructura de STIM 1 humano (Jardin, I. y cols. 2016).

El fragmento citosólico de STIM1 contiene varios dominios funcionales que son relevantes para la activación de la ECC, entre los que se incluyen un **dominio CMD** (*CRAC-modulatory domain*), que constituye un mecanismo de retroalimentación negativo para la entrada de Ca^{2+} induciendo la inactivación rápida de los canales Orai1 dependiente de Ca^{2+} (Derler, I. y cols. 2009); un **dominio inhibidor CTID** (*C-terminal inhibitory domain*) que regula la interacción de la proteína inhibidora de STIM1 con el SOAR (región de STIM1 activadora de Orai1), evitando la activación constitutiva de la ECC (Jha, A. y cols. 2013) y una región de STIM1 activadora de Orai1 o **SOAR**, la cual fue descrita simultáneamente por diferentes laboratorios que coincidían en las regiones esenciales pero diferían en algunos aa.

Así, el OASF incluye los tres dominios *coiled-coil*; la región SOAR presenta las mínimas regiones esenciales para la interacción STIM1/Orai1; el dominio CAD desempeña un papel importante en la agrupación de los canales Orai1/CRAC y el CC9, que se localiza entre los aa 339-446 (Kawasaki, T. y cols. 2009; Muik, M. y cols. 2009; Park, C.Y. y cols. 2009; Stathopoulos, P.B. y cols. 2013; Yuan, J.P. y cols. 2009).

La corriente I_{CRAC} (Ca^{2+} release activated current) fue la primera corriente de entrada de Ca^{2+} generada por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} que se caracterizó y al mismo tiempo, la más estudiada por técnicas electrofisiológicas (Yuan, J.P. y cols. 2009; Zhang, S.L. y cols. 2005). La secuencia rica en serina/treonina (Ser/Thr) de STIM1 ha sido identificada como un sitio de multimerización e interacción con Orai1 (Srikanth, S. y cols. 2010). STIM1 también posee muchos sitios de fosforilación que pueden ser usados por diversas proteínas cinasas para regular las variaciones de Ca^{2+} en distintos estadios celulares como la mitosis, en la que la fosforilación de STIM1 inhibe la ECC (Smyth, J.T. y cols. 2009). STIM1 también puede ser fosforilada por la cinasa regulada extracelularmente ERK1/2, que puede controlar la interacción entre STIM1 y Orai1 (Pozo-Guisado, E. y cols. 2010).

Pese a que la principal localización de STIM1 se encuentra en la membrana del RE, un pequeño porcentaje de esta proteína se localiza en la membrana plasmática. No obstante, su función no está clara totalmente, aunque se haya descrito que podría participar en la regulación de los canales SOC actuando como sensor de Ca^{2+} del espacio extracelular a través del dominio *EF-hand* orientado al medio externo (Jardin, I. y cols. 2009; Spassova, M.A. y cols. 2006). Además, se ha descubierto recientemente que la fracción de STIM1 localizada en la membrana plasmática es necesaria para la activación de los canales ARC, un tipo de canales no capacitativos regulados por ácido araquidónico (AA). Este tipo de canales son heteromultímeros formados por tres subunidades de Orai1 y dos subunidades de Orai3 (Shuttleworth, T.J. y cols. 2007; Zhang, X. y cols. 2014).

En fibras de músculo humano adulto y en miotubos diferenciados *in vitro* se ha identificado una variante más larga de STIM1, obtenida por *splicing* alternativo, denominada STIM1L (Figura 10) con el fin de diferenciarla de la forma convencional STIM1. STIM1L fue originado por *splicing* alternativo del exón 11 y contiene 106 residuos extra (aa 515-620) insertados en la región citosólica, un dominio de unión de actina, permitiendo a STIM1L interactuar con Orai1 para formar un grupo permanente (Darbellay, B. y cols. 2011). Mientras que STIM1 se expresa de forma ubicua, STIM1L lo hace en el músculo esquelético humano (Horinouchi, T. y cols. 2012), así como en corazón y cerebro de ratón (Darbellay, B. y cols. 2011) y en cardiomiocitos de rata neonata (Luo, X. y cols. 2012). La expresión tanto de STIM1 como de STIM1L, disminuye en los cardiomiocitos de rata adulta, donde la concentración de su expresión está regulada bajo patología cardíaca por hipertrofia (Luo, X. y cols. 2012).

Se ha asociado la función de STIM1L a una activación máxima de SOCE en células de músculo esquelético (<1s) en comparación con otras células donde la activación

completa de SOCE requiere de varios segundos (> 5s en plaquetas humanas (Redondo, P.C. y cols. 2006)) y hasta 260 s en otros tipos celulares (Liou, J. y cols. 2007; Parekh, A.B. y cols. 2005). Inicialmente, se encontró que STIM1 permitía una activación rápida de SOCE y se requería para desencadenar señales de Ca^{2+} citosólicas repetitivas (Darbellay, B. y cols. 2011). La activación rápida de SOCE en células que expresan STIM1L fue propuesta para que la interacción entre STIM1L y Orai1 incluso cuando los depósitos de Ca^{2+} estaban llenos. Se sugirió que esta interacción se estabilizaba por la asociación de filamentos de STIM1L-actina, ya que se descubrió que la despolimerización de la actina altera los complejos de STIM1L-Orai1 en reposo, lo que retrasa la activación de SOCE (Darbellay, B. y cols. 2011). Estudios más recientes han revelado que tanto STIM1 como STIM1L están distribuidos a lo largo de las vesículas del RE, mientras que los canales Orai1 están localizados en la MP.

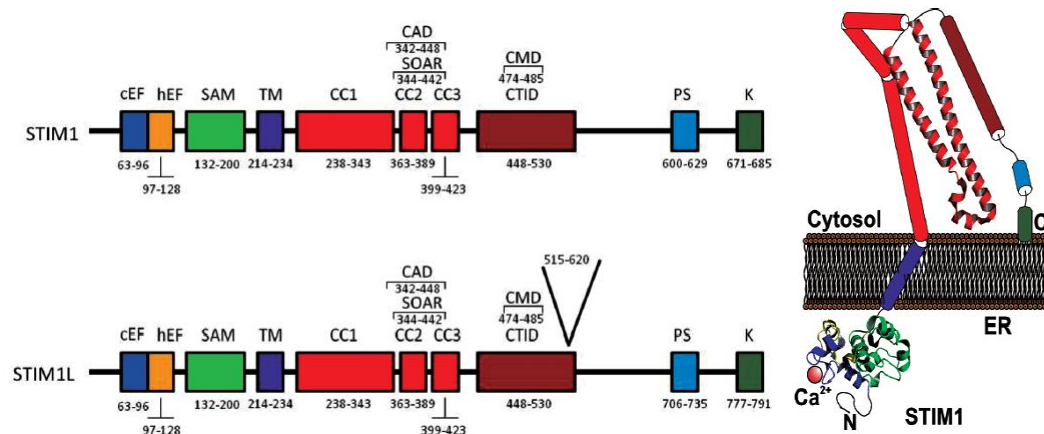


Figura 10. Estructura molecular de las variantes de STIM1 y STIM1L (Rosado, J.A. y cols. 2015).

Además, se ha demostrado que STIM1L modula la entrada de Ca^{2+} independiente de los depósitos a través de los canales TRPC (TRPC3 y TRPC6). En células HEK293 que expresan de forma estable STIM1L del receptor de endotelina A, se observó que la expresión del receptor de Ca^{2+} operada por el receptor a través de TRPC3 y TRPC6 es más fuerte que la estimulación por interacción con ambos canales (Horinouchi, T. y cols. 2012). La sobre-expresión de STIM1 y STIM1L no modificó las concentraciones de expresión de TRPC3 y TRPC6. Aunque STIM1L exhibe una mayor capacidad de unirse a TRPC3 y TRPC6 que STIM1 (Horinouchi, T. y cols. 2012), se podría sugerir que el reclutamiento de estos canales en el conjunto de señales dependientes de los depósitos, el mecanismo preciso involucrado en la supresión de la entrada de Ca^{2+} , operada por el receptor e independiente de los depósitos, por STIM1 y STIM1L en este modelo celular aún no ha sido aclarado.

2.1.2. STIM2 (*Stromal Interaction Molecule 2*)

Es el segundo miembro de la familia de proteínas STIM. Se expresa de forma ubicua en humanos, aunque a niveles menores que STIM1. Sin embargo, al contrario que STIM1, la localización de STIM2 es exclusivamente en la membrana del RE (Williams, M.R. y cols. 2001). Tanto STIM1 como STIM2 (Figura 11) son proteínas estructuralmente similares, pero funcionalmente difieren en que la participación de STIM2 en la ECC no está completamente demostrada y parece ser dependiente en gran medida del tipo celular estudiado. Así, en plaquetas humanas y murinas, parece tener un menor efecto en la ECC, comparado con STIM1 (Gilio, K. y cols. 2010), mientras que en otros tipos celulares, como neuronas murinas o células dendríticas, STIM2 desempeña una función importante en la ECC (Bandyopadhyay, B.C. y cols. 2011; Berna-Erro, A. y cols. 2009).

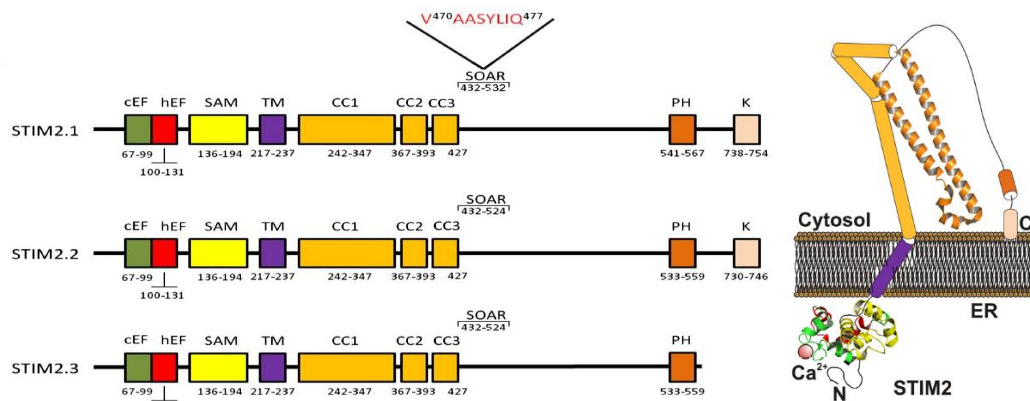


Figura 11. Estructura molecular de las variantes de STIM2 (Rosado, J.A. y cols. 2015).

2.1.3. Orai1 (también conocida como CRACM1)

Fue descrita en 2006 como proteína formadora del poro del canal que conduce la corriente I_{CRAC} , no activada por cambios de voltaje y altamente selectiva para Ca^{2+} . La identificación de esta proteína como parte del canal se consiguió al estudiar la mutación puntual Orai1^{R91W}, codificada por el gen *FLK14466* del cromosoma 12 humano, que da lugar a una enfermedad conocida como el síndrome de inmunodeficiencia combinada severa (SICS), caracterizado por la deficiencia de corrientes I_{CRAC} en células T (Feske, S. y cols. 2006), esto es, suprime tanto la entrada de Ca^{2+} como las corrientes I_{CRAC} en células T.

Se ha propuesto que la proteína Orai1 está formada por un hexámero y forma el canal que media la corriente I_{CRAC} , una corriente no activada por cambios en el voltaje y

altamente selectiva para Ca^{2+} (Hou, X. y cols. 2012; Parekh, A.B. y cols. 2005). Esta proteína, además, forma complejos de canales de iones multiméricos en la membrana plasmática y se encuentra regulada por el vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} intracelulares y mediada por la participación de STIM1 (Vig, M. y cols. 2006).

Orai1 (Figura 12) es una pequeña proteína de un tamaño aproximado de 38 kDa de la membrana plasmática, aunque se han descrito algunas localizaciones intracelulares como reservorios que pueden ser insertados en la membrana plasmática durante la estimulación de las células con agonistas (Woodard, G.E. y cols. 2008). Está compuesta de 301 aa, lo que se traduce en una masa molecular de unos 33 kDa, pero que puede ser mayor debido a que es sensible de ser glicosilada. Estructuralmente presenta ambos extremos en el citoplasma, tanto el dominio amino (N) como el carboxilo (C), cuatro dominios transmembrana (TM) y el poro está situado entre el segundo y el tercer dominio. En el extremo N presenta dos dominios ricos en prolina (Pro, P), un dominio rico en arginina (Arg, R) y un dominio muy próximo al primer dominio transmembrana que es rico en arginina/lisina (Arg, R/Lys, K). Además, posee un sitio de unión a calmodulina (CaM) antes de la primera región transmembrana, la cual produce la inactivación del canal al unirse (Mullins, F.M. y cols. 2009). En el extremo C presenta un dominio *coiled-coil* por el que se une al extremo carboxilo de STIM1 (Muik, M. y cols. 2009; Park, C.Y. y cols. 2009; Yuan, J.P. y cols. 2009).

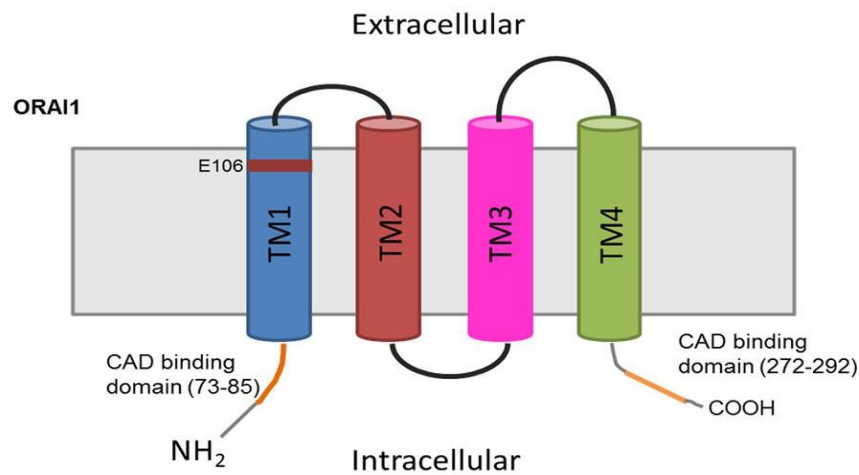


Figura 12. Topología de Orai1. Cada monómero de Orai1 consiste de 4 dominios transmembrana (TM1-TM4) y presenta dominios de unión CAD en los dominios amino y carboxilo terminales del citosol. E106 es el residuo crucial que confiere selectividad del canal al Ca^{2+} . (Moccia, F. y cols. 2015).

Orai1 también posee dominios estructurales que pueden formar un canal de Ca^{2+} muy selectivo, en concreto, el residuo de glutamato (Glu, E) (E106) ha sido descrito como el filtro que define la selectividad del canal a Ca^{2+} (Rothberg, B.S. y cols. 2013)

(Moccia, F. y cols. 2015), al igual que el residuo de glutamina (Gln, Q) (Q108) y tres residuos de aspartato (Asp, D) (D110, D112 y D114) que forman la región acumuladora de Ca^{2+} en la proximidad del poro (Frischauf, I. y cols. 2015). Según esto, al realizar la mutación puntual E106A o D112, la ECC se bloquea de forma completa y con las mutaciones Q108A y D110A la ECC se reduce (Vig, M. y cols. 2006). Además, se ha descubierto que ciertos residuos del dominio ETON (*Extended transmembrane Orai1 N-terminal*) contribuyen a la unión de Orai1 con STIM1 así como a la activación de este último (Derler, I. y cols. 2013) (Figura 13).

Se ha determinado la expresión de dos variantes de Orai1, éstas son Orai1 α y Orai1 β . Se ha demostrado que ambas se expresan de forma ubicua en líneas celulares humanas como HEK293, células T Jurkat, HeLa, línea celular T84 de carcinoma de pulmón o células epidermales HaCaT, mostrando una localización celular similar (Fukushima, M. y cols. 2012).

Orai1 α es la variante convencional de 301 aa (~33 kDa, aunque la masa molecular predicha podría estar alterada significativamente debido a modificaciones como glicosilaciones en el residuo de asparagina (Asn, N) en la posición 223 (Gwack, Y. y cols. 2007) o fosforilaciones en residuos de serina (Ser, S) en las posiciones 27 y 30 (Kawasaki, T. y cols. 2010).

La variante corta de Orai1, es decir, Orai1 β , se genera por iniciación de translaciones alternativas desde una metionina (Met, M) en la posición 64 y posiblemente también en la posición 71, obteniendo así una proteína de 23 kDa, aproximadamente.

La secuencia anterior al inicio de translación de Orai1 β incluye un motivo rico en prolina (Pro, P) que previamente se sugirió poder ser importante para la activación de Orai1 mediada por STIM1 (Takahashi, Y. y cols. 2007) y una secuencia rica en arginina (Arg, R) que se ha visto que está involucrada en la interacción de Orai1 con fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) de la membrana plasmática que podría ser importante para la movilidad de Orai1 en la membrana (Calloway, N. y cols. 2011).

Un estudio reciente realizado por Desai y cols. (Desai, P.N. y cols. 2015) reveló que ambas variantes de Orai1 podrían ser subunidades de los canales CRAC operados por los depósitos intracelulares y los canales SOC, con algunas diferencias biofísicas que incluyen una fuerte inactivación de Orai1 α dependiente de Ca^{2+} . Sin embargo, la diferencia funcional más significativa entre las variantes de Orai1 mencionadas radica en la participación de Orai1 α pero no de Orai1 β en los canales ARC. (Desai, P.N. y cols.

2015), aunque los mecanismos moleculares existentes bajo esa significativa diferencia biológica de ambas variantes no está muy clara.

Existen dos formas homólogas de Orai1, Orai2 y Orai3, que pueden formar complejos heteromultiméricos con Orai1 (Lis, A. y cols. 2007). Orai1, Orai2 y Orai3 son capaces de formar canales operados por los depósitos intracelulares que comparten una similitud altamente selectiva para el Ca^{2+} . En contraste, canales formados por los tres homólogos exhiben ligeras diferencias de selectividad por el ion Na^+ (Lis, A. y cols. 2007).

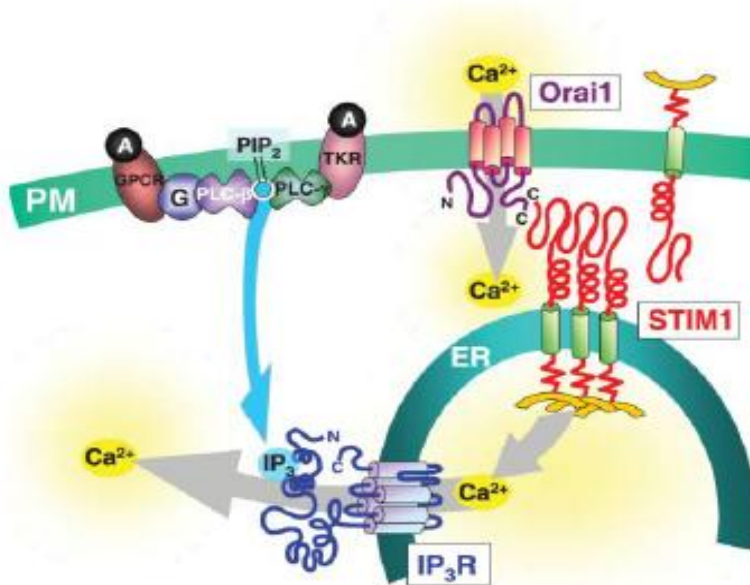


Figura 13. Esquema representativo de los elementos que participan en la ECC (Wang, Y. y cols. 2008).

2.1.4. Orai2

Como proteína Orai, forma el canal del poro para Ca^{2+} situado en la membrana plasmática y está asociado a los mecanismos de entrada de Ca^{2+} operada por los depósitos. Muchos estudios recientes acerca de los genes y proteínas ORAI usan la nomenclatura CRACM, sin embargo, la mayoría de los estudios actuales usan Orai para describir los genes *ORAI1*, *ORAI2* y *ORAI3*, que codifican para las proteínas Orai1, Orai2 y Orai3 de 28-33 kDa (Lis, A. y cols. 2007). Las proteínas Orai están localizadas en la MP y son funcionales formando tetrámeros (Ji, W. y cols. 2008; Penna, A. y cols. 2008).

Además de los tres homólogos de Orai, existen dos variantes de Orai originados por *splicing* identificados en ratón, que son Orai2 corto (Orai2S) y Orai2 largo (Orai2L). Orai2S es fuertemente sensible a la inactivación por Ca^{2+} intracelular y juega un papel

dominante negativo en la formación de canales de Ca^{2+} cuando se co-expresa con Orai1 (Gross, S.A. y cols. 2007).

Las células de mamífero expresan tres subunidades de poro diferentes. La secuencia de aminoácidos de Orai1 y Orai2, presentan aproximadamente un 60% de homología; Orai3 presenta una homología del 63% con Orai1 y del 66% con Orai2. En los dominios transmembrana los porcentajes de homología son incluso mayores, llegando al 90% (Feske, S. 2009; Hewavitharana, T. y cols. 2007). Las tres isoformas están expresadas en linfocitos T humanos (Lioudyno, M.I. y cols. 2008); sin embargo, un defecto familiar en Orai1 resulta en una patología conocida como síndrome de inmunodeficiencia combinada severa (SICS), incluso en presencia de Orai2 y Orai3 normales expresados en estas células. Esto sugiere que Orai2 y Orai3 no pueden sustituir la función de Orai1, al menos, en este caso (Baba, Y. y cols. 2009). Debería notarse que en células donde la expresión de Orai1 ha sido silenciado con RNAsi, pequeñas señales de SOCE mediadas por Orai2 u Orai3 son aún evidentes (Gwack, Y. y cols. 2007; Lis, A. y cols. 2007). Cuando todas estas proteínas Orai se co-expresan con STIM1, dan lugar a robustas corrientes internas rectificadas.

Las isoformas Orai1-3 son permeables a Ca^{2+} y a algunos cationes divalentes como el bario (Ba^{2+}), estroncio (Sr^{2+}) (Lis, A. y cols. 2007; Scrimgeour, N. y cols. 2009).

2.1.5. TRPs

En los años 90 se propuso que en mamíferos, los homólogos de los receptores de potencial transitorio (TRP, *transient receptor potential*) de *Drosophila*, podrían ser los posibles canales mediadores de la ECC (Birnbaumer, L. y cols. 1996; Rosado, J.A. y cols. 2001). El nombre que reciben estos canales es debido a una mutación en éstos que induce potenciales de membrana transitorios por la entrada de iones como sodio (Na^+) y calcio (Ca^{2+}), en lugar de los potenciales sostenidos que se producen en los canales no mutados (Hardie, R.C. y cols. 1992). En mamíferos se han identificado seis subfamilias de canales TRP: TRPC, TRPA, TRPV, TRPM, TRPML y TRPP, cada una de las cuales está constituida por diferentes isoformas. Por ejemplo, la subfamilia TRPC (TRP canónico) está formada por siete canales (TRPC1-TRPC7), que se activan una vez producida la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) tras la estimulación con diversos agonistas en diferentes tipos celulares (Montell, C. 2005; Parekh, A.B. y cols. 2005). Sin embargo, no todos los TRPCs participan en la ECC, sino que también funcionan como canales en otros tipos de entrada de Ca^{2+} no capacitativa (ENCC). La corriente que se

genera por los canales TRP es un tipo de corriente capacitativa no selectiva para Ca^{2+} que se la conoce con el nombre de I_{SOC} (*store-operated calcium current*) (Parekh, A.B. y cols. 2005). Los principales canales TRP son los que se explican a continuación:

TRPC1: es el TRP más estudiado, puesto que fue el primer homólogo de los TRPs de *Drosophila* descrito en mamíferos. Se trata de un polipéptido de 793 aa que es expresado en la mayoría de los tejidos humanos (Wes, P.D. y cols. 1995; Zhu, X. y cols. 1995).

Presenta la estructura típica de los miembros de la familia TRPC, consistente en seis dominios transmembrana (TM) con el poro permeable a cationes situado entre el quinto y el sexto dominio. En el extremo amino (N) citosólico posee cuatro repeticiones de ankirina (ANK), necesarias para la interacción con otros TRPCs, un dominio *coiled-coil*, necesario para la unión entre diferentes subunidades de TRPC1 y un sitio de unión para caveolina 1 (Cav-1) (Vazquez, G. y cols. 2004), que es una proteína adaptadora y reguladora que actúa como nexo entre las interacciones de las proteínas en la membrana plasmática y los lípidos (Cohen, A.W. y cols. 2004). Por su parte, el extremo carboxilo (C) que también es citosólico, contiene el dominio típico de los TRP (EWKFAR), además de un dominio rico en prolina (Pro, P) altamente conservado, otro dominio de unión a CaM e IP_3R llamado CIRB, el cual modulará la activación de TRPC1 dependiente de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Tang, J. y cols. 2001) y una región *coiled-coil* donde se encuentra insertado un segundo dominio de unión a CaM, implicado en la inactivación del TRPC1 dependiente de Ca^{2+} (Singh, B.B. y cols. 2002). A pesar de que la implicación de TRPC1 en la entrada de Ca^{2+} operada por receptores está ampliamente aceptada, su implicación en la ECC parece estar reservada a ciertos modelos celulares. Es por ello que numerosos estudios han demostrado que TRPC1 tiene un papel fundamental en el desarrollo de la ECC de muchos tipos celulares, como cardiomiocitos, megacariocitos, mioblastos, fibroblastos o plaquetas, entre otros (Almirza, W.H. y cols. 2012; Galan, C. y cols. 2009; Lopez, E. y cols. 2013; Ohba, T. y cols. 2007; Olah, T. y cols. 2011; Rosado, J.A. y cols. 2002; Xu, S.Z. y cols. 2001). Sin embargo, existen varios estudios en los que el canal TRPC1 nativo no funciona como canal capacitativo (Sinkins, W.G. y cols. 1998), demostrando así que la implicación de los canales TRPC en la ECC depende del tipo celular objeto de estudio.

TRPC3 (Figura 14): esta proteína contiene 848 aa y se localiza en la membrana plasmática. Estructuralmente, es muy similar al resto de miembros de la familia TRPC, aunque con algunas particularidades. Ambos dominios, tanto el amino (N) como el carboxilo (C), se sitúan en el citoplasma. En el extremo N, tiene los cuatro dominios repetidos de ANK, el dominio *coiled-coil* y el sitio de unión a caveolina, además, presenta un sitio de unión a la PLC γ en el primer dominio de ANK y una unión para VAMP2 entre los dominios ANK3 y ANK4 (Eder, P. y cols. 2007). En su extremo C tiene el dominio CIRB, acabando en un dominio *coiled-coil*. Al igual que otros TRPCs, el TRPC3 forma heterotetrámeros y participa en la ENCC activada por agonistas, cuyos receptores están acoplados a proteínas G, poniendo en marcha la maquinaria de hidrólisis de PIP $_2$ generando DAG, activándose así el canal. También se ha demostrado que el canal TRPC3 también está implicado en la ECC y puede ser activado por el vaciamiento de los reservorios intracelulares en determinados modelos celulares (Montell, C. 2001; Trebak, M. y cols. 2003; Zhu, X. y cols. 1996).

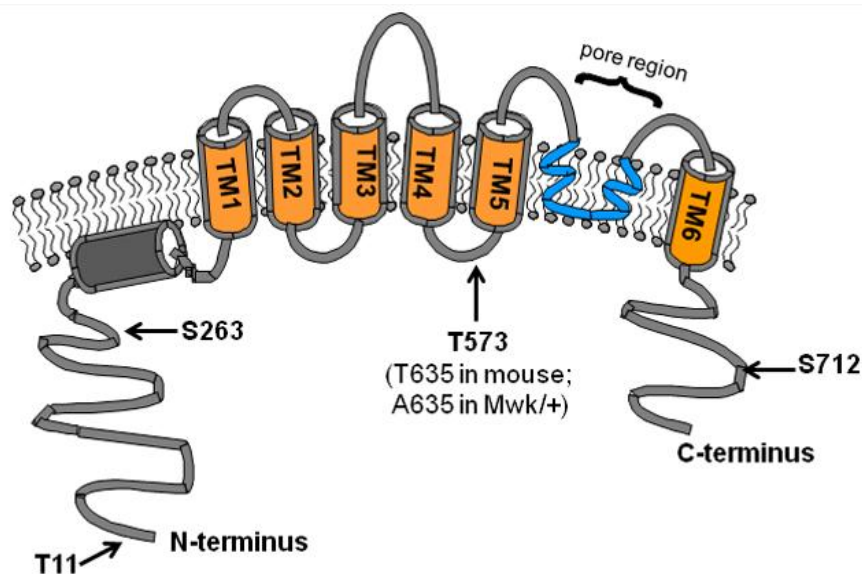


Figura 14. Estructura del canal TRPC3. TRPC3 tiene un dominio amino (N) y carboxilo (C) terminales citoplasmáticos, seis regiones transmembrana (TM), la región del poro (entre TM5 y TM6), un segmento hidrofóbico que no parece abarcar la membrana plasmática y cuatro repeticiones similares a ANK en la región N-terminal citoplasmática. Se muestra la localización de diferentes residuos fosforilados por la PKC (Ser 712, S712) y por PKG (Treonina 11, T11 y Ser 263, S263). Treonina 573 (T573) es el equivalente humano de Treonina 635 (T635) en ratón (Trebak, M. 2010).

TRPC6 (Figuras 15-18): se trata de un polipéptido de 931 aa cuya estructura es la característica de la familia TRPC. Presenta los dominios N y C en el citoplasma, la estructura EWKFAR y los seis dominios TM, con el poro entre el quinto y sexto dominio. En el extremo N presenta los cuatro dominios de ANK y el dominio *coiled-coil*, pero a diferencia de TRPC1 y TRPC3, TRPC6 no tiene sitios de unión para Cav-1. En el extremo C presenta un dominio rico en prolinas (Pro, P) con un sitio de unión para CIRB y un dominio *coiled-coil* final (Eder, P. y cols. 2007). El canal TRPC6 es seis veces más selectivo a Ca^{2+} que a Na^+ y presenta dos sitios de glicosilación en el primer y segundo bucle extracelulares que determinan el funcionamiento de TRPC6 como un canal operado por receptor, siendo activado directamente por el segundo mensajero DAG, por la fosforilación en residuos serina (Ser, S) y tirosina (Tir, Y) o por efecto de algunos fosfoinosítidos (Dietrich, A. y cols. 2003). El TRPC6 también es regulado por muchas señales, incluyendo el PIP_2 o el vaciamiento de los almacenes de Ca^{2+} intracelulares (Hofmann, T. y cols. 1999; Jardin, I. y cols. 2008).

En ciertos modelos celulares, cuando el canal TRPC6 tiene un comportamiento no capacitativo se encuentra formando un complejo con el canal TRPC3 en regiones independientes de las balsas lipídicas de la membrana plasmática, donde se localizan los complejos de señalización característicos de la ECC. Sin embargo, cuando los depósitos intracelulares de Ca^{2+} se vacían, TRPC6 se disocia de TRPC3 permitiendo la interacción con las principales proteínas implicadas en la ECC, como STIM1, Orai1 y TRPC1, funcionando en estos casos como canal capacitativo (Brechard, S. y cols. 2008; Jardin, I. y cols. 2008). En definitiva, el canal TRPC6 actúa como punto de convergencia entre las vías capacitativas y no capacitativas de entrada de Ca^{2+} .

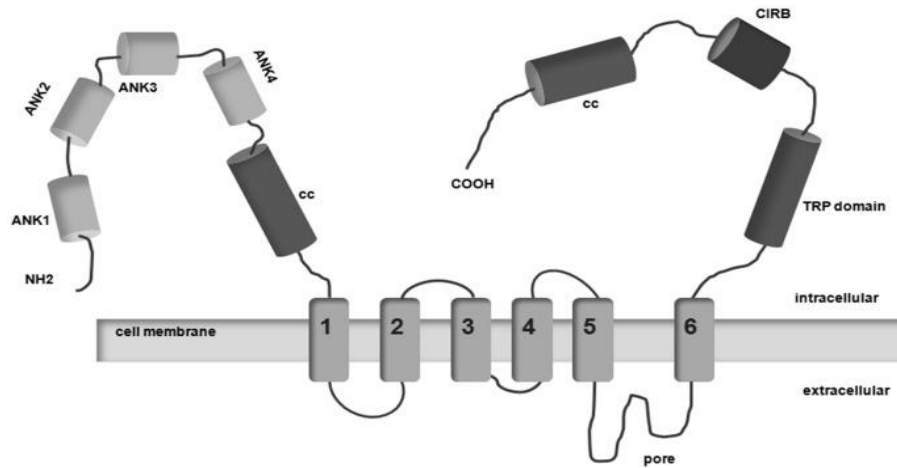


Figura 15. Estructura del canal TRPC6. El TRPC6 pertenece a la gran familia de los canales TRP que contiene seis dominios transmembrana, una región que forma un poro y un largo dominio amino y carboxilo terminales intracelulares. Se requieren cuatro subunidades que se agrupan para que el canal sea funcional. TRP: transient receptor potential; ANK: ankirina; cc: dominio coiled-coiled; CIRB: dominio de unión CaM/IP₃R. (Hofstra, J.M. y cols. 2014).

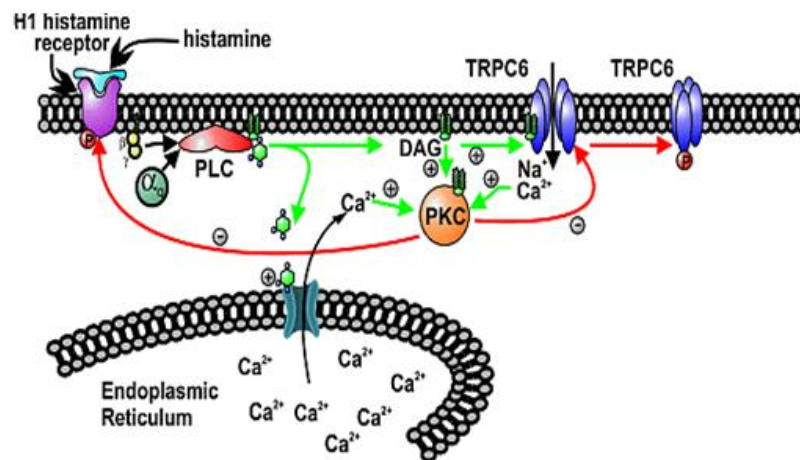


Figura 16. Esquema del canal TRPC6 (Chen, W. y cols. 2014).

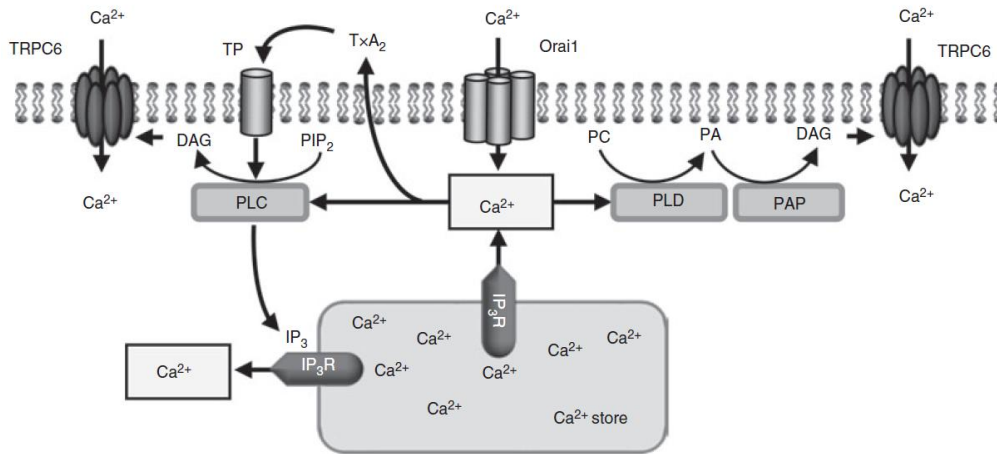


Figura 17. Modelo propuesto de la activación del canal TRPC6 por Orai1 y fosfolipasas (Chen, W. y cols. 2014).

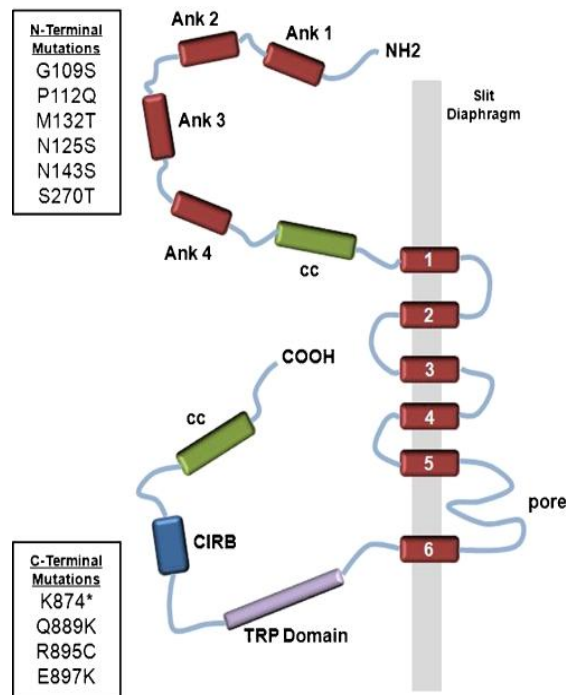


Figura 18. Estructura del canal TRPC6 y las mutaciones en los extremos amino y carboxilo (El Hindi, S. y cols. 2011).

3. CÁNCER

Toda célula normal que pasa a convertirse en célula cancerosa lo hace debido a un cambio o mutación en su ADN. Estas células cancerosas presentan un aspecto diferente y no son capaces de llevar a cabo las funciones que corresponden a las células normales. A veces esas células, cuya carga genética ha cambiado, mueren o son eliminadas en los nódulos linfáticos. Sin embargo, otras veces siguen reproduciéndose. Toda célula cancerosa comparte unos patrones característicos. Generalmente, su período de multiplicación y proliferación es muy rápido, crecen y se reproducen en zonas diferentes a donde se han originado, por lo que invaden otros tejidos y órganos (invasión), con el consecuente daño de éstos, al mismo tiempo que migran (migración) a otras partes del organismo a través de la linfa o de la sangre. Además, tienen la capacidad de originar nuevos vasos sanguíneos, en un proceso conocido como angiogénesis y que facilita que se den los procesos anteriores. Además de estas características, las células cancerosas sufren una serie de cambios en su citoesqueleto, en la capacidad de adhesión y movilidad, secreción de enzimas o cambios en el núcleo. En este tipo de células tumorales, SOCE tiene un papel importante debido a su implicación en procesos como progresión del ciclo celular, proliferación, migración, invasión o metástasis y evasión de la apoptosis.

La homeostasis del Ca^{2+} está regulada por diferentes mecanismos cuya disfunción produce ciertos procesos patológicos en los que se podría incluir el cáncer (Jardin, I. y cols. 2016). Todo tipo de cáncer presenta ciertas características, como son la alta y descontrolada tasa de proliferación celular, capacidad de migración celular e invasión o infiltración de tejidos u órganos (metástasis), resistencia a la muerte celular programada (apoptosis), intercomunicación célula-microambiente, neovascularización y angiogénesis (Fiorio Pla, A. y cols. 2012; Parkash, J. y cols. 2010). Estos procesos, que desarrollan las células cancerosas durante la tumorigénesis y que a su vez, están regulados por el ion Ca^{2+} y la ECC, son dependientes del aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Altas concentraciones de Ca^{2+} de corta duración dan lugar a fenómenos como citotoxicidad mediada por linfocitos T, liberación de gránulos líticos y/o reconocimiento celular en procesos de apoptosis (Jardin, I. y cols. 2016).

La evidencia más directa del papel de la señal de Ca^{2+} en la muerte de células cancerosas y su aplicación clínica potencial es a través del uso de la electroporación de Ca^{2+} . El proceso implica la aplicación de cortos pulsos eléctricos de alto voltaje sobre la

región cancerígena afectada en presencia de alta concentración de Ca^{2+} extracelular para inducir la necrosis de la célula cancerosa (Frandsen, S.K. y cols. 2012).

Algunas líneas celulares de cáncer son particularmente sensibles a la electroporación de Ca^{2+} , tal vez a través de una remodelación de la señalización del Ca^{2+} , como la capacidad reducida de eflujo de Ca^{2+} (Frandsen, S.K. y cols. 2017). La selección de canales de Ca^{2+} específicos para inducir la muerte de las células cancerosas de mama es compleja y no siempre es tan simple como una inducción de muerte celular por sobrecarga de Ca^{2+} .

El influjo de Ca^{2+} mediado por un canal de Ca^{2+} regulado por voltaje puede ser importante en la muerte celular inducida por algunos agentes. Por ejemplo, el silenciamiento de Cav3.1 reduce la apoptosis inducida por ciclofosfamida en células de cáncer de mama MCF7 (Ohkubo, T. y cols. 2012). La activación farmacológica de algunos canales de TRP puede inducir la muerte de células de cáncer de mama, mientras que otros estudios informan que silenciar un canal de TRP específico puede promover la muerte celular. Aunque al principio esto puede parecer contradictorio, la homeostasis del Ca^{2+} eficaz es esencial para la supervivencia celular, mientras que la sobrecarga de Ca^{2+} puede ser un inductor de muerte celular (Falk, H. y cols. 2018; Frandsen, S.K. y cols. 2012).

3.1. LEUCEMIA

La sangre es un tejido compuesto por una fracción líquida denominada plasma, de color amarillo (llamado suero cuando se elimina el fibrinógeno), en el que se encuentra la fracción celular compuesta de diversos elementos celulares en suspensión, como los glóbulos rojos, hematíes o eritrocitos, glóbulos blancos o leucocitos y plaquetas o trombocitos. La sangre juega un papel importante en el diagnóstico clínico debido a la existencia de muchas enfermedades en las que la composición de la sangre y las propiedades de sus componentes se alteran de forma característica (Tresguerres, J.A.F. 1992).

La hematopoyesis (Figuras 19 y 20) es el proceso por el cual la médula ósea, como órgano hematopoyético, lleva a cabo la producción de células sanguíneas. Su finalidad es, por tanto, renovar la fracción celular y disponer de una reserva contra posibles invasiones de elementos extraños (Guyton, A.C. 1988).

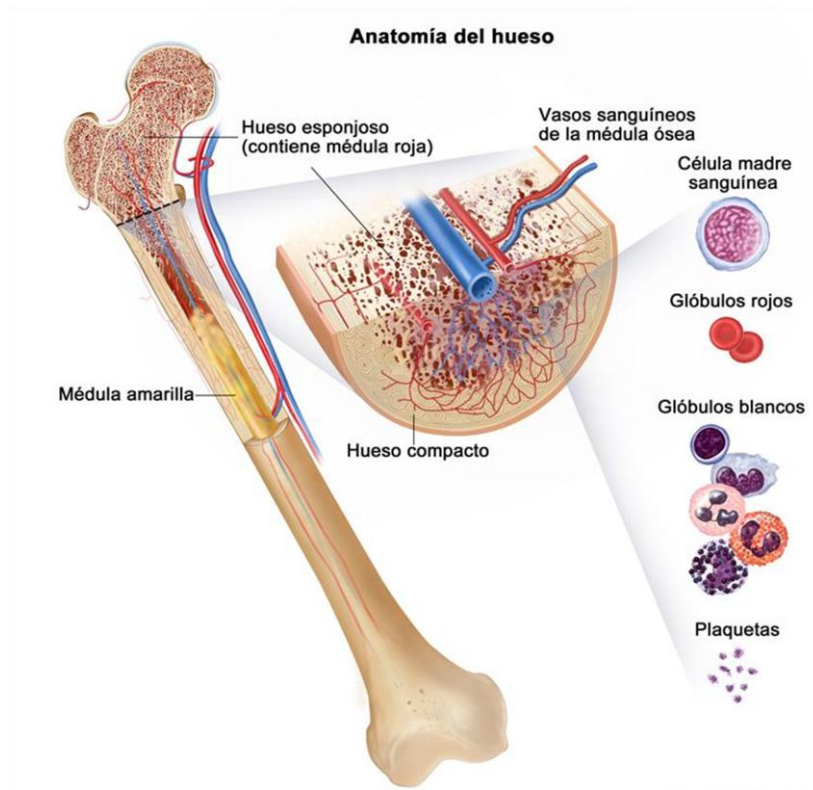


Figura 19. Hematopoyesis o proceso de formación de células sanguíneas a partir de la médula ósea como órgano hematopoyético. El tejido hematopoyético es el responsable de la formación de células sanguíneas y está presente en el bazo, nódulos linfáticos, timo y fundamentalmente, en la médula ósea roja (National Cancer Institute, 2019).

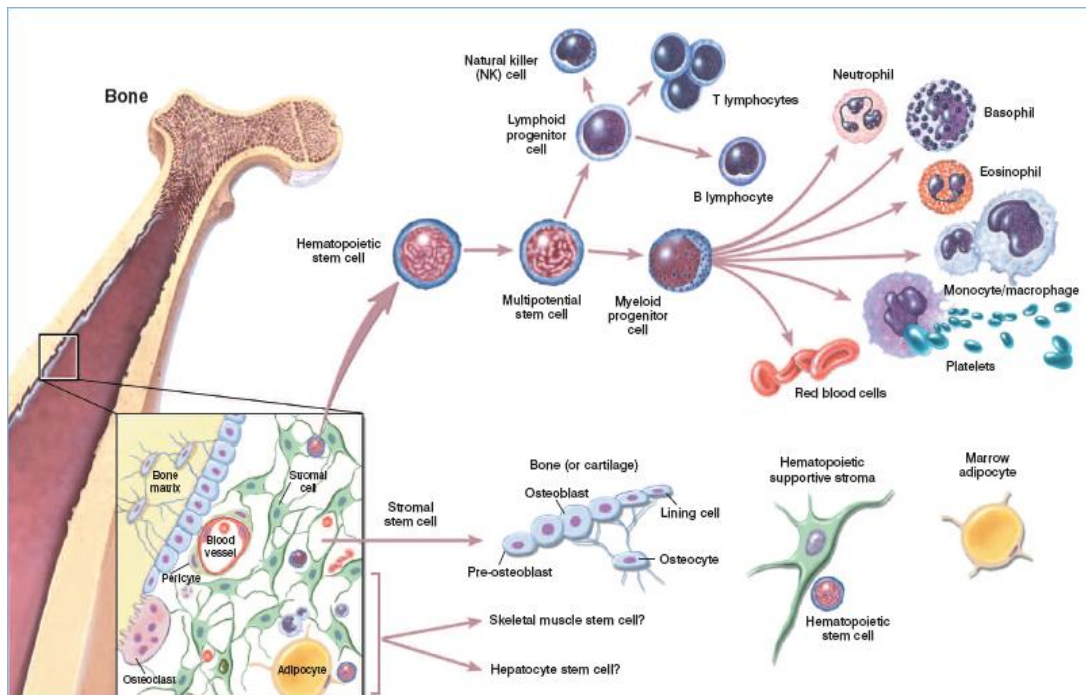


Figura 20. Hematopoyesis o proceso de formación de células sanguíneas a partir de la médula ósea como órgano hematopoyético (imagen obtenida de stem cells.nih.gov; bone marrow (Hematopoietic) stem cells, por Domen J y cols 2001).

Las células que dan origen a las células sanguíneas se dividen en varios linajes (Figura 21):

3.1.1. Células troncales hematopoyéticas (CTH)

También se las conoce con el nombre de célula madre, son multipotenciales (tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier linaje sanguíneo) y capaces de auto-renovarse (producir más células madre). Estas células madre originan células hijas comprometidas, que se convertirán, por diferenciación y proteínas inductoras de diferenciación, en tipos celulares especializados. La formación y reproducción de estas células están controladas por proteínas conocidas como factores de proliferación, tales como la interleucina-3 (IL-3), que estimula la génesis y reproducción de casi todos los tipos de células madre. Estímulos como una bajada de la concentración de oxígeno o enfermedades infecciosas promueven la acción tanto de los factores de proliferación como de los factores de diferenciación. Los marcadores de superficie de las CTH son CD34, CD133, CD90 y carecen de marcadores específicos de linaje.

3.1.2. Células progenitoras hematopoyéticas (CPH)

Éstas células no tienen la capacidad de auto-renovarse, pero sí conservan la capacidad de proliferar. Pueden diferenciarse en varios linajes (multipotenciales), en dos linajes (bipotenciales) o a un solo linaje (monopotenciales). Conservan el marcador CD34, pero ya adquieren marcadores específicos del linaje al que darán origen. Tanto las CTH como las CPH tienen una morfología similar a los linfocitos.

3.1.3. Células precursoras

Son aquellas que al madurar dan origen a las células que circulan en la sangre, forman más del 90% de las células de la médula ósea y son reconocibles por su morfología.

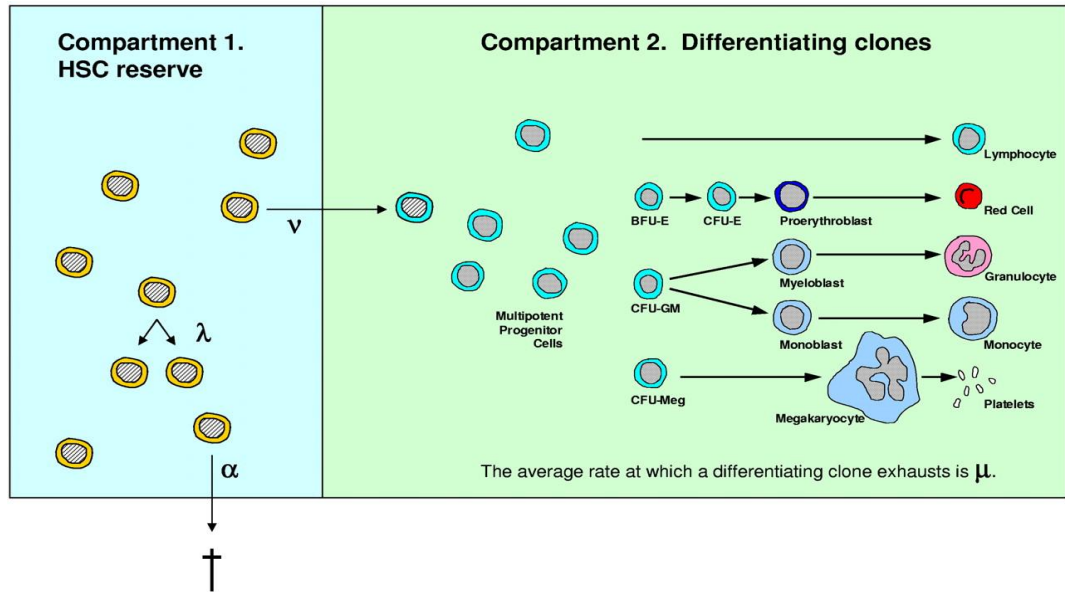


Figura 21. Modelo del proceso de hematopoyesis (Catlin, S.N. y cols. 2011). (PMP: progenitor multipotente; PLC: progenitor linfóide común; PMC: progenitor mieloide común; PEM: progenitor eritroide/megacariocítico; PGM: progenitor granulocito/monocítico, también llamado CFU-GM (unidad formadora de colonias de granulocitos y macrófagos).

La célula madre sanguínea es una célula inmadura que puede transformarse en todos los tipos de células sanguíneas (glóbulos blancos, eritrocitos y plaquetas). Las células madre sanguíneas o células madre hematopoyéticas se encuentran en la sangre periférica y en la médula ósea (Figura 22) (National Cancer Institute, 2019).

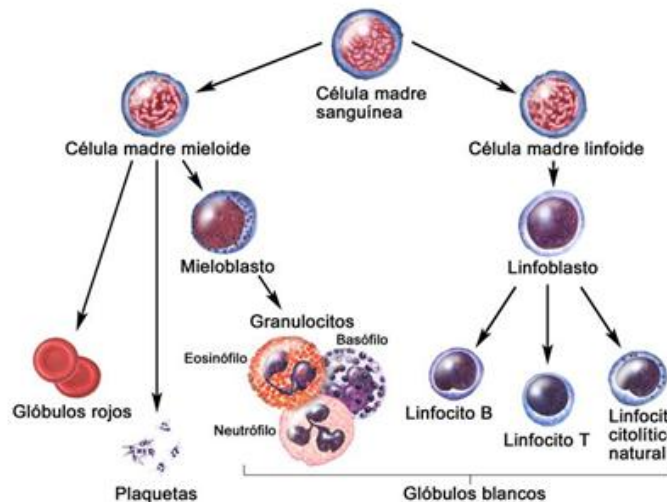


Figura 22. Evolución de una célula sanguínea. Una célula madre sanguínea se puede convertir en una célula madre mieloide o linfóide, dando lugar a glóbulos rojos o eritrocitos, plaquetas o glóbulos blancos o leucocitos (National Cancer Institute, 2019).

La leucemia es un tipo de cáncer que comienza en la médula ósea originando un incremento incontrolado en el número de células sanguíneas inmaduras (células blásticas) de la serie blanca, lo que las vuelve cancerosas. Estas células, también llamadas células leucémicas, anulan la formación correcta de células hematopoyéticas sanas, como los eritrocitos, las plaquetas y los leucocitos que se lleva a cabo en la médula ósea (Birnie, G.D. 1988; Collins, S.J. 1987). En otras palabras, en dicha neoplasia hay una proliferación exacerbada de una línea celular con desplazamiento de las células normales. Como consecuencia de esta alteración, se aumenta la probabilidad de sufrir síndromes anémicos, infecciones y problemas para controlar hemorragias, así como posibilidad de que en ocasiones estas células se infiltren en diversos órganos y tejidos.

Principal y mayoritariamente, como se detalla en la tabla 1, los diferentes tipos de leucemia se pueden clasificar en función del tipo celular sanguíneo que se torna canceroso (origen mieloide o linfoide) y según si la velocidad de crecimiento y diferenciación celulares acontece de forma rápida o lenta (aguda o crónica, respectivamente). En este sentido, especificamos leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia linfocítica crónica (LLC).

		TIPO CELULAR CANCEROSO	
		ORIGEN MIELOIDE	ORIGEN LINFOIDE
VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN CELULARES	RÁPIDO	LMA	LLA
	LENTO	LMC	LLC

Tabla 1. Principales tipos de leucemia en función de la línea celular originaria y diferenciación celular.

3.1.4. Leucemia Mieloide/ Mielógena/ Mielocítica

3.1.4.1. Leucemia Mieloide Aguda (LMA)

Este tipo de leucemia es, por lo general, de crecimiento rápido, aparición brusca y desarrollo agresivo; se caracteriza por la presencia de blastos de estirpe mieloide. Estas células se suelen transformar en un tipo de glóbulo blanco inmaduro (mieloblasto o blastocito mieloide). Estos mieloblastos son glóbulos blancos anormales y no se transforman en glóbulos blancos sanos. En algunos casos de LMA, hay demasiadas células madre que se transforman en glóbulos rojos o plaquetas anormales. Estos glóbulos blancos, glóbulos rojos o plaquetas anormales también se llaman células o blastocitos leucémicos.

La LMA es la forma más común de leucemia, siendo responsable de un 25% de todos los casos diagnosticados. Presenta una incidencia de 3,7 personas y una mortalidad asociada de 2,7 por cada 100.000 personas (Deschler, B. y cols. 2006) El tiempo de supervivencia se ha visto incrementado en los últimos 40 años notablemente. Si en el año 1975 el porcentaje de enfermos que sobrevivían 5 años tras el diagnóstico era del 6,3%; en el período de 2005 a 2011 este porcentaje era del 25,9%. La incidencia según los grupos de edad es bastante diferente, cuanto más mayor o adulto es el individuo mayor probabilidad de que se produzca esta neoplasia y menor es el ratio de supervivencia a los cinco años (Deschler, B. y cols. 2006), es además, más frecuente en hombres que en mujeres.

Dentro de la clasificación propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2002 la LMA quedaba dividida en LMA con repetidas anomalías genéticas, LMA relacionada a síndromes mielodisplásicos, LMA relacionada a tratamientos, y LMA no especificada (Dohner, H. y cols. 2015).

La etapa o estadio de un cáncer se basa en el tamaño del tumor y la capacidad invasiva del mismo. Por lo tanto, este tipo de leucemia no se clasifica por etapas como otros muchos tipos de cáncer, por lo que el pronóstico de una persona que padece LMA dependerá del subtipo de este tipo de leucemia, la edad, así como otras pruebas de laboratorio.

Hay diferentes subtipos de LMA, la mayoría se basan en el grado de madurez o desarrollo de las células cancerosas en el momento del diagnóstico y en cómo se diferencian de las células normales. Uno de estos subtipos es la leucemia promielocítica aguda (LPA), que se presenta en adultos de edad media.

3.1.4.2. **Leucemia Mieloide Crónica (LMC)**

La leucemia crónica es un cáncer que se caracteriza por la proliferación de glóbulos blancos de la serie granulocítica encargada de la producción de leucocitos, esto es, hay un excesivo número de células mieloides inmaduras, precursoras de glóbulos blancos.

Cursa con un crecimiento lento que empeora despacio con el tiempo y se presenta con más frecuencia en adultos que en menores (este tipo de leucemia supone el 15% de las leucemias crónicas del adulto y la edad de presentación está entre la tercera y sexta décadas de la vida). Si bien en la leucemia aguda hay poco poder para la diferenciación celular, en la leucemia crónica se conserva dicha diferenciación.

La enfermedad causa daños en la médula ósea, el bazo, el hígado, el sistema nervioso y los riñones.

3.1.5. **Leucemia Linfoide/ Linfoblástica/ Linfocítica**

3.1.5.1. **Leucemia Linfoide Aguda (LLA)**

Este tipo de cáncer se da cuando la célula neoplásica tiene un origen linfoide y, al igual que en la LMA, acontece con crecimiento rápido, aparición brusca y desarrollo agresivo. Es más frecuente en niños que en adultos.

3.1.5.2. **Leucemia Linfoide Crónica (LLC)**

Este tipo de leucemia se caracteriza porque la célula neoplásica de origen es de origen linfoide y, similarmente a la LMC, la velocidad de crecimiento y diferenciación celulares son lentos. Los linfocitos son morfológicamente normales, pero funcionalmente anómalos.

Es más frecuente, puesto que supone el 30% de todas las leucemias. Afecta sobre todo a varones mayores de 60 años.

3.1.5.3. **Cromosoma Filadelfia (Ph) o Translocación Filadelfia [t(9;22)(q34;q11)]**

Es una anomalía genética asociada a la LMC. Afecta a los cromosomas 9 y 22. El 90% de los enfermos de LMC la presenta, mientras el resto de los enfermos padecen translocaciones crípticas invisibles a las preparaciones mediante método de banda G u otras translocaciones que afectan a otro u otros cromosomas de la misma forma que sucede con los cromosomas 9 y 22 (American Cancer Society, 2019).

Este cromosoma Ph también se encuentra en pacientes con LLA (25-30% en adultos y 2-10% en niños) y, ocasionalmente, en casos de LMA.

En la translocación de Filadelfia (Figura 23) partes de dos cromosomas, el 9 y 22, intercambian sus posiciones. El resultado es que una parte del gen de región de fractura (*BCR*, *Breakpoint Cluster Region*) del cromosoma 22 (región q11) se fusiona con parte del gen *ABL* del cromosoma 9 (región q34). El resultado de esta translocación es la producción de una proteína de masa p210 o p185. El código del gen *ABL* es capaz de añadir grupos fosfato a residuos tirosina mediante la enzima tirosina cinasa. La fusión de los genes *BCR-ABL* también es una enzima tirosina cinasa, aunque la región *BCR* del gen también es una enzima serina/treonina proteíncinasa (la función de la tirosina cinasa es muy relevante para la terapia de esta enfermedad). La proteína resultante de la fusión *BCR-ABL* interactúa con la subunidad receptora interleucina-3beta (IL-3β). La transcripción del *BCR-ABL* permanece activa continuamente, sin necesidad de ser activado por otras proteínas mensajeras. Este a su vez, activa un número de proteínas y enzimas que controlan el ciclo de división celular e inhibe la reparación del ADN, causando la inestabilidad del genoma y siendo causa potencial de la LMC, con una alta tasa de mortalidad.

La mayoría de los casos de LMC comienzan durante la división celular, cuando se intercambia el ADN entre los cromosomas 9 y 22, donde parte del cromosoma 9 va al 22 y viceversa, en un proceso que se conoce como translocación, resultando en un cromosoma 22 más corto de lo normal. Este nuevo cromosoma anormal se llama cromosoma Filadelfia y se encuentra en células leucémicas de casi todos los pacientes con LMC. El intercambio de ADN entre los cromosomas ocasiona la formación de un nuevo gen, un oncogén llamado *BCR-ABL*. Este gen produce la proteína *BCR-ABL*, la cual es un tipo de proteína tirosina cinasa, causante de que las células de la LMC crezcan y se dividan sin control. En un pequeño número de pacientes con LMC, las células leucémicas tienen el oncogén *BCR-ABL*, pero no el cromosoma Ph, de tal manera que es posible que tengan otros oncogenes desconocidos que sean la causa de su enfermedad y no se considere que en realidad tengan LMC (Kurzrock, R. y cols. 2003; Nowell, P.C. y cols. 1961; Rowley, J.D. 1973).

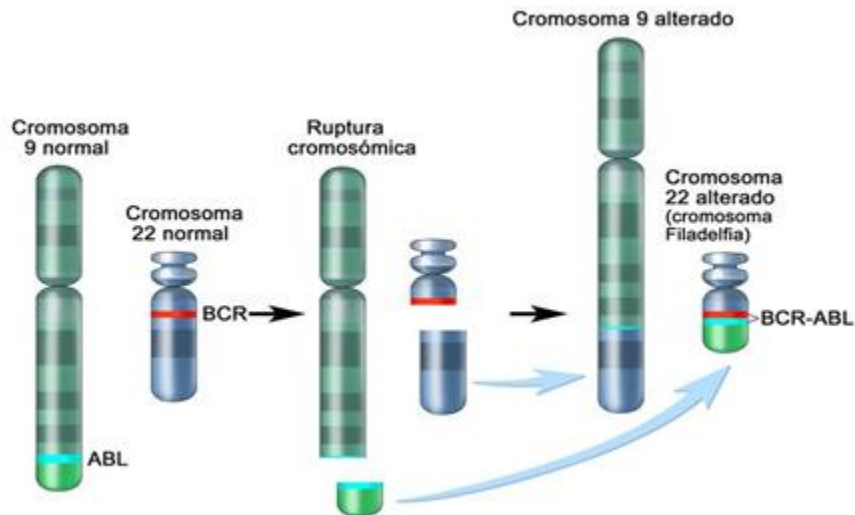


Figura 23. Cromosoma Filadelfia. Una sección del cromosoma 9 y una sección del cromosoma 22 se rompen e intercambian lugares. El gen *bcr-abl* se forma en el cromosoma 22 donde se une a la sección del cromosoma 9. El cromosoma 22 alterado se llama cromosoma Filadelfia. En la LLA y la LMC, con frecuencia se encuentran células de la médula ósea que contienen el cromosoma Filadelfia (Kurzrock, R. y cols. 2003)

Puede ser aguda, si se detectan más del 20% de blastos de estirpe mieloide en la médula ósea; será crónica si se observan células mieloides en diversos grados de maduración y la presencia del cromosoma Filadelfia.

3.2. CÁNCER DE MAMA

3.2.1. Anatomía de la glándula mamaria

La mama es una glándula situada en la cara anterior del tórax. Su parte externa comprende el pezón, lugar en el que drenan los conductos galactóforos y la areola, círculos oscuros que rodean el pezón. El interior de la mama está compuesto por tejido fibroadiposo. La glándula mamaria está constituida por múltiples lóbulos y lobulillos, que producen la leche y están unidos por los ductos o conductos galactóforos, que llevan la leche hasta el pezón. La mama está rodeada de tejido graso que le proporciona consistencia y volumen y está irrigada por dos arterias: la axilar y la mamaria interna. También contiene una red de venas que drenan a la vena mamaria interna y a la axilar, cuya función es la de recoger la sangre de la mama y llevarla al torrente circulatorio. Asimismo, contiene un sistema de vasos linfáticos que se encargan de recoger la linfa y confluyen en pequeñas conformaciones redondeadas llamadas nódulos linfáticos. Los

nódulos linfáticos más cercanos a la mama se encuentran en la axila y a ambos lados del esternón. Otros nódulos se encuentran en la zona de la clavícula: cadena supraclavicular y subclavicular (Figura 24) (Asociación Española Contra el Cáncer, 2019).

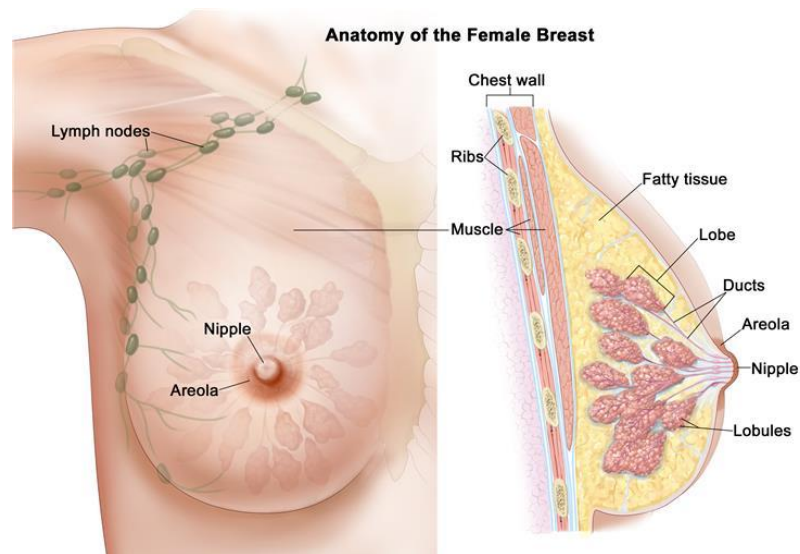


Figura 24. Anatomía de la glándula mamaria. Se muestran los lóbulos, los ductos, nódulos linfáticos, areola, pezón y tejido graso de la glándula mamaria (National Cancer Institute, 2019).

El cáncer de mama es el tumor maligno que se origina en el tejido de la glándula mamaria. Es el tumor más frecuente en mujeres (30% en España), aunque un pequeño porcentaje de hombres también pueden ser diagnosticados (Asociación Española Contra el Cáncer, 2019). El crecimiento y diseminación de este tumor puede ocurrir de tres maneras:

LOCAL: tiene lugar un crecimiento por invasión directa, viéndose afectadas estructuras adyacentes como la pared torácica, los músculos, los huesos y la piel.

LINFÁTICA: la red de vasos linfáticos permite que el drenaje de la linfa se efectúe a varios grupos ganglionares. Los nódulos axilares son los que se afectan con más frecuencia, seguidos de los situados en la arteria mamaria interna (zona central del tórax) y los nódulos supraclaviculares.

HEMATÓGENA: acontece a través de los vasos sanguíneos, preferentemente hacia los huesos, el pulmón, el hígado y la piel.

3.2.2. Tipos de cáncer de mama

3.2.2.1. *Por su capacidad o no invasiva o infiltrante*

Las células que sufren una división descontrolada pueden permanecer y crecer en el lugar donde comenzaron a proliferar o bien, expandirse al tejido normal que las rodea. Los tipos de cáncer que permanecen dentro de los conductos lácteos o lóbulos lácteos de la mama se denominan *in situ* y no crecen hacia tejidos normales dentro o más allá del seno ni los invaden; en el caso contrario, se les denomina cánceres **invasivos**.

3.2.2.2. *Por su localización*

Anatómicamente, el cáncer de mama puede comenzar en distintas áreas de la mama, como los conductos, los lobulillos o en el tejido intermedio. Cuando el proceso de malignización se dirige hacia el conducto se origina lo que se conoce como **carcinoma ductal**, mientras que si toma dirección hacia el lobulillo, se denomina **carcinoma lobulillar** (Figura 25) (Tabla 2).

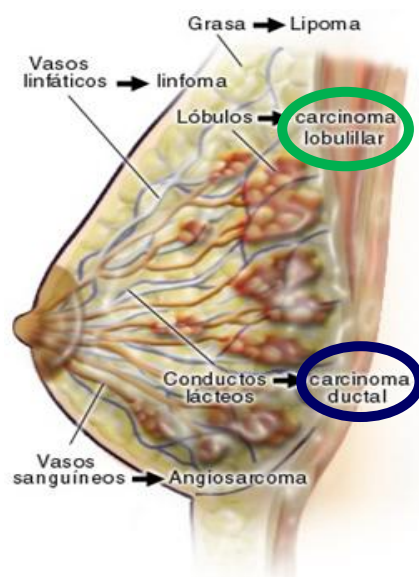


Figura 25. Localización de los distintos tipos de cáncer de mama en función del área afectada de la mama (National Cancer Institute, 2019).

- i. **Carcinoma de mama *in situ*:** este tipo de tumor se da en el interior del conducto mamario, sin traspasar la membrana basal del mismo, esto es, sin invasión o infiltración del tejido que lo rodea. Existen dos tipos de cáncer de mama *in situ*:

- a. **Ductal (CDIS)** (Figura 26): es el tipo más común de cáncer de mama (también se conoce como carcinoma intraductal) y su incidencia ha aumentado en los últimos años. Con frecuencia este tipo de tumor es multicéntrico (se producen varias lesiones en la misma mama) y bilateral (se ven afectadas ambas mamas). Empieza en el revestimiento de los conductos galactóforos (tubos delgados que llevan leche desde los lobulillos de la mama hasta el pezón), permaneciendo dentro de estos conductos lácteos, por lo que se trata de una afección no invasora en la que se encuentran células anormales en el revestimiento de un conducto de la mama. Las células anormales no se diseminaron fuera del conducto hacia otros tejidos de la mama. En algunos casos, sí puede volverse invasivo.

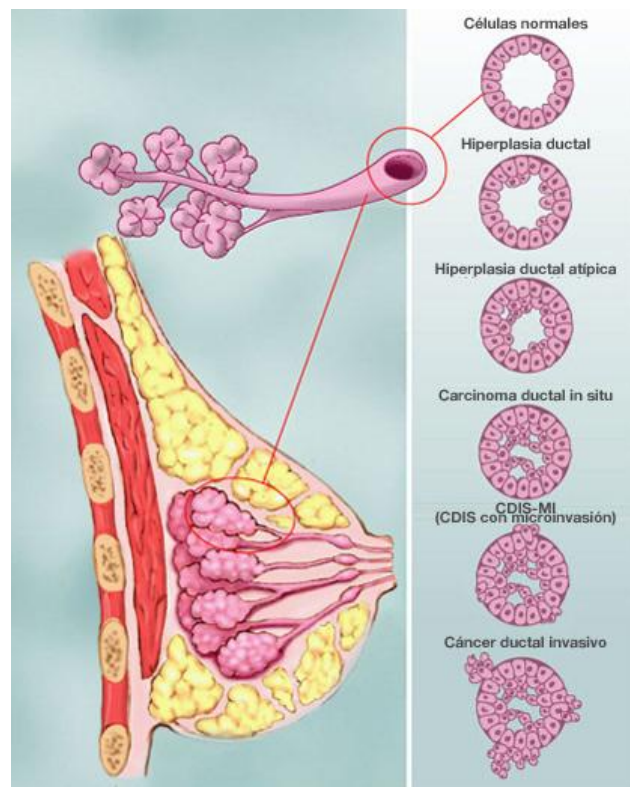


Figura 26. Rango de carcinoma ductal in situ (CDIS) (Breastcancer.org, 2019).

- b. **Lobulillar (CLIS)** (Figura 27): es una afección en la que se encuentran células anormales en los lobulillos de la mama (glándulas lácteas). Esta afección rara vez se convierte en cáncer invasor. Sin embargo, tener un CLIS en una de las mamas aumenta el riesgo de cáncer en ambas. Actualmente, se considera como un marcador que identifica a mujeres con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama invasivo o neoplasia lobular.

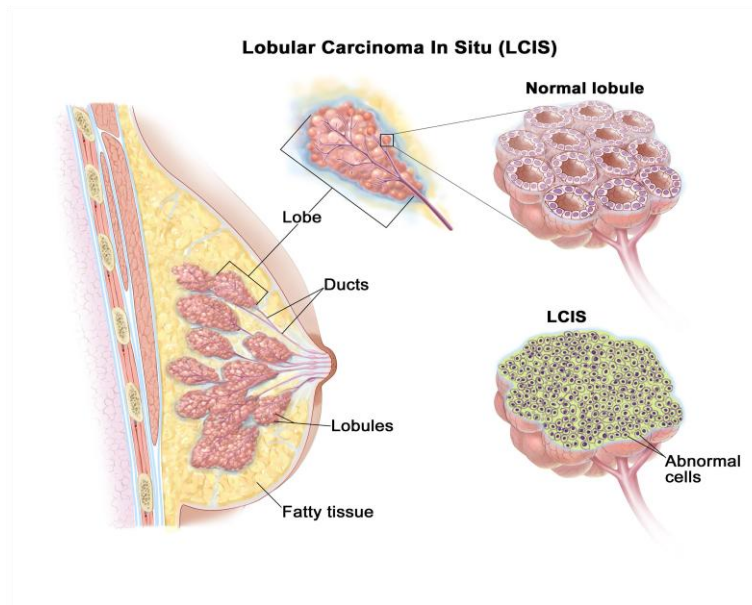


Figura 27. Carcinoma lobular in situ (CLIS) (Breastcancer.org, 2019).

- ii. **Carcinoma invasivo:** es la proliferación de células malignas que traspasa, bien a través de la sangre o del sistema linfático, la membrana del ducto o del lobulillo, invadiendo tejidos circundantes normales. Este tipo de cáncer es el que mayormente se da y cuando las células son capaces de invadir otras partes del organismo es lo que conocemos como cáncer de mama metastásico. Podemos diferenciar dos tipos de cáncer de mama invasivo:

- a. **Ductal (CDI)** (Figura 28): es el tipo más común de cáncer de mama invasivo (80%), comenzando en las células que revisten los conductos galactóforos de la mama y hay una diseminación de células anormales fuera del conducto de la mama hacia el tejido normal circundante o a otras partes del cuerpo a través del sistema circulatorio y linfático.

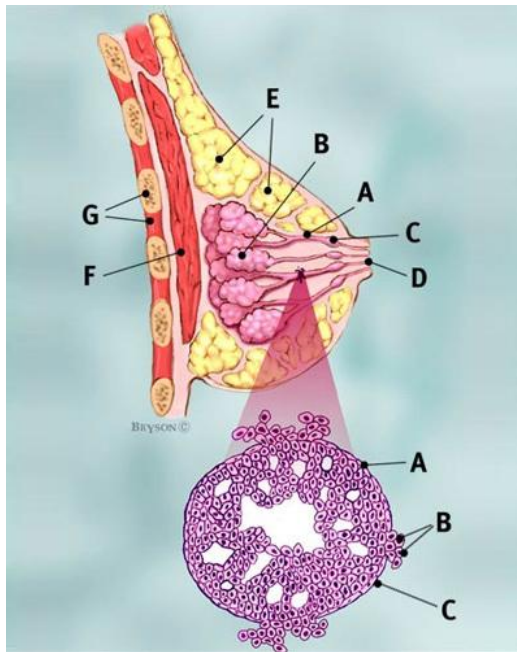


Figura 28. Mama normal con carcinoma ductal invasivo (CDI) en una sección transversal agrandada del conducto. Perfil de la mama (A) conductos; (B) lobulillos; (C) sección dilatada del conducto para almacenar leche; (D) pezón; (E) grasa; (F) músculo pectoral mayor; (G) pared/caja torácica. Acercamiento (A) células del conducto normales; (B) células cancerosas del conducto que invaden la membrana basal; (C) membrana basal. (Breastcancer.org, 2019).

- b. Lobulillar (CLI):** este tipo de cáncer se origina en los lóbulos mamarios, dentro de las glándulas que producen leche y se disemina hasta los tejidos normales circundantes. También se puede dispersar a otras partes del cuerpo a través del sistema circulatorio y linfático. Tiene una menor incidencia que el CDI (10%).

Existen otros tipos de cáncer de mama, aunque menos frecuentes, como son el medular, el coloide y el tubular. En el carcinoma inflamatorio de mama, las células tumorales infiltran los vasos linfáticos y la piel. La mama está globalmente enrojecida y caliente, como si estuviera inflamada debido a la obstrucción de los vasos linfáticos de la piel. Su incidencia es baja (1-3% de todos los cánceres de mama).

La siguiente tabla (Tabla 2) muestra los tipos de cáncer de mama en función de la capacidad invasiva (*in situ* e invasivo) y por su localización (ductal o lobulillar).

	CAPACIDAD INVASIVA		
LOCALIZACIÓN		<i>In situ</i>	Invasivo
	Ductal	CDIS	CDI
	Lobulillar	CLIS	CLI

Tabla 2. Clasificación de los diferentes tipos de cáncer de mama por sus características anatomopatológicas.

- iii. **Enfermedad de Paget de mama/enfermedad de Paget del pezón/enfermedad de Paget mamaria** (Figura 29): recibe este nombre del médico británico (Paget, J. 1874), que observó una relación entre los cambios en el pezón y el cáncer de mama. Es un tipo de cáncer poco común pero que se ve afectada la piel del pezón y la areola. Estas células tumorales se encuentran en la epidermis o capa superficial de la piel del pezón y de la areola. Esta patología se presenta tanto en mujeres como en hombres, pero la mayoría de los casos se dan en mujeres. Su incidencia es muy baja (<1% de los cánceres de mama) y cerca de 1-4% de todos los casos de cáncer de mama incluyen este tipo de enfermedad y siendo la edad promedio al tiempo del diagnóstico de 57 años, también se ha detectado en adolescentes y personas octogenarias (Sakorafas, G.H. 2001). La mayoría de las personas con esta patología tienen también uno o dos tumores en el interior de la misma mama, los cuales son carcinomas ductales *in situ* (CDIS) o carcinomas invasivos (Paget, J. 1874; Sakorafas, G.H. 2001).

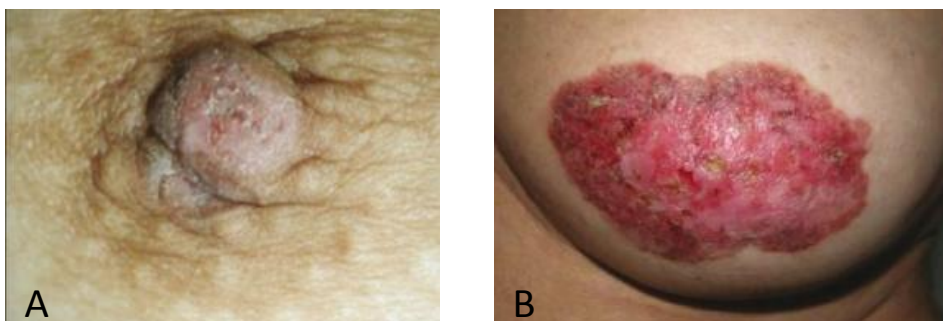


Figura 29. Enfermedad de Paget de mama. (A) La apariencia clínica es a veces una lesión eczematosa, engrosada y endurecida con bordes irregulares. (B) Lesión avanzada mostrando engrosamiento, eritemas y enrojecimiento de la piel, con erosión del pezón y escamosidades alrededor del pezón y areola (Karakas, C. 2011).

Hay varias teorías que pueden exponer la causa de la enfermedad de Paget. La más aceptada es que las células cancerosas del interior de la mama migran por los conductos de leche al pezón y a la areola, lo que explicaría que tanto la enfermedad de Paget como la aparición de tumores en el interior del mismo seno se encuentren juntos (Paget, J. 1874; Sakorafas, G.H. 2001). Una segunda teoría mostraría que las células en el pezón o en la areola se vuelven cancerosas por sí solas (Paget, J. 1874; Sakorafas, G.H. 2001), lo que determinaría que algunas personas padezcan la enfermedad de Paget pero ausencia de tumor en el interior de la glándula mamaria.

3.2.3. Grados Histológicos y Etapas del Cáncer

En el cáncer de mama encontramos diferentes grados en función de la relación de semejanza que poseen las células tumorales con respecto a las células normales de la mama e indican la velocidad con la que el cáncer puede desarrollarse.

Grado 1, bajo: es aquel en el que las células cancerígenas están bien diferenciadas, tienen un crecimiento lento y son similares a las células normales.

Grado 2, intermedio: el crecimiento de estas células es algo más rápido y es moderadamente diferenciado porque no se observan como las células normales.

Grado 3, alto: las células presentan un grado indiferenciado, con un crecimiento muy rápido y se observan muy diferentes de las células normales. Tienen alta frecuencia de diseminación.

La etapa del cáncer viene determinada por el tamaño del tumor y la capacidad invasiva tanto a otros tejidos como a nódulos linfáticos.

Etapa 0: en esta etapa el cáncer no es invasivo, como el CDIS.

Etapa I: el tamaño del tumor es <2 cm, es un cáncer invasivo, en el que las células sólo han pasado el recubrimiento del conducto o lóbulo pero no hay nódulos linfáticos involucrados (Figura 30).

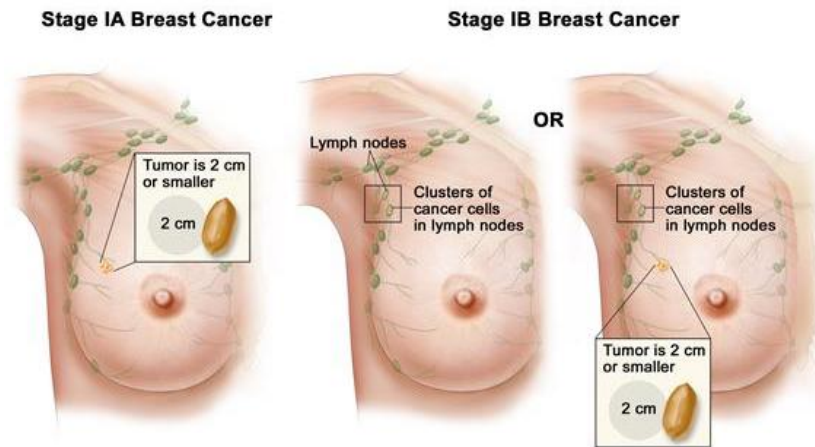


Figura 30. Localización del cáncer de mama en las etapas IA y IB (National Cancer Institute, 2019).

Etapas II: el tamaño del tumor es de 2-5 cm. En la **etapa IIA**, el cáncer no se encuentra en la mama sino en los nódulos linfáticos axilares. En la **etapa IIB**, el tumor es invasivo, pudiéndose extender o no a los nódulos linfáticos axilares (Figura 31).

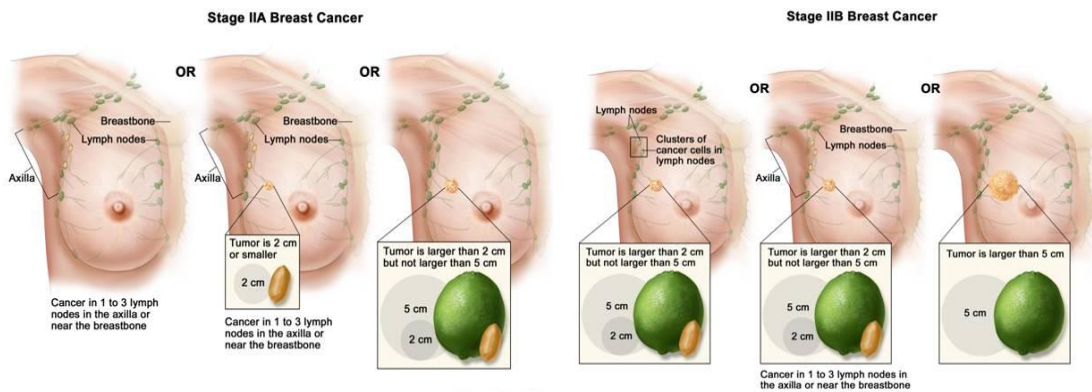


Figura 31. Localización del cáncer de mama en las etapas IIA y IIB (National Cancer Institute, 2019).

Etapas III: es un tipo de cáncer invasivo y puede ser de cualquier tamaño. En la **etapa IIIA**, el tumor está en los nódulos linfáticos axilares (reunidos en grupo o adheridos a otras estructuras) o extendido a nódulos cercanos al esternón. En la **etapa IIIB**, el tumor es invasivo y se ha diseminado a la pared torácica y/o piel de la mama, así como a los nódulos linfáticos axilares y los cercanos al esternón. Es en esta última etapa se habla de **cáncer de mama inflamatorio**. Las

características del mismo incluyen enrojecimiento en parte de la piel de la mama, hinchazón e invasión del cáncer a nódulos linfáticos y piel (Figura 32).

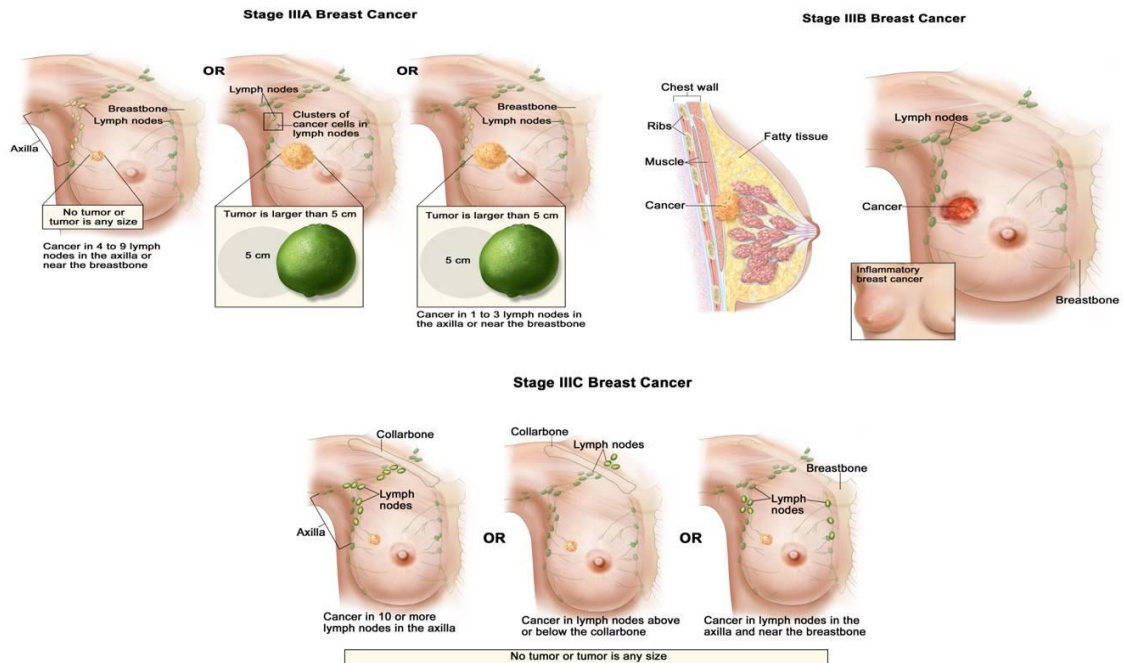


Figura 32. Localización del cáncer de mama en las etapas IIIA, IIIB y IIIC (National Cancer Institute, 2019).

En la **etapa IIIC**, el tumor es invasivo, puede diseminarse a la pared torácica, la piel de la mama, a los nódulos linfáticos por encima y debajo de la clavícula, así como a los axilares o los cercanos al esternón (Figura 32).

Etapa IV: el tumor invasivo se ha extendido más allá de la mama y los nódulos linfáticos cercanos a otros órganos del cuerpo (pulmones, piel, hueso, hígado, cerebro). En esta etapa se habla de **cáncer metastásico** (Figura 33).

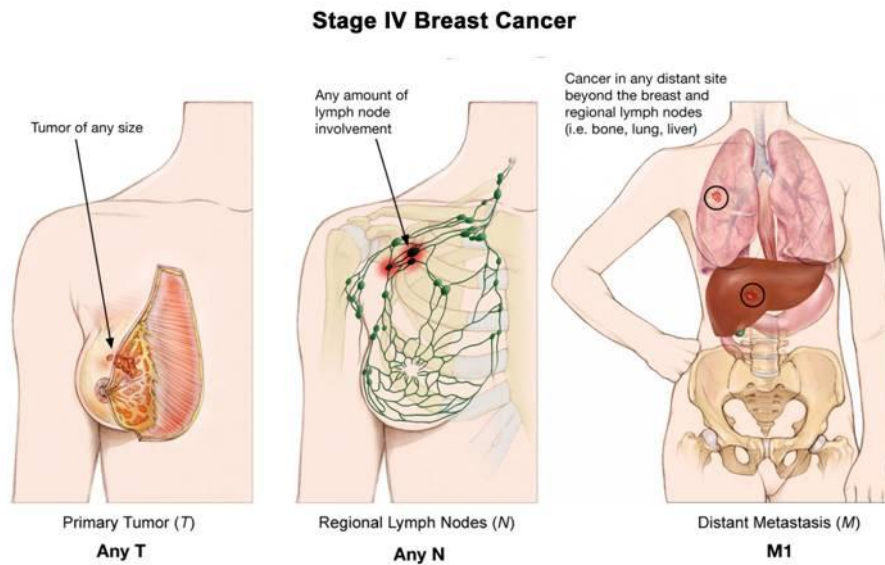


Figura 33. Localización del cáncer de mama en las etapas IV (National Cancer Institute, 2019).

3.2.4. Receptores hormonales en el cáncer de mama

Dentro del cáncer de mama se incluyen distintos tumores que difieren por morfología y comportamiento. El conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares será básico para comprender su evolución, así como planificar las distintas alternativas terapéuticas. En este sentido, factores como el tamaño tumoral, la afectación axilar, el número de nódulos linfáticos infiltrados, la edad, el estado menopáusico, los receptores hormonales y marcadores biológicos (genes supresores de tumores, proto-oncogenes, factores de crecimiento), influyen sobre el pronóstico de pacientes con cáncer de mama.

Los receptores hormonales son proteínas cuya producción está controlada por genes. Algunos genes y las proteínas que éstos producen pueden influir sobre la forma en que se comporta un cáncer de mama y cómo podría responder a un tratamiento específico. Hay anomalías de genes de cáncer de mama que son heredadas, llamadas *BRCA1* (*breast cancer gen 1*, gen 1 de cáncer de mama) o *BRCA2* (*breast cancer gen 2*, gen 2 de cáncer de mama). Según el Instituto Nacional del Cáncer, las mujeres con un gen *BRCA1* o *BRCA2* tienen alrededor del 60% de riesgo de recibir un diagnóstico de

cáncer de mama en su vida. El cáncer de ovarios también está aumentado en estos casos (Breastcancer.org, 2019).

3.2.4.1. **HER2**

El gen *HER2* (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano) puede influir en el desarrollo del cáncer de mama y es responsable de fabricar proteína HER2, la cual también es receptor en las células de la mama. En condiciones normales, estos receptores ayudan a controlar la forma en cómo crecen, se dividen y se reparan a sí mismas las células de la glándula mamaria. Sin embargo, en torno al 25% de los cánceres de mama, el gen *HER2* se vuelve anormal y fabrica demasiadas copias de sí mismo (amplificación del gen *HER2*). Este gen amplificado da órdenes para producir más receptores HER2 (sobre-expresión de la proteína HER2), de manera que provoca que las células de la mama se dividan de forma descontrolada dando origen al desarrollo de cáncer de mama.

Los cánceres de mama con genes *HER2* amplificados o que sobreexpresan su proteína, se describen como HER2⁺, los cuales tienden a crecer con mayor rapidez y de forma descontrolada y tienen más probabilidad de que se diseminen y regresen; al mismo tiempo, pueden responder a tratamientos diseñados para actuar contra las células con positividad para dicho receptor, frente a las células HER2⁻ (Breastcancer.org, 2019).

3.2.5. **Receptores estrogénicos y de progesterona**

Podemos considerar a los receptores estrogénicos (RE) y receptores de progesterona (RP) como los únicos marcadores biológicos reconocidos como factores pronósticos y predictivos del tratamiento (Sporikova, Z. y cols. 2018).

Estos dos tipos de receptores son proteínas que se localizan principalmente en el núcleo, cuya finalidad es regular la transcripción de genes mediante la unión de dichas proteínas a las hormonas esteroideas.

Hay una relación muy estrecha entre los RE y RP, de tal manera que se induce la síntesis de RP mediante la transcripción por unión de los estrógenos a sus receptores. Se ha observado una disminución de la actividad RE/RP en pacientes posmenopáusicas.

Un cáncer se denomina RE⁺ si tiene receptores para la hormona estrógeno y se denomina RP⁺ si tiene receptores para la hormona progesterona. Las células de la mama que no tienen receptores para dichas hormonas, son negativas (RE⁻ y RP⁻) (Breastcancer.org, 2019). Los cánceres de mama que son RE⁺, RP⁺ o ambos con positividad (RE⁺ y RP⁺), tienden a responder a la terapia hormonal, una medicación que reduce la cantidad de estrógeno o que bloquea el estrógeno de los receptores (Breastcancer.org, 2019).

Se ha determinado la existencia de dos isoformas de RE, son los α y β (RE $_{\alpha}$ y RE $_{\beta}$). Las diferencias entre ambos radican, principalmente, en los dominios regulatorios y la región F, así como la distribución por los distintos tejidos, lo que a su vez les confiere funciones diferentes. En las investigaciones actuales hay una correlación negativa entre ambas isoformas, con una fuerte asociación entre la expresión de RE $_{\alpha}$ con los RP, mientras que las neoplasias con RE $_{\beta}$ no expresan RP.

Aunque hay poca información acerca de los receptores RE $_{\alpha}$ y RE $_{\beta}$, la expresión es más frecuente en tumores de alto grado y afectación nodular.

Los tumores RE⁻ son más quimiosensibles que las neoplasias con RE⁺, esto es debido a que los primeros tienen una mayor tasa proliferativa, lo que permite una mayor eficacia de la quimioterapia. Asimismo, se relaciona la ausencia de RP con mayor respuesta a dicha vía terapéutica (Sporikova, Z. y cols. 2018).

También existen dos formas de RP, denominadas A y B que son expresados ambos por un solo gen, aunque aún no se conoce su implicación en el cáncer de mama.

El mejor pronóstico lo tienen los tumores con positividad a ambos receptores (RE⁺, RP⁺), puesto que su presencia se asocia con una mayor tasa de respuesta a la hormonoterapia y por tanto, mejor y mayor tasa de supervivencia (Sporikova, Z. y cols. 2018).

Cuando el cáncer de mama metastatiza, si hay expresión de ambos tipos de receptores (RE⁺ y RP⁺), el cáncer de mama tiende a diseminarse a hueso, mientras que los tumores RE⁻ y RP⁻, lo hacen principalmente al cerebro.

Hay estudios que constatan la presencia de un porcentaje de tumores de mama RE⁺ (30-40%) que o bien no responden a la hormonoterapia o se hacen resistentes con el tiempo. Desde un punto bioquímico, valores superiores a 30-50 fmol/mg de proteína para RE y de 10 fmol/mg de proteína para RP, están relacionados con una mejor tasa de respuesta a la hormonoterapia en el cáncer metastásico (54-80%). La supervivencia

global y el tiempo de respuesta son mayores cuando la cantidad es de 100 fmol/mg de proteína.

En la actualidad, se debe tener en cuenta la biología de la célula tumoral para establecer una clasificación del cáncer de mama. En función de la presencia de receptores hormonales en dicha célula, se pueden considerar los siguientes grupos de cáncer de mama (Asociación Española Contra el Cáncer, 2019).

i. Luminales y hormonosensibles

En los últimos años, la expresión génica ha identificado dos grandes grupos de tumores hormonosensibles conocidos como **luminal A** y **luminal B**. Actualmente, la definición de los tumores luminales es la positividad para los receptores hormonales (RE⁺, RP⁺) y la negatividad para la sobre-expresión de HER2 (HER2⁻).

La diferencia entre un tumor luminal A y B es la cantidad de proteína Ki-67 (antígeno nuclear presente en todas las células que se encuentran en fase proliferativa del ciclo celular) que se detecta en las células tumorales. Si los tumores tienen <14% de células positivas para Ki-67, el tumor es clasificado como luminal A. Aunque no es una definición fiable, pues un 30% de estos tumores por expresión génica son, en realidad, tumores luminales B, con peor pronóstico.

Un estudio realizado en el año 2012 por el Dr. Prat de Vall d'Hebron Institut d'Oncología (VHIO), ha indicado que la cantidad de RP es importante para distinguir entre tumores luminal A y luminal B, lo que mejora la actual definición histopatológica de los tumores luminales.

La nueva definición para tumores luminal A es: positividad para receptores hormonales, negatividad para HER2, positividad <14% para Ki-67 y positividad >20% para receptores de progesterona. Suponen el 66% de todos los cánceres de mama y son más característicos de las mujeres postmenopáusicas. El tratamiento más idóneo es la hormonoterapia, quedando la quimioterapia como una opción terapéutica para casos y situaciones particulares. Son los de mejor pronóstico (Asociación Española Contra el Cáncer, 2019).

ii. Triple negativos o de tipo basal

La célula tumoral no posee receptores hormonales (RE⁻, RP⁻) ni tiene sobre-expresión de la proteína HER2 (HER2⁺) (Asociación Española Contra el Cáncer, 2019). Es

el cáncer más agresivo y tiene una incidencia muy reducida (15%). Debido a que las células tumorales son negativas para los receptores hormonales, así como para la expresión de proteína HER2, la terapia hormonal y los medicamentos dirigidos contra HER2 no son útiles en el tratamiento de estos tipos de cáncer. No obstante, la quimioterapia sigue siendo útil (American Cancer Society, 2019).

3.3. TERAPIAS CONTRA EL CÁNCER

La creciente participación de la ECC en el establecimiento de las diferentes características fisiológicas de las células cancerosas indica que este mecanismo se tiene que tener muy en cuenta en el diseño de nuevas terapias antitumorales. La inhibición farmacológica de la entrada de Ca^{2+} usando inhibidores específicos de la ECC, tales como BTP-2, 2-ABP, SKF-96365 o dietilestilbestrol (DES), reducen a su vez la proliferación exacerbada y descontrolada de líneas cancerosas *in vitro*, así como la capacidad de metástasis (Bomben, V.C. y cols. 2010; Lodola, F. y cols. 2012; Sun, S. y cols. 2012; Yang, S. y cols. 2009), sugiriendo que el diseño de fármacos que sean capaces de modular específicamente la ECC abre una nueva vía de terapias contra el cáncer. Por ejemplo, el tipifarnib (perteneciente al grupo de los inhibidores de farnesiltransferasas) induce la apoptosis en células cancerosas de LMA al producir una sobrecarga citotóxica de Ca^{2+} intracelular mediante la activación específica de canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática que probablemente participen en la ECC (Yanamandra, N. y cols. 2011). A su vez, se ha sugerido que ciertos componentes moleculares de la ECC pudieran usarse como biomarcadores de procesos cancerígenos y el análisis de su expresión en biopsias de tejido tumoral podría proporcionar información valiosa para el pronóstico de su evolución. Así, la proporción relativa de STIM1 y STIM2 podría usarse como marcadores de prognosis, agresividad y progresión tumoral en cáncer de mama (Aytes, A. y cols. 2012; McAndrew, D. y cols. 2011). De hecho, la sobre-expresión de STIM1 observada en la mayoría de los casos de cáncer cervical en estadio temprano podría estar asociada a un mayor riesgo de metástasis y resistencia (Chen, L. y cols. 2011). En el caso del adenocarcinoma de pulmón, la alta expresión del canal TRPC3 está asociada a una prognosis más favorable (Saito, H. y cols. 2011).

Al comprender una gran diversidad de patologías de origen y pronóstico diferente, el tratamiento de la leucemia depende totalmente del tipo de leucemia, grado de afectación y edad del paciente, fundamentalmente. El tratamiento de las

leucemias agudas suele ser más agresivo y se basa en la quimioterapia. La radioterapia se puede utilizar conjuntamente con la quimioterapia.

El trasplante de médula ósea es, en muchas ocasiones, el único tratamiento definitivo, pero dependerá de la edad, del tipo de leucemia a tratar (generalmente las leucemias agudas) y de la compatibilidad entre el donante y el receptor.

Las terapias biológicas o inmunoterapias, así como la terapia génica están en constante investigación y serán tratamientos determinantes en un futuro cercano tanto para curar como para disminuir las complicaciones de este tipo de cáncer hematológico.

4. ENTRADA CAPACITATIVA DE CALCIO Y CÁNCER

4.1. REMODELACIÓN DE LA ECC EN LA PATOGÉNESIS DEL CÁNCER

Como se ha descrito, en células tumorales se han registrado cambios en la expresión de los componentes moleculares de la ECC y, consecuentemente, en la homeostasis del Ca^{2+} , mostrando normalmente una expresión incrementada.

4.1.1. Expresión diferencial de los componentes moleculares de la ECC y cáncer

Se ha constatado una elevada expresión de Orai3 en células de tumores cancerosos mamarios (Faouzi, M. y cols. 2011), de STIM1 en el 71% de los casos de cáncer cervical en estadio temprano (Chen, L. y cols. 2011), de TRPC1 en adenocarcinoma de mama (Dhennin-Duthille, I. y cols. 2011), y de TRPC6 en células de glioma, de cáncer de esófago y en células epiteliales de cáncer gástrico (Cai, R. y cols. 2009; Ding, X. y cols. 2010; Shi, Y. y cols. 2009).

Así, las líneas celulares de cáncer de mama que poseen receptores de estrógenos (RE^+) presentan una ECC principalmente regulada por STIM1/2 y Orai3, mientras que células de cáncer de mama que carecen de ellos (RE^-) presentan una ECC regulada principalmente por STIM1 y Orai1 (Motiani, R.K. y cols. 2010). Un estudio ha comprobado que los tumores de cáncer de mama cuyas células poseen una mayor proporción de moléculas STIM1 respecto a STIM2, tienen una prognosis significativamente peor (McAndrew, D. y cols. 2011). Por otra parte, se ha observado que la sobre-expresión de STIM2 en el 63,5% de los casos de tumor colorectal está asociada a una proliferación celular disminuida y a un fenotipo menos invasivo,

sugiriendo que el aumento de la expresión de STIM2 confiere un fenotipo menos agresivo (Aytes, A. y cols. 2012). En otros modelos celulares, se ha observado que la sobre-expresión de STIM2 está asociada a una reducción de la ECC (Lopez, E. y cols. 2012), sugiriendo que el fenotipo menos agresivo pudiera estar asociado también a una ECC reducida. De hecho, las células de melanoma B16BL6 malignas muestran una ECC elevada en comparación con células B16BL6 no malignas (Feldman, B. y cols. 2010). Por tanto, la actividad de la ECC y sus propiedades biofísicas podría determinar también la agresividad del tejido tumoral.

4.1.2. Angiogénesis

Estudios recientes también han constatado la participación de la ECC en la angiogénesis (Fiorio Pla, A. y cols. 2012), proceso por el cual las células epiteliales progenitoras (CEP) generan nuevos vasos sanguíneos durante el desarrollo de cualquier organismo multicelular. Las células cancerosas que forman tumores sólidos son capaces de estimular esta actividad y forzar a las CEP a formar nuevos vasos que rodean e irrigan la masa tumoral, un proceso imprescindible para el crecimiento del tumor una vez alcanzado un tamaño crítico, ya que la inhibición de la formación de vasos frena en muchos casos su crecimiento. Por ejemplo, estudios *in vitro* han demostrado que tanto el silenciamiento mediante técnicas de siRNA de Orai1, TRPC3 o TRPC6 en CEP inhibe su capacidad de formación de nuevos vasos *in vitro* (Antigny, F. y cols. 2012; Ge, Y.L. y cols. 2009; Hamdollah Zadeh, M.A. y cols. 2008; Kini, S. y cols. 2010; Li, M. y cols. 2011), sugiriendo que también pudiera tener una función similar durante la angiogénesis en procesos tumorales. Por otra parte, se ha comprobado que las CEP aisladas de la sangre de pacientes con cáncer sufren una remodelación del mecanismo de la ECC, incrementando la expresión de Orai1, STIM1 y TRPC1 e indicando una posible función importante de la ECC durante la angiogénesis inducida por tumores (Lodola, F. y cols. 2012).

El silenciamiento de STIM1 en células de cáncer cervical mediante siRNA inhibe la angiogénesis en modelos animales (Chen, L. y cols. 2011). Asimismo, el silenciamiento de TRPC6 mediante siRNA en células humanas de glioma U373MG reduce su capacidad de estimular la formación de nuevos vasos *in vitro* si se cultivan junto con células endoteliales vasculares HMEC-1 (Chigurupati, S. y cols. 2010). Y en modelos animales, se

ha visto que el silenciamiento de TRPC6 en células de glioma también inhibe la angiogénesis (Chigurupati, S. y cols. 2010).

4.1.3. Apoptosis

La ECC también participa en la apoptosis de células cancerosas. La inhibición farmacológica de la ECC o la reducción de la expresión de STIM1 mediante siRNA inhibe la apoptosis de las células de cáncer de colon HCT-116 inducido por butirato de sodio (Sun, S. y cols. 2012). Otro estudio sugiere que la resistencia a la apoptosis que presentan las células de cáncer de próstata andrógeno-independientes está asociada a una disminución de la expresión de Orai1 y de la ECC (Flourakis, M. y cols. 2010). En dichas células, la sobre-expresión *in vitro* de Orai1 restablece la ECC y la apoptosis celular hasta condiciones normales (Flourakis, M. y cols. 2010). Esto indica que la alteración de la expresión de Orai1 y la función de la ECC, en este caso su disminución, poseen un papel crítico en la adquisición de la resistencia apoptótica en estas células. Resultados similares se han observado en otras líneas celulares de cáncer de próstata humano llamadas DU145, las cuales presentan una disminución de la expresión de Orai1 y de la ECC inducida por la sobre-expresión del gen *SOX2* y esto les confiere resistencia a la apoptosis (Jia, X. y cols. 2011).

4.1.4. Migración e invasión (metástasis)

El silenciamiento o la sobre-expresión de TRPC1 en líneas celulares de cáncer de próstata PC-3, inhibe la migración de estas células, indicando que el adecuado control de la entrada de Ca^{2+} mediado por este canal es necesario para la migración (Maroto, R. y cols. 2012). También se ha encontrado que este mismo canal es esencial para la migración quimiotáctica *in vitro* de células de glioma inducida por factor de crecimiento epidérmico (EGF), ya que el silenciamiento de TRPC1 mediante siRNA inhibe su migración (Bomben, V.C. y cols. 2011). El silenciamiento de la expresión de STIM1 y Orai1 o la inhibición farmacológica de la ECC, reduce considerablemente la migración *in vitro* de líneas celulares de cáncer de mama humanas MDA-MB-231 altamente metastatizantes (Yang, S. y cols. 2009). Este resultado también se ha comprobado *in vivo* en modelos animales donde se observa una disminución de la invasión de dichas células una vez tratada y trasplantadas. Mediante siRNA de TRPC1 se produce una disminución de las propiedades adhesivas e invasivas de estas células cancerosas, indicando que este

canal podría estar involucrado en la fase de metástasis e invasión de este tipo de cáncer (He, B. y cols. 2012).

4.1.5. Proliferación celular

Se ha confirmado que la ECC también participa en la proliferación de las células cancerosas (Courjaret, R. y cols. 2012). Así, la inhibición mediante técnicas de micro ARN de interferencia (siRNA) de la expresión de Orai3 *in vitro* en células cancerosas MCF7 atenúa su acelerada proliferación celular, indicando una función importante de Orai3 en su fisiología (Faouzi, M. y cols. 2011; Motiani, R.K. y cols. 2013). En células de cáncer cervical, el silenciamiento de la expresión de STIM1 también disminuye su proliferación (Chen, L. y cols. 2011). Resultados similares se han obtenido inhibiendo farmacológicamente la ECC en líneas celulares humanas U251 de glioblastoma multiforme (Liu, H. y cols. 2011). De manera opuesta, la sobre-expresión *in vitro* de Orai1 en líneas celulares de cáncer de pulmón A549 atenúa su proliferación (Hou, M.F. y cols. 2011). En la línea celular de glioblastoma multiforme D54MG, la inhibición farmacológica o el silenciamiento mediante siRNA de TRPC1 produce una disminución de la ECC que desemboca en una división incompleta y una reducción de la proliferación en estas células (Bomben, V.C. y cols. 2010). Por el contrario, la sobre-expresión de TRPC1 observada en células de adenocarcinoma de mama se correlaciona con su acelerada proliferación patológica (Dhennin-Duthille, I. y cols. 2011). También se ha visto que TRPC6 participa en la proliferación de líneas celulares humanas de cáncer hepático DU145, PC3, Huh-7 y HepG2 (El Boustany, C. y cols. 2008) (Wang, Y. y cols. 2010). La sobre-expresión o el silenciamiento *in vitro* de TRPC6 en dichas células aumenta o disminuye, respectivamente, la entrada de Ca^{2+} a la célula y su velocidad de proliferación. Además, se ha encontrado que la expresión de TRPC6 es mayor en hepatocitos extraídos de tumores que de tejidos sanos, indicando todo ello que el incremento de TRPC6 en tejidos cancerosos pudiera ser responsable en parte de su exacerbada proliferación (El Boustany, C. y cols. 2008). Resultados similares acerca de la expresión de TRPC6 se han obtenido con células de glioma humanas, de cáncer de mama, en células escamosas de cáncer de esófago o en células epiteliales de cáncer gástrico (Aydar, E. y cols. 2009; Cai, R. y cols. 2009; Dhennin-Duthille, I. y cols. 2011; Ding, X. y cols. 2010; Guilbert, A. y cols. 2008; Shi, Y. y cols. 2009). Debido a su papel en la proliferación celular, TRPC6 también juega un papel importante en el desarrollo del fenotipo más maligno y agresivo que suelen desarrollar este tipo de células cancerosas

en condiciones de hipoxia, así como el tamaño del tumor que generan dichas células trasplantadas en modelos animales *in vivo* (Cai, R. y cols. 2009; Chigurupati, S. y cols. 2010; Ding, X. y cols. 2010; Shi, Y. y cols. 2009). El silenciamiento de TRPC6 en células de glioma también aumenta la eficacia del tratamiento antitumoral mediante radiación ionizante, indicando que la sobre-expresión de TRPC6 es responsable de su acelerado crecimiento celular. Por último, en células de cáncer de ovario humano se ha comprobado que TRPC3 participa tanto en proliferación celular como en crecimiento tumoral en ratones inyectados con dichas células modificadas (Yang, S. y cols. 2009).

4.2. PAPEL DE STIM Y LOS CANALES ASOCIADOS EN EL CÁNCER

Numerosos estudios, especialmente basados en la regulación de los canales del Ca^{2+} de la membrana plasmática y los cambios en su expresión asociados con el desarrollo del tumor, han revelado el papel potencial de STIM1 y los canales asociados (Orai y TRPC) (Figura 33) en la patogénesis de una variedad de tipos de cáncer, participando en diversas características tumorales como la migración, la metástasis, la proliferación o la resistencia a la apoptosis (Jardin, I. y cols. 2016). STIM1 fue identificada como una proteína involucrada en la detención del crecimiento y degeneración del tumor de Wilm y las líneas celulares G401 y RD de rhabdomyosarcoma; sugiriendo el hecho de que STIM, desempeñara un papel relevante en la patogénesis de estas neoplasias (Sabbioni, S. y cols. 1997).

4.2.1. Papel de STIM1 y SOC en procesos de migración e invasión (metástasis)

La migración es una función esencial de las diferentes células que permite a los organismos multicelulares desarrollarse, reparar los tejidos dañados y protegerse de patógenos invasivos. Las células malignas del cáncer utilizan su habilidad migratoria intrínseca para invadir nuevos tejidos y metastatizar (Prevarskaya, N. y cols. 2011). La movilización intracelular del Ca^{2+} juega un papel relevante en la migración, tanto de células malignas como en las células no-malignas. La primera evidencia de la participación del STIM1 en la migración y en la metástasis viene de estudios en células del cáncer de mama donde éste y Orai 1 influyen en la migración de las células de cáncer de mama *in vitro*, y en la metástasis del tumor de cáncer de mama estudiado en ratones. El papel de STIM y Orai en la patogénesis parece estar mediado por la entrada del Ca^{2+} a

través de la ECC, ya que el uso de inhibidores farmacológicos de este canal atenúa la metástasis *in vivo* (Yang, S. y cols. 2009).

Otros estudios han revelado que STIM1 es también importante en la migración de otros tipos de cáncer como el cervical, el cáncer gástrico humano, el colorrectal y el melanoma, así como en el desarrollo de otras características del cáncer como la proliferación y la angiogénesis (Chen, L. y cols. 2011). También puede servir como valor pronóstico, pues la expresión de STIM1 era mayor en tejidos con cáncer hepático que en tejidos precancerosos, lo que nos alerta del perfil metastásico del paciente (Yang, N. y cols. 2013). Stanisz y cols., informaron de una mejora en la expresión de Orai1 y STIM1 en el borde invasivo del tumor, revelando así su papel potencial en la invasión o metástasis tumoral *in vivo* (Stanisz, H. y cols. 2016). El papel de TRPC1 en la migración celular viene de estudios que indican que una supresión de la expresión del TRPC1 perjudica a la migración celular en células HT1080 del fibrosarcoma (Huang, J.B. y cols. 2004) Por tanto, la ECC, mediada por STIM, Orai y TRPC juega un papel relevante en la migración y la metástasis (Jardin, I. y cols. 2016).

4.2.2. Papel de las proteínas STIM y los canales de calcio asociados en la apoptosis

La habilidad de las células del cáncer de evadir la apoptosis es una característica importante para su desarrollo y resistencia a la terapia. El papel de STIM y SOC en el desarrollo de la apoptosis en células cancerígenas es controvertido.

No obstante, los estudios realizados en cáncer de próstata sugieren que la entrada del Ca^{2+} a través de la ECC es requerida para la apoptosis.

De acuerdo con las observaciones aportadas por (Yanamandra, N. y cols. 2011), la apoptosis inducida por tipifarnib, una quinolona con actividad antineoplásica, depende de la entrada del Ca^{2+} mediada por Orai3 y es sensible a inhibidores farmacológicos de SOCE. Estos hallazgos indican que canales Orai3 y la ECC están involucrados en la apoptosis inducida por tipifarnib. Por tanto, una atenuación de la ECC y de Orai3 favorecería la evasión de las células a la apoptosis (Jardin, I. y cols. 2016).

Sin embargo, STIM1 y Orai 1, cuando su expresión está disminuida parece que favorece la apoptosis celular.

En resumen, los hallazgos sobre el papel de la ECC, STIM, Orai y TRPC de hoy en día en la apoptosis son contradictorios, pues estudios sugieren un papel pro-apoptótico para la ECC y otros un papel anti-apoptótico o superviviente. Es probable que esta

discrepancia sea el tipo de célula en el que se realizan los estudios, ya que la expresión de estos canales es diferente en función del tipo de célula, por lo que este papel debería ser evaluado en los distintos tipos celulares (Jardin, I. y cols. 2016).

4.2.3. Papel de STIM y canales Orai en la migración y metástasis tumorales

La migración es una función esencial de cualquier célula eucariota dentro de un sistema pluricelular de tejidos diferenciados, que permite a este sistema la protección contra patógenos invasivos, desarrollo y reparación de los tejidos. Las células cancerosas malignas usan esta capacidad intrínseca para invadir nuevos tejidos y metastatizar. El incremento de la capacidad migratoria y la proteólisis de la matriz extracelular son necesarios para desarrollar los procesos anteriores (Prevarskaya, N. y cols. 2011). La movilización de Ca^{2+} intracelular juega un papel relevante en la reorganización del citoesqueleto, induciendo la contracción de la miosina II, y desorganización de la placa focal tanto en células malignas como normales. Además, en los procesos migratorios, proteínas encargadas del desarrollo de las señales de Ca^{2+} , como la PLC o STIM1, se sitúan al frente de la célula dirigiendo la migración celular (Tsai, F.C. y cols. 2014).

Las primeras evidencias de la implicación de STIM1 y Orai1 en la migración y metástasis tumoral provienen de experimentos en cáncer de mama. Estas dos moléculas intervienen en la patogénesis tumoral debido a su papel en la ECC, ya que con la inhibición farmacológica de la última se ha probado una disminución de la metástasis *in vivo* (Yang, S. y cols. 2009). Estudios posteriores demuestran la importancia de STIM1 en la migración, proliferación y angiogénesis del cáncer de cérvix. Al igual que en el cáncer de mama, la función de STIM es mediar la entrada de Ca^{2+} , quedando demostrada su implicación en el desarrollo de este tumor con el uso de bloqueadores de la movilización de Ca^{2+} , los cuales promueven una reducción del tamaño del tumor (Chen, L. y cols. 2011). En las células cancerosas de cuello de cérvix, la relación entre STIM1 y Orai1 es mediada por la deacetilasa histona 6 (HDAC6) asociada a microtúbulo (Chen, L. y cols. 2011). Los estudios de STIM en varios tipos de células tumorales han resaltado la importancia de esta proteína en los procesos de migración. El papel que desarrolla está relacionado con la activación de canales de membrana plasmática y la activación de señales espaciotemporales de Ca^{2+} que regulan la migración. STIM1 también desarrolla un papel en la desorganización de la placa focal. Experimentos en células de cáncer hepático y de cérvix, describen que por deficiencias de la función de STIM1 se produce un aumento de la adhesión focal y reducción de la reorganización de la misma (Yang, N.

y cols. 2013). En ciertas líneas celulares de cáncer de cérvix, STIM se ve envuelto en la activación de una proteína Pyk2 regulada por Ca^{2+} , una tirosina cinasa asociada con la descomposición de la adhesión focal y la reorganización del citoesqueleto y por tanto la locomoción de estas células cancerígenas (Chen, Y.F. y cols. 2013).

En otros tipos celulares se ha demostrado que STIM1 y canales asociados como Orai1 solo tiene relación con el aumento de la migración e invasión y no mantienen ninguna relación con otras características tumorales. En células de glioblastoma multiforme, el cual exhibe niveles superiores en la ECC y mayor expresión de Orai1, la disminución de la expresión de STIM1 y Orai1 produce una reducción en la migración, pero no altera la proliferación celular comparado con células astrocíticas normales (Motiani, R.K. y cols. 2013). Para el análisis del papel del Ca^{2+} en la migración tumoral, Stanisz et al., describieron una mayor expresión de Orai1 y STIM2 en el borde invasivo del tumor, descubriendo su potencial en la invasión y metástasis *in vivo*. De forma paralela, si se produce el silenciamiento de STIM2 y Orai1 en células cancerígenas de melanoma, se mejora la proliferación y se reduce la migración y capacidad invasiva. Como resultado, los autores propusieron que la ECC mediada por STIM2 y Orai1 está implicada en el cambio de estado en las células cancerígenas, desde una forma proliferativa a una migratoria e invasiva.

4.2.4. Papel de STIM y sus canales asociados en la proliferación celular

Existe un número creciente de evidencias que sugieren que la ECC juega un papel relevante en la proliferación de células tumorales. Las evidencias actuales indican que los cambios en la expresión de STIM, como Orai y canales TRPC (Figura 34) están implicados en la proliferación anormal de diferentes células cancerosas. En diferentes líneas celulares melanocíticas se ha registrado una expresión aumentada de STIM1 y Orai1 acompañado de un incremento de la ECC, desarrollando un papel en la proliferación celular (Umemura, M. y cols. 2014). Acompañando esta correlación entre la ECC y sus agentes con la proliferación celular encontramos que; en células neuroblásticas tipo N, en las que se induce ácido retinoico (AR), se registra un cambio de un estado proliferativo a otro diferenciado, lo que se acompaña de la disminución en la actividad de la ECC así como en la expresión de STIM1 y Orai1 (Bell, N. y cols. 2013). Por contraste, la proliferación de células metastásicas de melanoma renal humano han

demostrado ser insensible a inhibidores de la ECC incluidos gadolinium, 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB) o carboxiamaidotriazol (Dragoni, S. y cols. 2014).

En la línea celular de astrocitoma U373 y U87 y U251 de glioblastoma multiforme (Li, M. y cols. 2011), han registrado la sobre-expresión de STIM1 comparada con células HEK-293. En células U251 la disminución específica de STIM1 a través del bloqueo de su ácido ribonucleico (ARN) inhibe la proliferación celular induciendo el arresto en la fase G_0/G_1 del ciclo celular. En relación a estos descubrimientos, en dos líneas celulares primarias (GBM1y GBM8) conseguidas por extracción quirúrgica de glioblastoma multiforme cerebral, Orai1 y STIM1 se encuentran aumentados comparado con astrocitos primarios humanos. Sin embargo, al contrario que los resultados encontrados en las líneas celulares de glioblastoma multiforme estable U251, la disminución de STIM1 tiene un efecto mínimo sobre la proliferación celular y sólo Orai1 fue descrito desarrollando un papel importante (Motiani, R.K. y cols. 2013).

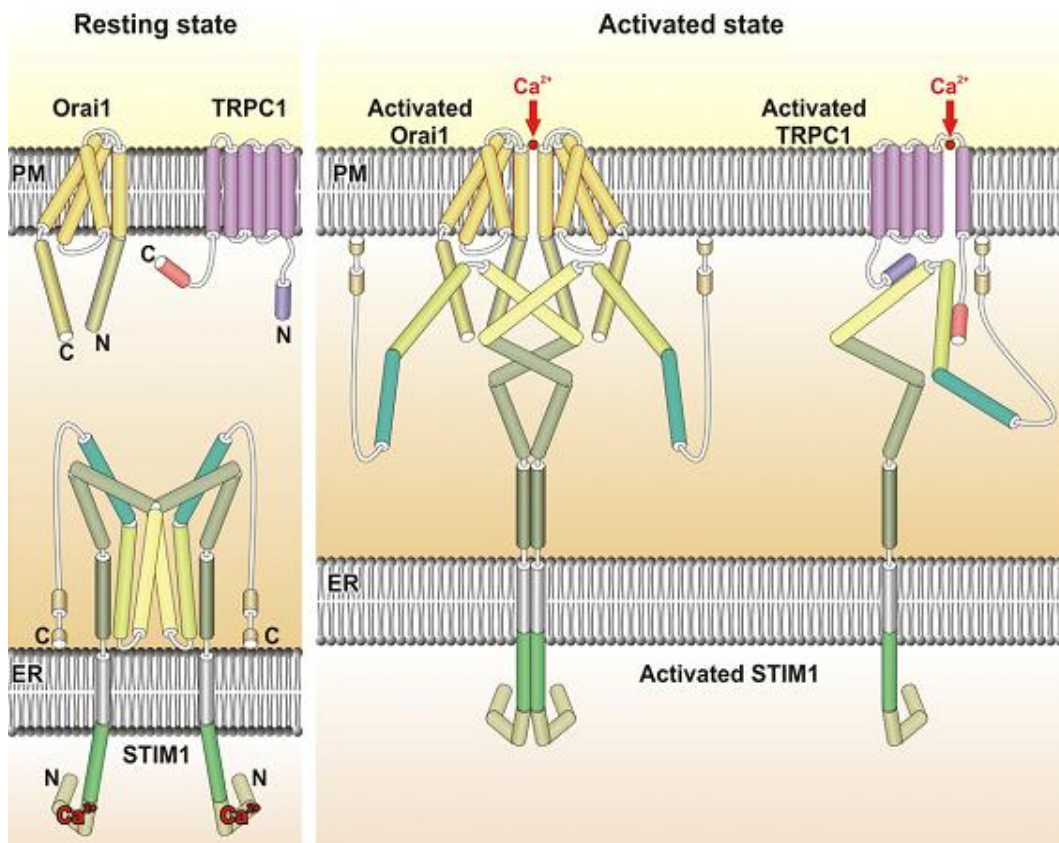


Figura 34. Representación esquemática de la interacción de STIM1 con los canales permeables de Ca^{2+} Orai1 y TRPC1 en humano. (Jardin, I. y cols. 2016).

Tras analizar la ECC en muchas tipologías de células cancerígenas se describe cómo distintas isoformas de STIM y Orai son encargadas de controlar los movimientos de Ca^{2+} dependientes de las reservas y en consecuencia, la proliferación celular. En las células de melanoma, Orai1 y STIM2 están altamente expresados y regulan la ECC. En estas células la disminución de estas moléculas produce una reducción en la ECC y migración celular pero aumenta la proliferación (Stanisz, H. y cols. 2014). En células de cáncer de mama con expresión de receptor estrogénico, como células MCF7 y T47D. (Faouzi, M. y cols. 2011) han descrito la reducción de Orai3 como un evento que induce el arresto del ciclo celular en la fase G_1 . Montiani y cols., mostraron que mientras que en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 sin receptor estrogénico, los agonistas inducen la ECC a través de STIM1 y Orai1; en las células que expresan receptor estrogénico la entrada de Ca^{2+} es principalmente mediada por los canales Orai3. Basado en el efecto negativo de la disminución de receptores α sobre la expresión de Orai3, Montiani et al., concluyen que la expresión de Orai3 está regulada por los receptores α . En consecuencia, en células que expresan receptores estrogénicos el aumento de Orai3 podría cambiar el balance estequiométrico en favor de la interacción entre Orai3 y STIM1 en vez de STIM1/Orai1.

Sobre el papel de los canales TRPC en el desarrollo de la ECC se han desarrollado multitud de estudios donde los canales TRPC1 han sido descritos jugando un papel relevante en la regulación de la proliferación celular y motilidad (Ariano, P. y cols. 2011; Fabian, A. y cols. 2011; Fabian, A. y cols. 2008; Zanou, N. y cols. 2010). Pero el papel de TRPC1 varía dependiendo si se trata de una célula tumoral o no. En las células tumorales se relaciona con un cambio hacia la apoptosis, mientras que en células no tumorales promueve la proliferación celular (Nilius, B. y cols. 2007). TRPC1 está frecuentemente sobre-expresado en tumores pequeños y con baja proliferación, mientras que otras isoformas de TRP, como TRPM7, está comúnmente sobre-expresado en tumores de mayor tamaño y perfil proliferativo (Dhennin-Duthille, I. y cols. 2011). Se han mostrado evidencias del papel de TRPC1 en la proliferación de células de carcinoma, en las que el bloqueo de la expresión de TRPC1 produce un arresto en la fase G_0/G_1 del ciclo celular. (Tajeddine, N. y cols. 2012). Dentro de las muchas isoformas de TRP debemos destacar el papel que cumple TRPC6 en la regulación de la ECC y la proliferación.

4.2.5. Papel de STIM en la resistencia a fármacos

La entrada de Ca^{2+} mediada por SOCE y su principal mediador STIM1 están implicados en numerosos procesos patológicos típicos del cáncer. La expresión de STIM1 está significativamente incrementada, por ejemplo, en la quimioresistencia de osteosarcoma. Los pacientes con expresión de STIM1 exhibieron, en general, peor supervivencia que los pacientes con STIM1 negativo.

Además, se ha visto una desregulación en la expresión de STIM1 y SOCE en células MG63/CDDP resistentes a cisplatino. El tratamiento con cisplatino redujo la expresión de STIM1 y SOCE en células MG63 sensibles a cisplatino, pero no tuvo efectos en las células MG63/CDDP.

Tanto STIM1 como la entrada de Ca^{2+} contribuyen a la resistencia del cisplatino a través de inhibición de la apoptosis mediado por estrés del RE y proporcionar pistas importantes sobre los mecanismos implicados en la resistencia al cisplatino para el tratamiento del osteosarcoma. En este sentido, STIM1 representa una diana del cisplatino y bloqueante de la entrada de Ca^{2+} mediada por STIM1, lo que podría ser una estrategia útil para mejorar la eficacia del cisplatino para el tratamiento de osteosarcoma (Sun, X. y cols. 2017).

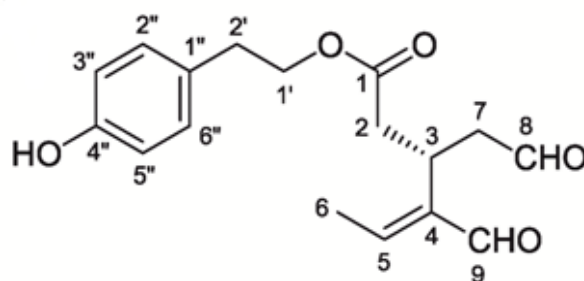
En otros estudios, STIM1 y SOCE mediado por Orai1, controlan la progresión del ciclo celular y la metastatización en varios tumores humanos, incluyendo los de glía (Motiani, R.K. y cols. 2013), hígado (El Boustany, C. y cols. 2008), mama y cuello de útero (Chen, Y.F. y cols. 2011). Por el contrario, hasta ahora no se ha establecido un rol funcional en carcinogénesis para los parálogos de STIM1 y Orai1, es decir, STIM2 y Orai2, mientras que Orai3 es reclutado por STIM1 para activar la ECC y la proliferación celular en algunas líneas celulares de cáncer de mama humano con RE⁻ (Motiani, R.K. y cols. 2010). Alternativamente, STIM1 podría disparar la ECC al transportar la carga de Ca^{2+} del RE a vías permeables a Ca^{2+} no selectivas, como las que pertenecen a la familia TRPC1-7. STIM1 puede unirse y activar TRPC1, TRPC4 y TRPC5. Además, STIM1 hace que TRPC3 y TRPC6 medien la ECC al mediar la heteromultimerización de TRPC3 con TRPC1 y TRPC6 con TRPC5 (Worley, P.F. y cols. 2007). TRPC1 y TRPC6 se han relacionado de manera convincente con SOCE en un amplio número de tumores humanos, incluido el carcinoma de mama, glioblastoma multiforme (GBM) (Bomben, V.C. y cols. 2011; Chigurupati, S. y cols. 2010) y hepatoma (El Boustany, C. y cols. 2008; Enfissi, A. y cols. 2004). Esto, presenta a la ECC como un objetivo alternativo para los nuevos

tratamientos antimetastásicos (Chen, Y.F. y cols. 2013; Lodola, F. y cols. 2012; Prevarskaya, N. y cols. 2011).

DCPA (3,4-dicloro propioanilida) es un agente que inhibe la diferenciación terminal de osteoclastos. La inhibición del canal CRAC, mediada por DCPA, se produce a través de la inhibición de la interacción STIM1-Orai1. Este compuesto tiene una baja toxicidad sistémica que puede inhibir el flujo de Ca^{2+} en macrófagos y células T, además de tener una actividad antiinflamatoria (Lewis, T.L. y cols. 2008; Ustyugova, I.V. y cols. 2007; Xie, Y.C. y cols. 1997). El efecto del DCPA en la asociación STIM1-Orai1 se determinó en células HEK293 transfectadas con STIM1-YFP (Wang, Y. y cols. 2009). La inhibición farmacológica de SOCE reduce la multinucleación de los osteoclastos humanos. También se ha mostrado que DCPA bloquea el funcionamiento del canal de Ca^{2+} operado por los depósitos en células Jurkat, sin efecto en el contenido de Ca^{2+} del RE (Lewis, T.L. y cols. 2008).

5. OLEOCANTAL Y CÁNCER

La molécula la describió el científico G.F. Montedoro en 1992, pero su descubrimiento no conllevó darle nombre comercial ni mucho menos una identificación como potente antiinflamatorio similar a los AINES, esto es, antiinflamatorios no esteroideos como el ibuprofeno o la aspirina. El biólogo Gary Beauchamp y cols (Beauchamp, G.K. y cols. 2005), lo llamaron oleocanthal, por la palabra “oleo” aceite, canth de “acanthos” picor y “al” de aldehído. Este compuesto es, por tanto, un éster del tirosol y su estructura química está relacionada con la oleuropeína, molécula que da el sabor amargo a ciertas variedades de aceite de oliva virgen extra (AOVE).



Oleocanthal (OLCT)

Figura 35. Estructura molecular del oleocantal (OLCT) (Díez-Bello, R. y cols 2019).

El (-)-Oleocantal (OLCT) [(-) –descarboximetil ligustrósido aglicona] (Figura 35) es un secoiridoide natural aislado del aceite de oliva virgen extra (EVOO, del inglés *extra-virgin olive oil*) conocido por sus efectos anticancerígenos, anti-angiogénicos, anti-inflamatorios y neuroprotectores tanto *in vitro* como *in vivo* (Abuznait, A.H. y cols. 2013; Akl, M.R. y cols. 2014; Mohyeldin, M.M. y cols. 2016; Pei, T. y cols. 2016; Rosignoli, P. y cols. 2013). Contiene abundantes componentes antioxidantes fenólicos que son potentes inhibidores de especies reactivas del oxígeno y está asociado con un menor riesgo de varios tipos de cáncer humano (Giacosa, A. y cols. 2013); además, tiene varios efectos biológicos contra la inflamación o enfermedad de Alzheimer (Busnena, B.A. y cols. 2013; Elnagar, A.Y. y cols. 2011; Parkinson, L. y cols. 2014; Qosa, H. y cols. 2015) (Scotece, M. y cols. 2013).

Estos secoiridoide polifenólicos del AOVE disminuyen la viabilidad de la sobre-expresión de HER2 en célula de cáncer de mama por selectividad induciendo muerte celular por apoptosis (Menendez, J.A. y cols. 2007). Estudios previos han mostrado su actividad como un potente antioxidante, agente anti-inflamatorio no esteroideo que inhibe COX-1 y COX-2, neuroprotector que altera la estructura y función de la neurotoxina β -amiloide y Tau, que están asociadas con los efectos debilitadores de la enfermedad de Alzheimer, inhibidor de proliferación, migración e invasión de células de cáncer de mama humano, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, cáncer de colon, melanoma y mieloma múltiple a través de la inhibición de c-Met, inhibidor de AMPK y de la proteína inflamatoria 1 α macrófaga (MIP-1 α) (Akl, M.R. y cols. 2014; Beauchamp, E.M. y cols. 2015; Busnena, B.A. y cols. 2013; Elnagar, A.Y. y cols. 2011; Fini, L. y cols. 2008; Fogli, S. y cols. 2016; Monti, M.C. y cols. 2012; Pei, T. y cols. 2016; Pitt, J. y cols. 2009; Pitt, S.C. y cols. 2009; Scotece, M. y cols. 2013).

5.1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN HGF/C-MET

c-Met, también conocido como proto-oncogén c-Met, proteína tirosina cinasa Met o receptor del factor de crecimiento hepatocítico (HGFR), es una proteína que codifica un receptor heterodimérico de tirosina cinasa (RTK) consistente en una cadena α extracelular y una cadena β transmembrana (Giordano, S. y cols. 1989; Park, M. y cols. 1987) (Figura 36).

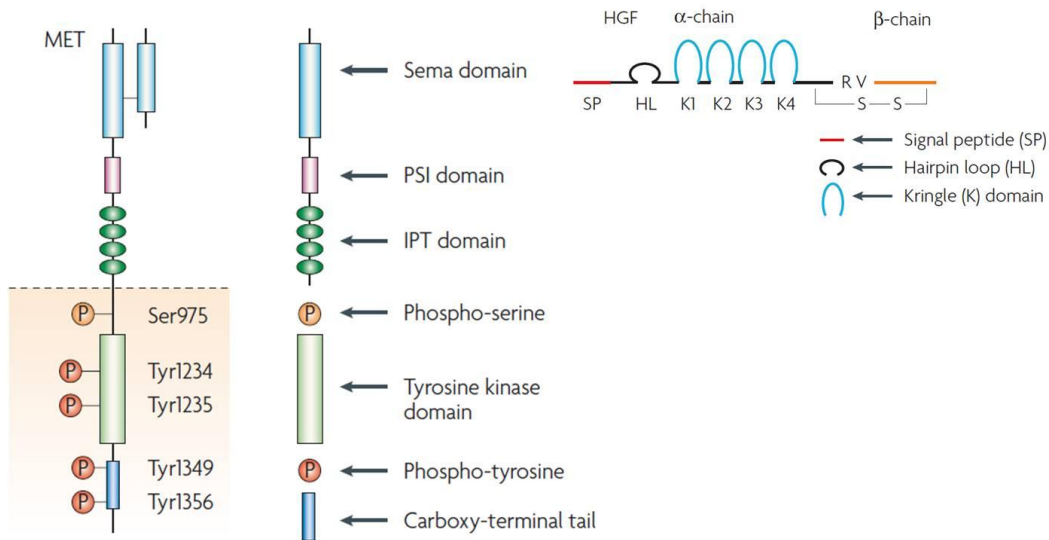


Figura 36. Representación esquemática del dominio estructural de c-Met. Receptor Met (izquierda) y su ligando HGF (derecha). Adaptado de Comoglio et cols., 2008.

El eje de señalización HGF/c-Met (Figura 37) está, frecuentemente, reactivado por células cancerígenas durante la tumorigénesis, crecimiento invasivo y progresión metastásica (Munshi, N. y cols. 2010). La desregulación de este eje promueve cambios en el citoesqueleto de muchas células tumorales y regula al alza diversas funciones de estas células, incluyendo la proliferación celular, motilidad, supervivencia o evasión a la apoptosis, angiogénesis, invasión, metástasis y transición epitelio-mesénquima (EMT) (Castro, N.E. y cols. 2010; Eder, J.P. y cols. 2009; Gherardi, E. y cols. 2012; Peruzzi, B. y cols. 2006).

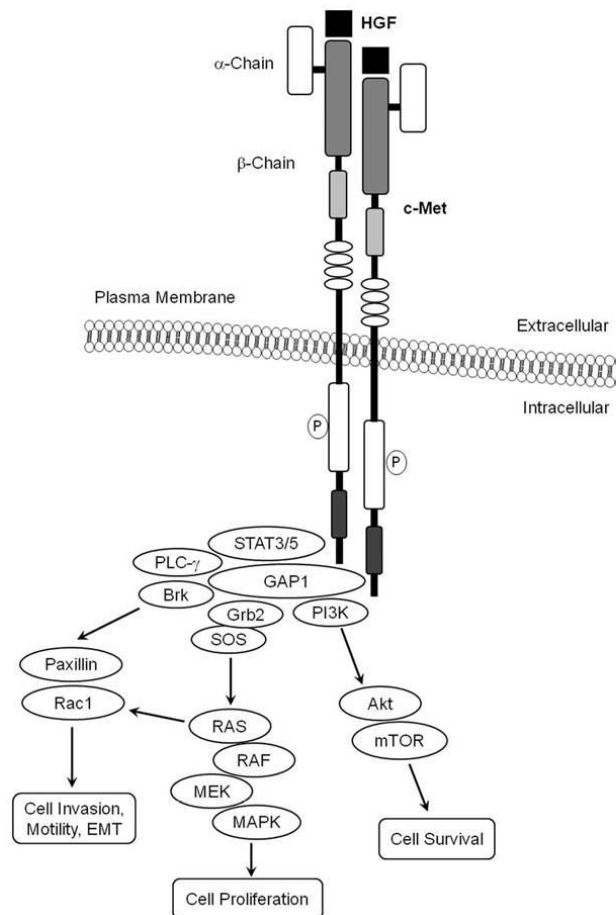


Figura 37. Representación esquemática de la vía de señalización de HGF/c-Met. El receptor de tirosina cinasa (c-Met), después de unirse con su ligando (HGF), activa un amplio número de diferentes vías de señalización, incluyendo aquellas implicadas en proliferación, motilidad, migración e invasión. (Akl, M.R. y cols. 2014).

El HGF se une al dominio extracelular de c-Met con alta afinidad e induce la dimerización del receptor con activación consecutiva de la actividad tirosina cinasa de c-Met (Eder, J.P. y cols. 2009). Esto va seguido del reclutamiento y fosforilación de múltiples proteínas adaptadoras así como la activación de moléculas de señalización como cinasa fosfoinosítida -3 (PI3K)/Akt, proteína cinasa activadora de mitógeno (MAPK), cinasa de tumor de mama (Brk) y fosfolipasa C- γ (PLC- γ) (Castro, N.E. y cols. 2010; Eder, J.P. y cols. 2009; Peruzzi, B. y cols. 2006). Akt, MAPK y Brk son necesarios no solo para regular la motilidad celular, adhesión e invasión mediados por c-Met, sino para controlar la supervivencia celular y la mitogénesis (Castro, N.E. y cols. 2010; Francone, T.D. y cols. 2007; Peruzzi, B. y cols. 2006). Actualmente, hay evidencias para la

implicación de una activación crónica o desregulada del receptor tirosina cinasa de c-Met y su ligando HGF en múltiples tipos de células tumorales llevando a mejorar el crecimiento celular, angiogénesis y supervivencia. Además, la actividad diana de c-Met con pequeñas moléculas inhibidoras de HGF/c-Met puede ser considerada una aproximación prometedora para el tratamiento y prevención del cáncer (Castro, N.E. y cols. 2010; Eder, J.P. y cols. 2009; Francone, T.D. y cols. 2007; Peruzzi, B. y cols. 2006).

Recientemente, hay evidencias que sustentan el papel del factor de crecimiento hepatocítico (HGF) y su receptor en el desarrollo y progresión del carcinoma de mama (Rho, O. y cols. 2011). Bajo condiciones fisiológicas, HGF regula el desarrollo epitelial y morfogénesis en diferentes órganos (Nakamura, T. y cols. 2011). En la mama humana, HGF se produce primariamente en el estroma mamario, mientras que c-Met es expresado en el epitelio (Kim, E.J. y cols. 2012). La activación de c-Met mediada por HGF resulta en un programa genético complejo referido como un “crecimiento invasivo”, consistente en una serie de procesos fisiológicos, incluyendo la proliferación celular, motilidad, invasión, angiogénesis y tubulogénesis de ramificación (Agarwal, S. y cols. 2009). c-Met es un promotor esencial de EMT, considerado éste como el primer paso en la progresión del cáncer, particularmente durante la migración, invasión y metástasis (Cooke, V.G. y cols. 2012).

Estudios previos han mostrado que la activación sostenida de la señalización HGF/c-Met está asociada con la disociación de uniones adherentes basadas en cadherinas, seguido de la pérdida de expresión de E-cadherina (Elliott, B.E. y cols. 2002; Reshetnikova, G. y cols. 2007). Las E-cadherinas son una familia de glicoproteínas transmembrana que median la adhesión célula-célula y se expresan en la mayoría de las células epiteliales, siendo responsable de la adheión inicial de esas células, así como de la polaridad. Los análisis de muchos tipos de cáncer epitelial sugirieron que la pérdida de E-cadherina está correlacionada con la invasión tumoral (Kalluri, R. y cols. 2009). La vimentina es una proteína filamentosa intermediaria que normalmente se expresa en células de origen mesenquimal y regula la migración celular en muchos tipos celulares (Vuoriluoto, K. y cols. 2011). Se ha demostrado que la pérdida de E-cadherina causa disrupción de la adhesión celular, así como de la polaridad, permitiendo el desarrollo de metástasis de las células tumorales, mientras que la translocación de β -catenina en el núcleo podría ser requerida para inducir la expresión de genes que promueven la proliferación celular e invasión (Kalluri, R. y cols. 2009).

Estudios recientes identificaron el OLCT como un potente inhibidor del dominio cinasa de c-Met (Elnagar, A.Y. y cols. 2011). Sin embargo, hay evidencias a través de la literatura que muestran que el mecanismo anticancerígeno del OLCT no está limitado a su actividad inhibitoria de c-Met.

El OLCT media sus efectos anticancerígenos a través de la disrupción de la vía de señalización de c-Met (Akl, M.R. y cols. 2014; Elnagar, A.Y. y cols. 2011). Recientemente, se han caracterizado los mecanismos intracelulares de OLCT y la supresión de su receptor de señalización c-Met en cáncer de mama de modelos de ratón (Akl, M.R. y cols. 2014). El OLCT reduce la actividad cinasa de c-Met, el crecimiento celular, la migración y la invasión de células de cáncer de mama, así como también induce la detención del ciclo celular en fase G1 y apoptosis, además de inhibir la señalización dependiente de c-Met en estas células.

Estudios previos indicaron que el OLCT es un potente inhibidor de la vía de señalización de c-Met por inhibición de la fosforilación de c-Met, mediada por HGF y su vía de señalización mitogénica corriente abajo en células de cáncer de mama (Akl, M.R. y cols. 2014; Mohyeldin, M.M. y cols. 2016), inhibiendo la proliferación, la migración y la invasión de células de cáncer de mama y cáncer de próstata (Elnagar, A.Y. y cols. 2011). Este efecto inhibitorio está asociado con el bloqueo de EMT y la reducción de la motilidad celular.

Como se viene explicando, no sólo se ha visto la actividad antioxidante y antiproliferativa del OLCT en diferentes tipos celulares de diferentes tipos de cáncer. Su actividad anti-inflamatoria está mediada a través de la inhibición de la proteína 1 α (MIP-1 α) y la expresión y secreción de interleucina-6 (IL-6), de 5-lipooxigenasa (enzima que cataliza el paso inicial en la biosíntesis de leucotrienos pro-inflamatorios) (Rosignoli, P. y cols. 2013; Scotece, M. y cols. 2012; Scotece, M. y cols. 2013) y de la proteína 90 de choque térmico (Hsp90), una chaperona molecular esencial implicada en las diferentes características distintivas del cáncer (Margarucci, L. y cols. 2013).

Los efectos antiproliferativos del OLCT están mediados por la inhibición de múltiples moléculas de señalización corriente abajo de c-Met, incluyendo la proteína cinasa B (Akt), proteína cinasa activadora de mitógeno (MAPK), transductores de señal y activadores de transcripción-3 (STAT-3) y diana de rapamicina en ceúlas de mamífero (mTOR) en múltiples células de cáncer (Akl, M.R. y cols. 2014; Fogli, S. y cols. 2016; Khanal, P. y cols. 2011; Khanfar, M.A. y cols. 2015; Pei, T. y cols. 2016; Scotece, M. y cols.

2013). Además, a través de la modulación de la expresión de ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas e interrupción de formación de proteínas, el OLCT induce la parada del ciclo celular en células de cáncer (Akl, M.R. y cols. 2014). También provoca muerte celular programada, resultando en actividad citotóxica en células de cáncer de mama, caracterizada por la activación de caspasa-8 y caspasa-3, elevación en niveles de poli (ADP-ribosa) polimerasa escindida (PARP) y regulación a la baja de la expresión de Bcl-2 (Akl, M.R. y cols. 2014; Fogli, S. y cols. 2016; Pei, T. y cols. 2016; Scotece, M. y cols. 2013). LeGendre, O. y cols., indicaron que el OLCT promovía la muerte de células de cáncer por desestabilización de membranas lisosomales, llevando a necrosis y/o apoptosis a las células cancerígenas.

HIPÓTESIS



"Hay que perseverar y sobre todo, tener confianza en uno mismo",

Marie Curie.

HIPÓTESIS

Según los antecedentes bibliográficos, nuestra hipótesis de trabajo es que las células tumorales remodelan los mecanismos de entrada de calcio para lograr ciertas ventajas sobre aquellas células sanas o no tumorales del organismo. Incrementos en la proliferación celular, así como la capacidad para invadir tejidos, son mejoras biológicas que este tipo de células tumorales adquieren a través del remodelado de la entrada de calcio.

OBJETIVOS



"Todo parece imposible, hasta que se hace",

Nelson Mandela.

OBJETIVOS

- 1.- Analizar la expresión de STIM1, los canales Orai y TRPC en la línea celular de leucemia mieloide aguda (LMA), HL60.

- 2.- Determinar la función de las proteínas objeto de estudio en la proliferación celular, así como en los procesos de invasión tisular en la línea celular HL60.

- 3.- Dilucidar el papel del canal TRPC6 en las características fenotípicas de las líneas celulares de cáncer de mama MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231.

- 4.- Caracterizar el papel del TRPC6 en el efecto antitumoral del oleocantal en las líneas celulares de cáncer de mama MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231.

OBJECTIVES

- 1.- To analyze the expression of STIM1, Orai and TRPC channels in the acute myeloid leukemia (AML) cell line, HL60.

- 2.- To determine the function of proteins under study in cell proliferation, as well as the processes of tissue invasion in HL60 cell line.

- 3.- To explore the role of TRPC6 channel in the phenotypic characteristics of breast cancer cell lines MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231.

- 4.- To characterize the role of TRPC6 in the antitumoral effect of oleocanthal in breast cancer cell lines MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231.

MATERIALES y MÉTODOS

“El éxito es la capacidad de ir de un fracaso a otro sin perder entusiasmo”,

Winston Churchill.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la consecución de los objetivos anteriormente expuestos, se llevaron a cabo los siguientes procedimientos experimentales:

1.- MATERIALES

Para realizar los diferentes protocolos experimentales los reactivos utilizados han sido clasificados en función de sus características y finalidades de uso:

1.1.- Anticuerpos y soluciones usados en western blotting (WB):

- ✚ Albúmina de suero bovino (BSA) – Sigma (Madrid, España).
- ✚ Anti-FAK [EP6954] - Abcam (Madrid, España).
- ✚ Anti-IgG de conejo conjugada con peroxidasa de rábano - GE Healthcare (Madrid, España).
- ✚ Anti-IgG de ratón conjugada con peroxidasa de rábano - GE Healthcare (Madrid, España).
- ✚ Anti-Orai1 de conejo, policlonal - Sigma (Madrid, España).
- ✚ Anti-Orai2 de conejo, policlonal – Acris (Herford, Alemania).
- ✚ Anti-Orai3 de ratón, monoclonal – Sigma (Madrid, España).
- ✚ Anti-p-FAK Y397 - Abcam (Madrid, España).
- ✚ Anti-STIM1 de ratón, monoclonal – BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, EEUU).
- ✚ Anti-STIM2 de conejo, policlonal – Cell Signaling (Danvers, MA, EEUU).
- ✚ Anti-TRPC1 de conejo, policlonal - Alomone (Jerusalem, Israel).
- ✚ Anti-TRPC3 policlonal – Abcam (Madrid, España).
- ✚ Anti-TRPC6 de conejo, policlonal - Alomone (Jerusalem, Israel).
- ✚ Anti- β -Actina de conejo, policlonal – Sigma (Madrid, España).
- ✚ Inhibidores de proteasa libres de EDTA – Roche (Madrid, España).
- ✚ Nonidet P-40 – Sigma (Madrid, España).
- ✚ Proteína agarosa A – Upstate Biotechnology Inc. (Madrid, España).
- ✚ Sustrato quimioluminiscente de detección de alta sensibilidad - Thermo Fisher (Madrid, España).
- ✚ Tris-Buffered Saline Tween (TBST).
- ✚ Tween-20 - Sigma (Madrid, España).

1.2.- Soluciones usadas en cultivos celulares:

- ✚ Bromodeoxiuridina (BrdU) – BioVision (Milpitas, CA, EEUU).
- ✚ Dimetil sulfóxido (DMSO) – Sigma (Madrid, España).
- ✚ Dulbecco's Modified Eagle's Medium Ham's F-12 (DMEM F-12) - Lonza (Cologne A.G., Alemania).
- ✚ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - Lonza (Cologne A.G., Alemania).
- ✚ Fosfato Buffer Salino (PBS).
- ✚ Penicilina/Streptomycin – Lonza (Cologne A.G., Alemania).
- ✚ Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640 – Lonza (Cologne A.G., Alemania).
- ✚ Suero de Caballo (HS) - Thermo Fisher (Madrid, España).
- ✚ Suero Fetal Bovino (FBS) – Lonza (Cologne A.G., Alemania).
- ✚ Tripsina 5% EDTA 10x – Thermo Fisher (Madrid, España).

1.3.- Estándar y cuantificación de proteínas:

- ✚ 1,4-ditiotreitol (DTT) - Thermo Fisher (Madrid, España).
- ✚ Ácido bicinconínico (BCA) - Thermo Fisher (Madrid, España).
- ✚ Marcador de masa molecular – Bio Rad Laboratories, Inc. (España).
- ✚ Tampón de Laemmli (LB)

1.4.- Fluorimétricos:

- ✚ Fluoróforo Fura-2 acetoximetil éster (Fura-2/AM) – Molecular Probes (Leiden, Holanda).
- ✚ Calceína acetoximetil éster (calceína-AM) – Live/Dead® viability/cytotoxicity kit for mammalian cells (Molecular Probes).
- ✚ Yoduro de propidio - Live/Dead® viability/cytotoxicity kit for mammalian cells (Molecular Probes).

1.5.- Movilizadores de Ca²⁺:

- ✚ Tapsigargina (TG) – Sigma (Madrid, España).

1.6.- Plásmidos:

- ✚ Plásmido control shRNA-A – Santa Cruz Biotechnology Inc., (Dallas, Texas, EEUU).
- ✚ Plásmido control siRNA-A - Santa Cruz Biotechnology Inc., (Dallas, Texas, EEUU).
- ✚ Plásmido de silenciamiento shOrai1.
- ✚ Plásmido de silenciamiento siOrai2 – Life Technologies (Madrid, España).
- ✚ Plásmido dnTRPC6.

1.7.- Quelante de Ca²⁺:

- ✚ Ácido tetracético etilenglicol (EGTA) – Sigma (Madrid, España).

1.8.- Quimiotáctico:

- ✚ Péptido N-Formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) – Sigma (Madrid, España).

1.9.- Reactivo de transfección:

- ✚ Turbofect – Thermo Fisher (Madrid, España).

2.0.- Reactivos qPCR:

- ✚ SYBR green Premix Ex Taq™ - (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan).

2.1.- Reactivo de biotilación:

- ✚ EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin (sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido) hexanoato – Thermo Scientific (USA).
- ✚ Beads de estreptavidina - Pierce® Streptavidin Agarose Resins, Thermo Fisher (Madrid, España).
- ❖ HBS (Tampón Hepes Salino).

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN (mM)	(g/L)
BSA (albúmina de suero bovino)	1 mg/mL	1,0
D-Glucosa	20	1,8
HEPES	10	2,38
KCl	5	0,38
MgSO ₄	1	0,26
NaCl	145	8,46

Tabla 3. Tampón HBS (pH=7,4).

- ❖ PBS (Tampón Fosfato Salino).

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN (mM)	(g/L)
KCl	2,7	0,2013
KH ₂ PO ₄	2	0,2722
Na ₂ HPO ₄	10	1,7299
NaCl	137	8,0063

Tabla 4. Tampón PBS (pH=7,4).

- ❖ Tampón de lisis NP-40.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN (mM)	(g/L)
EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)	4	1,16
Glicerol	20 %	20 mL
NaCl	274	16,02
Nonidet P-40	1 %	200 mL
Tris-HCl	40	6,3

Tabla 5. Tampón de lisis NP-40 (2x) (pH=7,4).

- ❖ Tampón de Laemmli.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN (mM)
Azul de bromofenol	0,01 %
Glicerol	25 %
SDS (dodecil sulfato sódico)	2 %
Tris-HCl	62,5

Tabla 6. Tampón de Laemmli (pH=7,4).

- ❖ TBS 10x (Tampón Tris Salino).

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN (mM)
NaCl	1,37 x 10 ³
Trizma-base	200

Tabla 7. Tampón Tris-salino (pH=7,6).

- ❖ TBST 1x (Tampón Tris Salino y Tween).
900 mL de H₂O destilada + 100 mL de TBS 10x y añadir 0,1 % de Tween 20 (1mL).
Almacenar a 4 °C.

- ❖ Geles de acrilamida/bisacrilamida.

REACTIVOS	10 mL (8 %)	10 mL (10 %)	10 mL (4 %)
Acrilamida/bisacrilamida (39:1) (mL)	2,7	3,04	1,32
AMPS (mg) (amonio persulfato)	5	5	10
H ₂ O miliQ (mL)	4,7	4	6,07
SDS (10 %) (mL) (dodecil sulfato sódico)	0,1	0,1	0,1
TEMED (μL) (N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina)	10	10	10
Tris 0,5 M (pH = 6,8) (mL)			2,5
Tris 1,5 M (pH = 8,8) (mL)	2,5	2,5	

Tabla 8. Soluciones de preparación de geles de poliacrilamida.

- ❖ Tampón de electroforesis.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN (mM)	(g/L)
Glicina	1,26 x10 ³	77
SDS (dodecil sulfato sódico)	0,5 %	5
Trizma base	124	15

Tabla 9. Tampón de electroforesis.

- ❖ Tampón de transferencia.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN (mM)	(g/L)
Glicina	150	8,5
Metanol	20 %	200 mL
Trizma base	25	3,03

Tabla 10. Tampón de transferencia (pH = 8,3).

❖ Solución de bloqueo.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN (mM)	(g/L)
Azida sódica	0,02 %	0,2
BSA (albúmina de suero bovino)	10 %	100
TBST		1 L

Tabla 11. Solución de bloqueo.

❖ Tampón de lavado.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN (mM)	(g/L)
NaCl	137	8
Trizma base	20	2,42
Tween 20	0,1 %	1 mL

Tabla 12. Tampón de lavado (pH = 7,6).

❖ Componentes del kit de proliferación.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN STOCK	CONCENTRACIÓN FINAL
BrdU (5-bromo-2-deoxiuridina)	1000 x	10 x
Solución de Fijación/Desnaturalización	-	100 uL/pocillo
Anticuerpo primario de detección de BrdU	300 x	1 x
Anticuerpo secundario de detección de anticuerpo primario	2000 x	1 x
Solución diluyente del anticuerpo	-	-
Tampón de lavado	10 x	1 x
Sustrato TMB (tetrametilbencidina)	-	100 uL/pocillo
Solución de parada de reacción	-	100 uL/pocillo

Tabla 13. Reactivos kit de proliferación BrdU.

El resto de reactivos utilizados son de grado analítico y han sido suministrados por Panreac, Sanex y Albus (España).

2.- MÉTODOS

2.1.- CULTIVO CELULAR

2.1.1.- Tipos celulares

◆ HL60

La línea celular promieloblástica HL60 fue obtenida de la compañía American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, EEUU) (Figura 38) y cultivadas en suspensión en un incubador bajo condiciones de 37 °C de temperatura, 95% de aire y un 5% de CO₂, en medio de cultivo RPMI-1640, suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor y 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin.

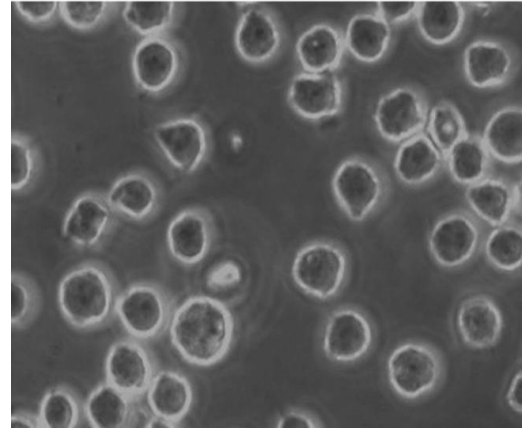


Figura 38. Imagen obtenida de ATCC. Células HL60 observadas al microscopio óptico.

◆ MCF10A

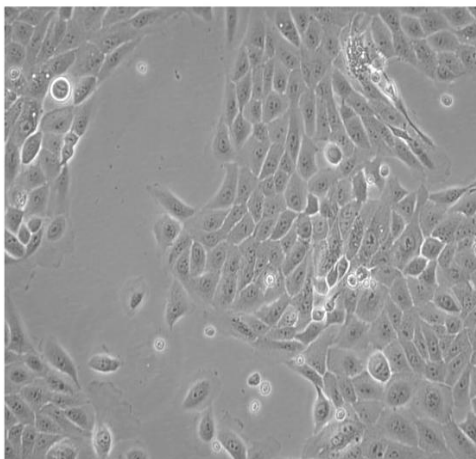


Figura 39. Imagen obtenida de ATCC. Células MCF10A observadas al microscopio óptico.

La línea celular epitelial no tumorigénica MCF10A fue obtenida de la compañía ATCC (Manassas, VA, EEUU) (Figura 39) y cultivadas en adherencia en un incubador a 37 °C, 95% de aire y un 5% de CO₂ en medio de cultivo DMEM F-12, suplementado con suero de caballo 25% del volumen (v/v), insulina (10 µg/mL), factor de crecimiento epidérmico (hEGF) (20 ng/mL), hidrocortisona (0,5 µg/mL), toxina colérica (100 ng/mL) y 100 U/mL de los antibióticos penicilina y

presentan un período de duplicación de 32 horas. No presentan TRPC6, el cual es necesario para la entrada de Ca²⁺, para invadir otros tejidos, inducir apoptosis y metastatizar.

◆ MCF7

La línea celular MCF7 fue obtenida de la compañía ATCC (Manassas, VA, EEUU) (Figura 40) y cultivadas en adherencia en un incubador a 37 °C, 95% de aire y un 5% de CO₂ en medio de cultivo DMEM, suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino y 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. Presenta morfología de célula epitelial.

Expresan receptor estrogénico y de progesterona, así como incremento en la expresión de HER2.

Los receptores de estrógenos α y β están asociados a Orai3.

Es el tipo de cáncer más benigno, de mejor pronóstico y más común. El tiempo de duplicación de estas células es de unas 20 horas. Sí presentan TRPC6 y la ECC está mediada por STIM1, 2 y Orai3.

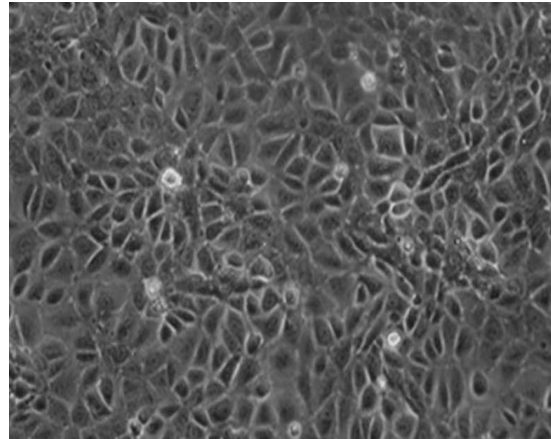


Figura 40. Imagen obtenida de ATCC. Células MCF7 observadas al microscopio óptico.

◆ MDA-MB-231

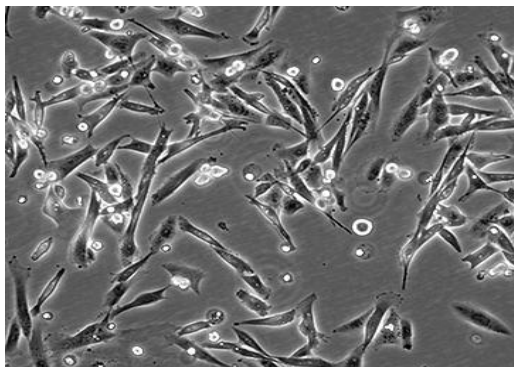


Figura 41. Imagen obtenida de ATCC. Células MDA-MB-231 observadas al microscopio óptico.

La línea celular MDA-MB-231 triple negativa fue obtenida de la compañía ATCC (Manassas, VA, EEUU) (Figura 41) y cultivadas en adherencia en un incubador a 37 °C, 95% de aire y un 5% de CO₂ en medio de cultivo DMEM, suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino y 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. Presentan una morfología de célula epitelial.

Es el tipo de cáncer de mama más invasivo, maligno y con mayor capacidad de metastatizar. Se le conoce como triple negativo por ser ER⁻, PR⁻ y HER2⁻, debido a esto, este tipo de cáncer solamente puede ser tratado por métodos quimioterápicos, no hormonales. Sí presentan TRPC6 y la ECC está mediada por STIM1 y Orai1.

CAPACIDAD METASTÁSICA DE LAS LÍNEAS CELULARES MCF10A, MCF7 Y MDA-MB-231

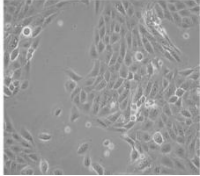
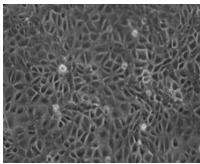
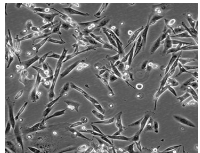
Línea celular	Fenotipo	Motilidad	Adherencia	Otras características	Estado de representatividad durante la TEM
MCF10A		Poca	Alta	No tumorigénica Crecimiento rápido Línea celular epitelial Luminal ductal	Epitelial
MCF7		Moderada	Moderada	Moderadamente invasiva Crecimiento lento en monocapa	Epitelial
MDA-MB-231		Alta	Baja	Crecimiento rápido Altamente invasiva Altamente agresiva	Mesenquimal

Tabla 14. Resumen de las características principales de la línea celular no tumoral (MCF10A) y tumorales (MCF7, MDA-MB-231) de mama.

2.2.- TRANSFECCIÓN CELULAR

La transfección, es una técnica empleada en biología molecular por la cual se introduce material genético externo en las células eucariotas mediante plásmidos, vectores víricos u otra herramienta para la transferencia. En los estudios que se han llevado a cabo, dicha transferencia tiene lugar mediante la mezcla del material genético con un polímero catiónico formado por complejos estables y compactos, cargados positivamente, que protegen al ADN plasmídico de la degradación y facilitan su liberación en el interior de la célula. Para ello, se utilizó reactivo de transfección Turbofect Transfection Reagent®, que muestra una alta eficiencia de transfección y una toxicidad celular muy baja.

Las células HL60 fueron transfectadas con 1µg/mL de plásmidos de silenciamiento shRNA-Orai1, siRNA-Orai2, siRNA-A y shRNA-A (como control). Para ello, se mezclaron 1mL de medio RPMI-1640 sin reconstituir, el plásmido y 6 µL de reactivo de transfección Turbofect® durante 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se añadió al medio con células en las placas de siembra, moviendo suavemente en círculos y manteniéndolo en el

incubador a 37 °C y 5% CO₂ durante 3 horas, tras este tiempo se cambió el medio y las células fueron utilizadas 48 horas después de la transfección.

La secuencia sentido del shRNA para el Orai1 humano fue:

5' – CACCTCACTGGTTTAGCCATAAGACGAATCTTATGGCTAACCAGTGA - 3'

Y la secuencia antisentido fue:

5' – AAAACCTTTACACGCTAGATGGTTTGCTCTTATGGCTAACCAGTGA – 3'

La secuencia sentido del shRNA para el Orai2 humano fue:

5' – GGACUGGAUGACUUCUCCU – 3'

Y la secuencia antisentido fue:

5' – AGGAGAAGUCACCAGUCC – 3'

Las células de la línea de cáncer de mama (MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231) fueron transfectadas con 1µg/mL de plásmidos de silenciamiento shRNA-TRPC6 y siRNA-A (como control). Para ello, se mezclaron 1mL de medio DMEM F-12 (MCF10A) o DMEM (MCF7 y MDA-MB-231) sin reconstituir, el plásmido y 6 µL de reactivo de transfección Turbofect® durante 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se añadió al medio con células en las placas de siembra, moviendo suavemente en círculos y manteniéndolo en el incubador a 37 °C y 5% CO₂ durante 5 horas, tras este tiempo se cambió el medio y las células fueron utilizadas 48 horas después de la transfección.

La secuencia sentido del shRNA para el TRPC6 humano fue:

5' – CGAGAGCCAGGACTATCTGC – 3'

Y la secuencia antisentido fue:

5' – AGGGGTAGTAGCCGTAGCAA – 3'

2.3.- PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

El aislamiento total de ARN y la síntesis de una única hebra de ADN complementario (ADNc) fueron desarrollados en las células HL60 de leucemia promieloblástica. La SYBR green qRT-PCR se desarrolló usando SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan) en un termociclador *Applied Biosystems STEPONE Real-Time thermal cycler* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). Los productos de la PCR se obtuvieron usando el programa de PCR que se indica en la siguiente tabla (Tabla 15):

TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
96 °C	2 minutos	
96 °C	15 segundos	35 ciclos
48 °C	25 segundos	
56 °C	25 segundos	
72 °C	10 minutos	

Tabla 15. Condiciones del termociclador para la PCR.

La cantidad de ARN_m fue calculada por el método comparativo C_T ($\Delta\Delta C_T$) usando la fórmula $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$. La cantidad de ARN_m transcrito fue normalizada con la expresión de β -actina y representada como la expresión media relativa de Orai2 \pm ESM.

Los cebadores humanos utilizados en qRT-PCR fueron los que se especifican a continuación (Tabla 16):

PROTEÍNA	PRIMER SENTIDO	PRIMER ANTISENTIDO
hOrai1	AGCAACGTGCACAATCTCAA	GTCCTTATGGCTAACCAGTGA
hOrai2	CGGCCATAAGGGCATGGATT	TTGTGGATGTTGCTCACGGC
hOrai3	CTCTTCCTTGCTGAAGTTGT	CGATTCAGTTCCTCTAGTTC
hSTIM1	CAGTGAAACACAGCACCTTCC	AAGAGCACTGTATCCAGAGCC
hSTIM2	CCAGGGCTTTCACTGTGATT	CCTCGGCTTAAGGTTGTGAA
hTRPC1	TGCGTAGATGTGCTTGGGAG	ATGCTCTCAGAATTGGATCC
hTRPC3	GGAAGGACTGTAAAGGACA	CACAACGGAAGTCACTTCA
hTRPC6	TCATCATGGTGTGTTGTGGC	GCAAAACAATGACCATTGTAA
β -Actina	AGCGAGCATCCCCAAAGTT	GGGCACGAAGGCTCATCATT

Tabla 16. Cebadores o "primers" sentido y antisentido de humanos empleados en la técnica

qRT-PCR.

2.4.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO ($[Ca^{2+}]_c$) MEDIANTE MÉTODOS FLUORIMÉTRICOS CARGANDO CON EL INDICADOR FURA-2

2.4.1.- Fura-2/AM

La sonda fura-2 acetoximetiléster (fura-2/AM) es un fluoróforo de Ca^{2+} permeable a la membrana plasmática por presentar en su estructura un grupo acetoximetiléster (AM) que, una vez se introduce en el interior de la célula, sufre la acción de esterasas citosólicas que liberan el grupo éster (AM) del fura-2, impidiendo que atraviese de nuevo la membrana plasmática, así como las membranas de los orgánulos intracelulares. Este fluoróforo presenta una constante de disociación (K_d) para el calcio de 120-250 nM, en función de la temperatura y pH, lo que permite detectar pequeñas variaciones de Ca^{2+} muy pequeñas de hasta el rango de nanomolar (Grynkiewicz, G. y cols. 1985).

El fluoróforo fura-2 presenta dos longitudes de onda de excitación, una es a 340 nm y otra a 380 nm y una longitud de onda de emisión a 505 nm, de tal manera que cuando el ion Ca^{2+} se une al fluoróforo, se produce un incremento de la fluorescencia emitida a 510 nm al excitar a la longitud de onda de 340 nm, mientras que por el contrario, se produce una disminución de la fluorescencia cuando se excita con una longitud de onda de 380 nm. Esta característica permite utilizar esta sonda como ratiométrica, ya que permite observar los máximos y mínimos de emisión a 510 nm y obtener un ratio de estos valores. El ratio o la relación de fluorescencia emitida (340 nm/380 nm) es proporcional a las variaciones en la $[Ca^{2+}]_c$, de forma que se evitan errores derivados de una distribución no homogénea en el citosol celular, carga deficiente del marcador u otros posibles artefactos originados durante la manipulación experimental (Paredes, R.M. y cols. 2008).

Otra ventaja de este fluoróforo es que su punto isobético (punto de isofluorescencia) es a 360 nm, permitiendo monitorizar los cambios en la fluorescencia no dependiente de Ca^{2+} o apreciar la extinción de la fluorescencia cuando la molécula se une a algunos metales pesados como el manganeso (Mn^{2+}) (Sage, S.O. y cols. 1989).

2.4.2.- Carga de células

La carga del indicador en células de leucemia mieloide aguda (HL60) y líneas celulares de cáncer de mama (MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231) se realizó en el propio medio de cultivo incubando las células durante 30 minutos con 2 μ M de fura-2 AM, a 37 °C y en oscuridad para las líneas celulares HL60, MCF7 y MDA-MB-231 y 45 minutos con 2 μ M de fura-2 AM, a 37 °C y en oscuridad para la línea celular MCF10A. Finalizada la incubación, se descartó el medio que

las contenía con fura-2 AM sobrante que no se haya introducido en la célula y se lavaron con HBS 1x. Las células adheridas al cubreobjetos se mantienen en un medio de HBS 1x con glucosa (1,8 mg/mL) y BSA (1 mg/mL) para proceder a la medición de Ca^{2+} .

2.4.3.- Determinación de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ mediante métodos fluorimétricos

Los movimientos de Ca^{2+} que se registraron tanto en células de leucemina como de cáncer de mama, mencionadas anteriormente, fueron detectados en un microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse T12 asociado a un sistema de adquisición y análisis de imágenes para microscopía. Los experimentos se llevaron a cabo manteniendo las células adheridas a un cubreobjetos en presencia de tampón HEPES salino (HBS 1x).

Las células se excitaron de forma alternativa a 340 nm y 380 nm con una lámpara asociada a un monocromador y la fluorescencia emitida se registró a 510 nm con una cámara asociada al microscopio. Los valores obtenidos se registraron y fueron procesados usando un software (Nikon NIS-Elements AR).

Todos los reactivos añadidos (EGTA, DMSO, TG, OLCT, Ca^{2+}) durante la realización del experimento se adicionaron directamente en la cubeta en función del volumen de la suspensión celular (500 μL de HBS 1x), con el fin de obtener la concentración final deseada. Las variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se monitorizaron y se expresaron como ratio de las fluorescencias emitidas a 510 nm por el fura-2 una vez excitado a 340 nm y 380 nm.

La traducción de los ratios de fluorescencia a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y el posterior calibrado, se realizaron mediante el método desarrollado por Grynkiewicz (Grynkiewicz, G. y cols. 1985), aplicando la siguiente fórmula:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \times \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \times \frac{S_f}{S_b}$$

K_d = constante de disociación del fura-2 y el Ca^{2+} (214 nM a 37 °C).

R = ratio de la muestra (340/380nm).

R_{\min} = ratio mínimo cuando la concentración de Ca^{2+} es cero.

R_{\max} = ratio máximo en condiciones de saturación por Ca^{2+} .

S_f = S free (emisión del fura-2 al ser excitado a 380 nm).

S_b = S bound (emisión del fura-2 unido a Ca^{2+} al ser excitado a 380 nm).

2.4.4.- Determinación de la liberación y entrada de Ca^{2+}

La liberación de Ca^{2+} inducida por TG ($1\mu\text{M}$) se estimó calculando el área bajo la curva del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ durante los 2,5 minutos posteriores a la adición del compuesto, en un medio libre de Ca^{2+} , corregidas con la resta de la concentración basal de Ca^{2+} previa a la adición del estímulo en ausencia de Ca^{2+} extracelular, utilizando para ello el quelante de Ca^{2+} EGTA ($100\mu\text{M}$). Por otro lado, la entrada de Ca^{2+} que se induce tras la adición de CaCl_2 (2mM) a la suspensión celular, se determinó calculando el área bajo la curva del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ durante los 2,5 minutos posteriores a la adición de CaCl_2 , siendo corregida con la resta de la concentración de Ca^{2+} después del estímulo.

2.5.- TÉCNICAS DE AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

En los ensayos llevados a cabo con proteínas es imprescindible una adecuada preparación de la muestra. El método de extracción proteica dependerá del tipo de muestra de partida, de la localización subcelular de la proteína y de las condiciones que requiera el anticuerpo para reconocer el epítipo proteico. En los estudios realizados, la extracción proteica se ha realizado mediante el uso de soluciones tampón que contienen detergentes. La estructura química de estos detergentes permite romper las membranas celulares y solubilizar las proteínas, aunque también se emplean métodos mecánicos como la sonicación.

2.5.1.- Cuantificación de la concentración de proteínas

El contenido en proteína total se determinó empleando la técnica del ácido bicinconínico (BCA) o ensayo basado en cobre (Figura 42). Este ensayo fue inventado por Paul K. Smith en 1985 (Smith, P.K. y cols. 1985) en la compañía Pierce Chemical Company y está basado en la conversión del Cu^{2+} a Cu^{1+} en condiciones alcalinas. Esta conversión que es definida como reacción de Biuret, está influenciada por cuatro aminoácidos (cisteína, cistina, tirosina y triptófano) y también por la cadena peptídica.

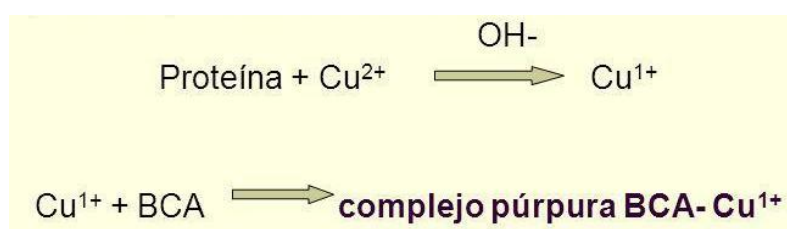


Figura 42. Reacción del BCA.

BCA es un reactivo cromogénico específico para el ion Cu^{1+} . En un primer paso, los aminoácidos de la proteína reaccionan con el Cu^{2+} , reduciéndose a Cu^{1+} (reacción de Biuret), el cual, en una segunda etapa, forma un complejo con dos moléculas de BCA color púrpura. La cantidad de Cu^{2+} reducido es una función de la concentración de proteínas y puede ser determinada espectrofotométricamente por un cambio de color de la solución a púrpura, el cual absorbe a 562 nm. Dicha absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución y puede ser estimada por comparación con un estándar de proteína conocido, tal como la albúmina sérica bovina.

En los pocillos de una placa de 96 pocillos se mezcló un volumen de 25 μL de la muestra y 200 μL de la mezcla BCA (1 parte de solución A y 50 partes de solución B). Una vez agitadas las muestras para conseguir una mezcla homogénea, se incubó en oscuridad, a 37 °C y durante 15 minutos, transcurridos los cuales se realizó la lectura de la absorbancia de la muestra en un lector de microplacas Gen5™ BioTek (Winooski, Vermont, USA). Los datos de absorbancia obtenidos, se extrapolaron a una recta patrón trazada a partir de una curva estándar realizada con concentraciones conocidas de BSA en H_2O miliQ. Los resultados fueron expresados en mg/mL.

2.5.2.- Western Blotting

El western blotting (WB) (Figura 43) es una técnica analítica que se utiliza para la detección de proteínas específicas en una muestra determinada. Este método, descrito por vez primera por Towbin y colaboradores en 1979 (Towbin, H. y cols. 1979), permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica. La especificidad de la técnica se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés. Fue desarrollada utilizando la base tecnológica del Southern blot para la detección del ADN.

El principio del WB se fundamenta en el hecho de que una proteína sometida a un campo eléctrico se moverá en función de la carga eléctrica neta de la misma (Z), la fuerza del campo eléctrico al que se ve sometida (E) y la resistencia de fricción (F), que depende del tamaño y forma de la proteína. En base a esto, la velocidad de migración de las proteínas está relacionada con estas variables según la siguiente fórmula:

$$V = \frac{(E \times Z)}{F}$$

El punto isoeléctrico de una proteína es aquel en el que la carga neta de la misma es cero. Si esto sucede, el campo eléctrico aplicado no la afectaría y por tanto, la proteína no se mueve. Por esto, es importante tener en cuenta el pH del tampón donde se encuentran las proteínas. Con el fin de evitar tal efecto, se utilizó el método descrito por Laemmli (Laemmli, U.K. 1970), en el que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturalizantes y reductores, tales como el β -mercaptoetanol o el ditioneitol (DTT), que destruyen los puentes disulfuro o el dodecilsulfato sódico (SDS), que se encarga de desnaturalizar las proteínas, haciéndolas perder su conformación terciaria, adquiriendo así una estructura primaria, lineal y recubriendo a la proteína de cargas negativas, permitiendo que las proteínas se muevan sólo en función de su tamaño, esto es, que la tasa de migración viene determinada por su masa molecular. El Laemmli buffer (LB), además de su carácter reductor, asegura de forma óptima la resolución de las bandas cuando las proteínas se preparan en geles SDS-PAGE.

No obstante, para asegurar la completa desnaturalización de las proteínas, la muestra se calentó en un termobloque durante 5 minutos a 95 °C. Finalmente, se sometieron las muestras a un breve spin para precipitar la muestra y proceder a la carga de las muestras en el gel para su posterior análisis.

2.5.2.1.- Electroforesis

Una vez obtenidas las muestras, se sometieron a electroforesis en geles de poli(acrilamida) conteniendo SDS (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalizantes. Bajo estas condiciones, así como las de reducción, las proteínas cargadas negativamente al ser sometidas a un campo eléctrico, migran hacia el electrodo positivo, haciéndolo de forma más rápida aquellas de menor masa molecular.

Los geles se elaboraron en el laboratorio utilizando diferentes concentraciones de acrilamida (8-10%) (Tabla 8, apartado de Materiales) en función de la masa molecular de la proteína objeto de estudio. En base a ese porcentaje utilizado, se obtendrá un tamaño de poro u otro obteniéndose poros más pequeños cuanto mayor sea el porcentaje del polímero de acrilamida. En todos los casos, se emplearon dos tipos de geles que pertenecen al sistema de tampón discontinuo.

- Gel de carga, concentrador o *stacking* (poros grandes): asegura la migración de todas las proteínas en el frente de migración puesto que favorece el empaquetamiento de todas las proteínas que han sido cargadas en el pocillo. Su

concentración de acrilamida y bisacrilamida es pequeña (4%) y su pH es ligeramente más ácido (pH= 6,8) que el del gel separador (pH= 8,8).

- Gel separador o *running* (poros pequeños): este gel constituye el soporte donde las proteínas van a migrar y a separarse. Está formado por una mezcla de acrilamida y bisacrilamida cuya concentración determinará el tamaño del poro, de tal manera que a mayor concentración de polímero, se obtendrá un tamaño de poro más pequeño, favoreciendo una mayor separación de las proteínas con baja masa molecular. Por el contrario, los geles preparados con una menor concentración de polímero producirán poros de mayor tamaño, que al favorecer el paso de proteínas de mayor tamaño y mayor masa molecular, permitirán una separación más amplia de las mismas. En este trabajo se utilizaron diferentes tipos de geles, cuyos porcentajes variaron entre el 8% y 10%. (Tabla 8, apartado de Materiales).

Una vez cargadas las muestras de proteínas en los pocillos del gel correspondiente, fueron sometidas a electroforesis mediante la aplicación de un campo eléctrico de 25-30 mA por gel, durante 2, horas para su separación. Para realizar este proceso, el gel debe estar embebido en un tampón de electroforesis que permite el paso de la corriente eléctrica de forma homogénea por todo el gel. (La composición de dicho tampón puede verse en la tabla 9 del apartado de Materiales).

2.5.2.2.- Electrotransferencia

Para que las proteínas sean accesibles a la detección por el anticuerpo, éstas fueron transferidas desde el gel a una membrana adsorbente de nitrocelulosa. Ésta supone un soporte sólido más estable que una proteína y las inmoviliza, permitiendo así que la hibridación de un anticuerpo las detecte. Para ello, se utilizó un sistema de transferencia semiseca basado en el empleo de tampón con metanol (20%) y la aplicación de un campo eléctrico ($0,8 \text{ mA/cm}^2$) con el fin de favorecer la movilidad de las proteínas hacia la membrana de nitrocelulosa, la cual tiene un tamaño de poro de $0,2 \mu\text{m}$ (GE Healthcare). El paso de la corriente se produjo a través del tampón de transferencia (ver composición en tabla 10 de materiales) durante 2 horas.

2.5.2.3.- Bloqueo

Una vez realizada la transferencia, es necesario neutralizar los sitios de unión inespecíficos que han quedado libres en la membrana. En el estudio de esta tesis, dicho procedimiento se realizó mediante la incubación de la membrana con una solución saturada con BSA (10%) y TBST 1x, durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación moderada y constante. (Ver tabla 11 de Materiales).

2.5.2.4.- Incubación con anticuerpos

Después del bloqueo de la membrana de nitrocelulosa, ésta se incubó con el anticuerpo primario específico correspondiente, que en general están diseñados para reconocer una secuencia de aminoácidos pequeña o epítipo de la proteína, la cual queda accesible tras la electroforesis desnaturizante y reductora. En todos los casos, los anticuerpos fueron diluidos en tampón de bloqueo a la concentración óptima para cada uno de ellos. Los tiempos de incubación variaron en función de la especificidad del anticuerpo utilizado, oscilando desde 1 ó 2 horas a temperatura ambiente, en agitación suave y constante, hasta toda la noche a 4 °C sin agitación.

Finalizada la incubación con el anticuerpo primario éste fue retirado para lavar las membranas con el fin de eliminar los restos de anticuerpo no unido. Para el lavado de las membranas se empleó una solución salina (TBST 1x) de trizma con detergente (ver tabla 10 de Materiales), seis veces durante 5 minutos cada vez.

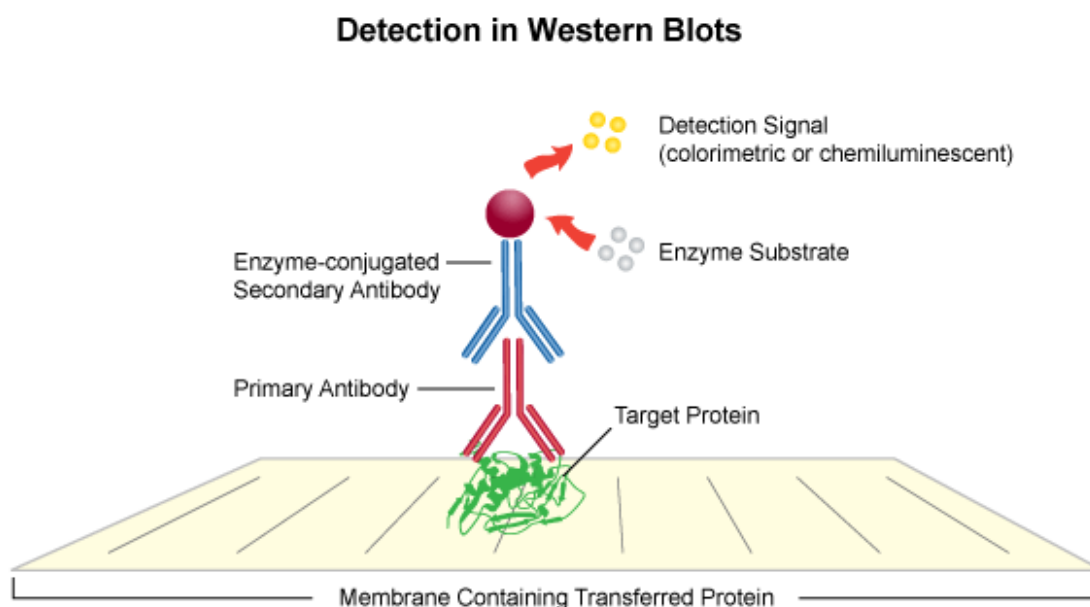


Figura 43. Diagrama del fundamento de electrotransferencia y detección de anticuerpos de la técnica de WB. Imagen obtenida de <https://microbeonline.com>.

A continuación, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario, normalmente una Inmunoglobulina G (IgG) específica del tipo de animal en el que se ha sintetizado el anticuerpo primario. En otras palabras, si el anticuerpo primario utilizado se ha obtenido en conejo, la IgG que se debe utilizar debe ser específica de conejo, de tal manera que así reconocerá la Fc del anticuerpo primario y se unirá a ella. Las concentraciones de los anticuerpos secundarios usados en nuestros trabajos (conejo y ratón) fueron de 1:10.000 y el período de incubación de los mismos fue de 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave y constante.

Tras la incubación con los anticuerpos secundarios, las membranas fueron lavadas para retirar el exceso de anticuerpo no unido, procediendo como anteriormente se ha descrito.

2.5.2.5.- Revelado

La etapa final del WB implica el revelado de las membranas. Este procedimiento se fundamenta en la detección de la quimioluminiscencia producida por el anticuerpo secundario, el cual está conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Dicho mecanismo de acción tiene lugar al hacer reaccionar la enzima con el sustrato correspondiente, produciendo luz. En este trabajo, la luz fue detectada por exposición de la membrana a una película de rayos X y en otras ocasiones, mediante el uso de un escáner digital de quimioluminiscencia Li-Cor® C-DiGit™. Una vez obtenidas las imágenes, se analizaron con el software informático Image J (NIH, Bethesda, EEUU), un programa que permite medir la intensidad de las bandas mediante densitometría.

2.5.3.- Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación (IP) es una técnica que permite aislar una proteína de interés de un lisado celular. Para ello, se utiliza un anticuerpo que se une de forma específica a la proteína diana.

Las células fueron resuspendidas en tampón HBS 1x y se repartieron en viales Eppendorf con un volumen de 500 μ L y una concentración de 5×10^6 células/mL en el caso de las células MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231 y 10×10^6 células/mL en el caso de las células de leucemia mieloide aguda HL60. Seguidamente, las células fueron tratadas con TG a 37 °C y una vez finalizada la estimulación, fueron lisadas con un tampón de lisis NP-40 (tabla 5 de Materiales) a una concentración 2x. Además, dicha solución fue suplementada con inhibidores de proteasas libres de EDTA (cocktail comercial de Roche, Madrid, Spain) y ortovanadato

sódico (Na_3VO_4) (2mM). A continuación, se mantuvieron en hielo durante 30 minutos para evitar la proteólisis, desfosforilación y desnaturalización de las proteínas (procesos que se inician después del lisado y que pueden ser reducidos mateniendo las muestras a 4 °C. Una vez acabada la incubación en hielo, las muestras fueron centrifugadas a 4 °C y 16.100 xg, durante 15 minutos, con el fin de eliminar restos celulares que quedaran sedimentados. El sobrenadante obtenido tras dicha centrifugación se incubó con 2 μg de anticuerpo específico frente a la proteína diana y unas bolas de agarosa recubiertas con proteína A (proteína de la superficie de *Staphylococcus aureus* con gran afinidad por el fragmento cristalizante, fracción constante (Fc) o cadena pesada de la inmunoglobulina, Ig). Esta incubación se realizó durante toda la noche, en agitación constante, a 4 °C. Finalizada la incubación, las bolas de agarosa fueron sedimentadas por centrifugación durante 1 minuto a 4 °C y 10.000 xg. Tras varios lavados con tampón fosfato salino (PBS 1x), los complejos antígeno-anticuerpo se resuspendieron en Laemmli Buffer (LB), enriquecido con ditioneitol (DTT) al 5% y β -mercaptoetanol al 5% para su análisis posterior por Western Blotting (WB). Además, el LB, debido a su carácter reductor, también facilita la separación de los anticuerpos de las bolas de agarosa después de realizar una IP. Para asegurar la completa desnaturalización de las proteínas, las muestras fueron calentadas en un termobloque durante 5 minutos a 95 °C. Finalmente, se centrifugaron a 10.000 xg durante 1 minuto a 4 °C y se cargaron en el gel para su posterior análisis.

2.5.4.- Biotinilación

La biotina sulfo-NHS-LC Thermo Scientific es uno de los tres reactivos EZ-Link de biotinilación muy similares que son solubles en agua y no divisibles, permitiendo el aislamiento de anticuerpos, proteínas y cualquier otra macromolécula que contenga aminas primarias en solución. Por tanto, la biotina reacciona con aminas primarias ($-\text{NH}_2$) como cadenas laterales de lisina o el extremo amino de los polipéptidos. Debido a la carga negativa del reactivo, no permea las membranas celulares, por lo que únicamente biotinila proteínas de la superficie de la célula presentes en la membrana (Figura 44).

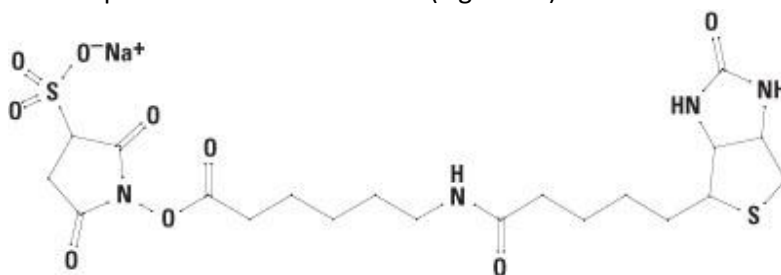


Figura 44. Estructura molecular del reactivo biotina. Imagen obtenida de Thermo Scientific.

El grupo sulfo-NHS cargado, aumenta la solubilidad en agua del reactivo (en comparación con los compuestos de éster de N-hidroxisuccinimida (NHS)). El enlace que se forma entre las proteínas y la biotina es de tipo irreversible, gracias a la formación de enlaces permanentes de tipo amida, es por tanto, una unión muy fuerte y estable. Esta unión se estabiliza por medio de la unión posterior con moléculas de estreptavidina, las cuales presentan una alta afinidad por las moléculas de biotina, de tal manera que se forma un complejo de biotina-estreptavidina en una relación 4:1, esto es, una molécula de estreptavidina puede albergar hasta cuatro moléculas de biotina (Figura 45).

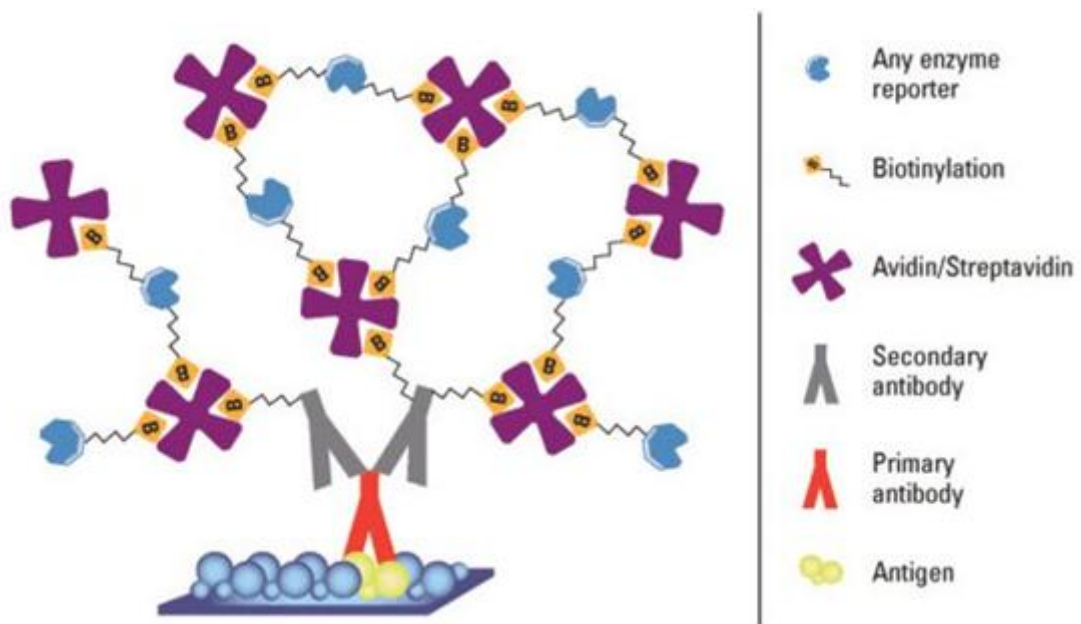


Figura 45. Diagrama del complejo de estreptavidina-biotina. Imagen obtenida de Thermo Scientific.

Los ésteres de N-hidroxisulfosuccinimida (NHS) de biotina son el tipo más popular de reactivo de biotinización y las biotinas activadas por éste reaccionan eficazmente con grupos amino primarios ($-NH_2$) en tampones alcalinos para formar enlaces amida estables. Las proteínas suelen tener varias aminas primarias susceptibles de reaccionar con la biotina, incluyendo la cadena lateral de residuos de lisina (Lys, K) y el extremo N de cada polipéptido.

Las biotinas de NHS no sulfonadas permean las células, pero deben disolverse en disolvente orgánico, como dimetilsulfóxido (DMSO) o dimetilformamida (DMF). Las biotinas de sulfo-NHS son solubles en agua directamente, pero no permean las membranas.

Para llevar a cabo el proceso de biotilización, sometemos las muestras con las células de interés a dos lavados con PBS para posteriormente despegar las células con tripsina 1x (MCF7 y MDA-MB-231) o 10x (MCF10A) durante 10 minutos a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, inactivamos la reacción de la tripsina añadiendo medio de cultivo celular suplementado DMEM (MCF7 y MDA-MB-231) o DMEM F-12 (MCF10A). A continuación, centrifugamos las células a 100 *xg* durante 5 minutos a RT (temperatura ambiente). Retiramos el sobrenadante y resuspendemos el pellet de células en 1mL de HBS 1x suplementado con glucosa, BSA y 100 μM de Ca^{2+} para evitar que se vacíen los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , a fin de llevar el recuento celular (5×10^6 células/mL para cada condición experimental). Mantenemos las muestras durante 30 minutos en el termobloque a 37 °C. Tras ello, añadimos 100 μM de EGTA para quelar las trazas de Ca^{2+} extracelular, para posteriormente, añadir 1 μM de TG, resuspendiendo las células suavemente para que la TG se reparta por igual a toda la muestra estimulando durante 30 segundos y fijar a los tres minutos. Esta fijación la realizamos con paraformaldehído (4%), resultando una concentración final del 2% y dejando agitar en el rotor durante 10 minutos a RT. Centrifugamos las muestras a 100 *xg*, durante 5 minutos a RT y a continuación las lavamos dos veces con PBS 1x pH=8 para eliminar restos de paraformaldehído. Resuspendemos las muestras en 1mL de PBS 1x pH=8 junto con el complejo de biotilización Sulfot-NHS-LC-Biotin a una concentración de 1mg/mL y dejamos las muestras agitándose durante 1 hora en el rotor a 4 °C, para evitar interacciones inespecíficas de la biotina.

Centrifugamos las muestras a 100 *xg*, durante 5 minutos a 4 °C y lavamos dos veces con una solución que lleva PBS 1x pH=8 y Trizma base 100 μM con la finalidad de inactivar la biotina y eliminar restos de ésta. En una etapa posterior, lisamos las células con buffer de lisis Nonidet P40 1x, suplementado con 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de la mezcla de inhibidor de proteasas (para reducir la lisis proteica) y 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de sodio-ortovanadato (Na_3VO_4) (para evitar la desfosforilación de las proteínas). A continuación, sonicamos las muestras para disgregar las membranas celulares y las mantenemos en hielo durante 30 minutos. Tras este tiempo, centrifugamos las muestras a 16.100 *xg* durante 15 minutos a 4 °C para precipitar los restos celulares. En últimas etapas, trasvasamos el sobrenadante a eppendorfs nuevos con 25 μL de beads de estreptavidina que tienen mucha afinidad por las moléculas de biotina, a la que se unirán de forma fuerte y estable, precipitándolas al ser centrifugadas. Mantenemos las muestras en el rotor durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, centrifugamos las muestras a 100 *xg*, durante 5 minutos a 4 °C y lavamos dos veces con PBS 1x. En este momento, calentamos las muestras durante 5 minutos a 95 °C, para proceder a la separación de las

mismas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) al 10%, posterior electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa y proseguir con los pasos siguientes de la técnica de WB.

2.6.- ENSAYOS DE MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR

La técnica de migración e invasión celular (Figura 46) más aceptada es el ensayo de la cámara Boyden. Este sistema utiliza una cámara de plástico hueco, sellada en un extremo con una membrana porosa. Esta cámara está suspendida sobre un pocillo de mayor tamaño que puede contener medio de cultivo y/o quimioatrayentes. Las células se colocan dentro de la cámara, permitiéndolas migrar a través del poro de la membrana, al otro lado de la misma. Las células que consiguen migrar son aquellas que logran teñirse para hacer posteriormente un recuento de las mismas.

En el ensayo de migración celular, se logra una cuantificación sensible de la migración celular *in vitro* hacia un gradiente de concentración química (quimiotaxis). Por otra parte, en el ensayo de invasión, se consigue cuantificar *in vitro* y de forma sensible la capacidad de atravesar otros tejidos o capas celulares a través de la membrana basal.

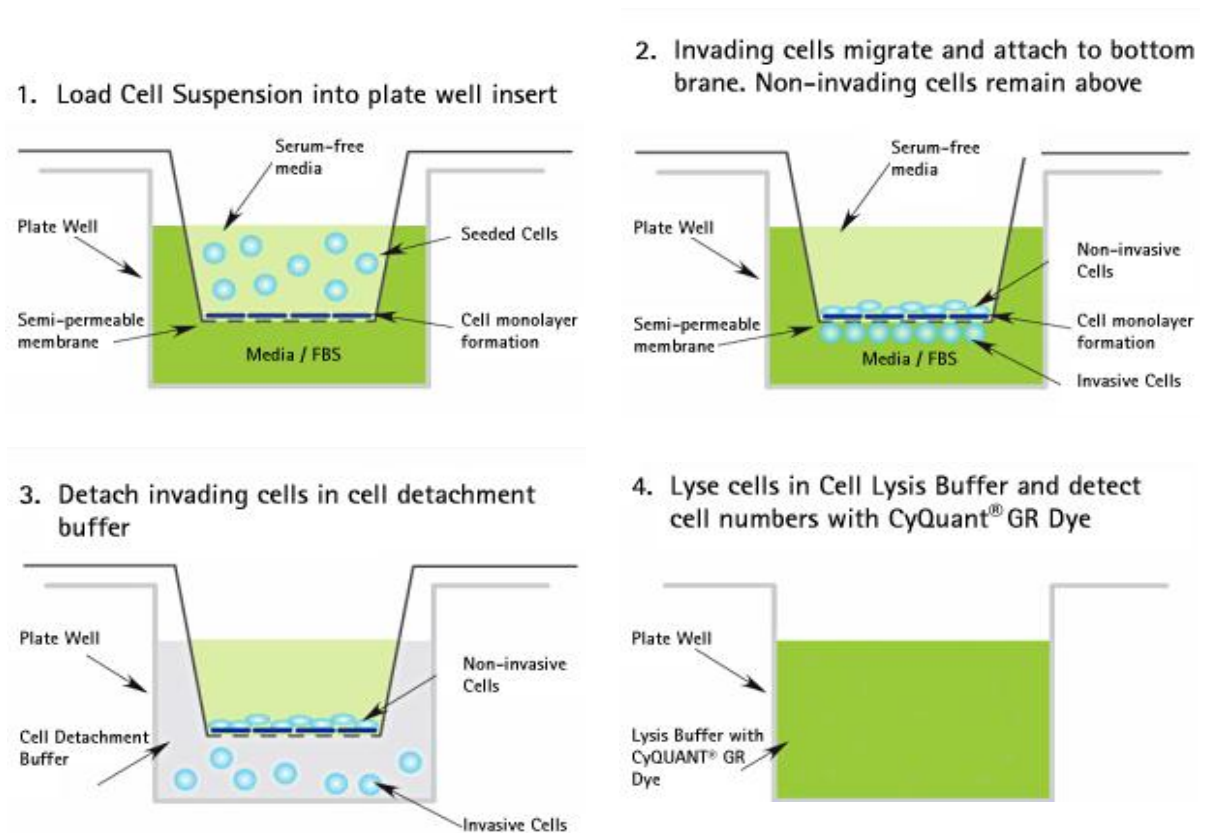


Figura 46. Esquema del ensayo de migración e invasión realizado en células de cultivo. Imagen obtenida de Sigma-Aldrich.

Para el ensayo de invasión, se utilizó una placa de cultivos de 4x6 pocillos, cada pocillo con un tamaño de poro de 8 μm (BD Bioscience, Franklin Lakes, EEUU). En dicha placa, se sembraron 250.000 células en 300 μL de medio de cultivo sin suero (RPMI-1640 y DMEM para las líneas celulares HL60 y MDA-MB-231/MCF7, respectivamente) y antibióticos (penicilina y estreptomycin) en la parte superior de la cámara Boyden. Posteriormente, en la parte inferior de la cámara, se añadieron 750 μL de medio de cultivo con 10% de suero (RPMI-1640 y DMEM para las líneas celulares HL60 y MDA-MB-231, respectivamente). A continuación, se llevó a cabo la incubación a 37 °C, durante un período de tiempo de 12-16 horas.

Transcurrido este tiempo, se retiró el medio de la cámara superior y se lavó con PBS 1x dos veces. Para proceder a la fijación de las células se llenó la cámara Boyden superior con formaldehído (3,7%) en PBS 1x, durante dos minutos a temperatura ambiente (20 °C). Después, se retiró dicho compuesto y se lavó de nuevo dos veces con PBS 1x. Una vez realizado esto, se llevó a cabo la permeabilización de las células utilizando metanol puro (100%), durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras retirar este compuesto se lavó dos veces con PBS 1x y se tiñeron las células con tinción Giemsa, durante 20 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. Una vez finalizado esta etapa, se retiró la tinción y se lavaron las cámaras nuevamente con PBS 1x dos veces. Para poder llevar a cabo el recuento celular bajo el microscopio, se raspó el fondo del pocillo con un hisopo de algodón. Las células presentes en el fondo del pocillo fueron contadas en 5 campos del microscopio y el total de las células que migraron fueron expresadas como el número medio de células por campo de microscopio.

2.7.- DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

El ensayo de proliferación celular se realizó utilizando el kit de proliferación celular con bromodeoxiuridina (BrdU) (BioVision Incorporated, Milpitas, CA, EEUU) (Figura 47). Las líneas celulares HL60, MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231 fueron sembradas en una placa de cultivo de 96 pocillos con una densidad de 5×10^3 células por pocillo para las líneas celulares HL60 MCF7 y MDA-MB-231 y una densidad de 1×10^3 células por pocillo para la línea celular MCF10A. Se dejaron en el incubador a 37 °C y 5% de CO_2 durante 0, 24, 48 y 72 horas. El día del experimento se añadió BrdU al cultivo para permitir la incorporación de BrdU en las células, para ello, las muestras se incubaron durante 4 horas a 37 °C. Transcurrido este período de tiempo, se retiró el medio de los pocillos y se añadió 100 μL de solución fijación/desnaturalización a cada pocillo. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30

minutos. A continuación, se retiró la solución cuidadosamente y se añadió a cada pocillo 100 μL de solución de anticuerpo de detección de BrdU, incubándolo a temperatura ambiente durante 1 hora y en agitación suave y constante. Tras este período de tiempo, se retiró dicha solución y se lavaron los pocillos dos veces con 300 μL de solución de lavado (*wash buffer* 10x y H_2O miliQ a una concentración final de 1x). Después de este paso, se añadió a cada pocillo 100 μL de solución de anticuerpo HRP anti-ratón que detecta el anticuerpo primario, incubando la muestra a temperatura ambiente durante 1 hora en agitación suave y constante. Posteriormente, se retiró dicha solución y se lavaron los pocillos tres veces con 300 μL de solución de lavado.

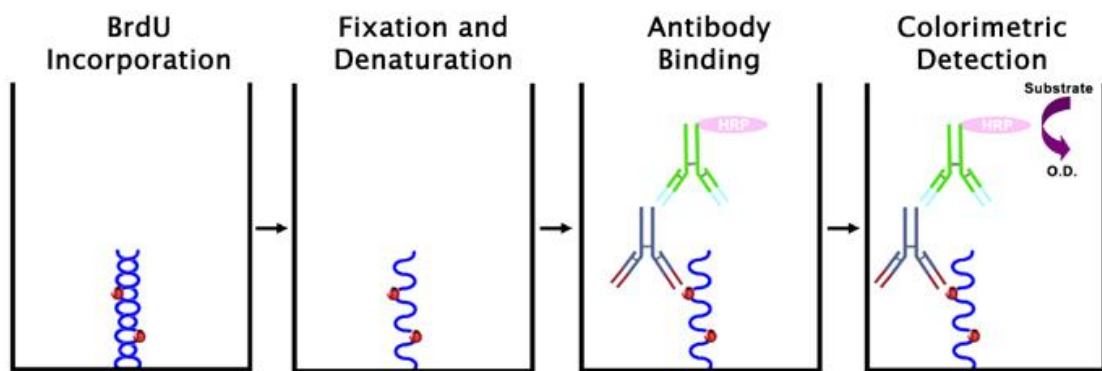


Figura 47. Esquema representativo del ensayo de proliferación con kit BrdU. Imagen obtenida de Cell Biolab.

Para realizar la medida de proliferación celular, se añadió a cada pocillo 100 μL de solución 3,3',5, 5'-tetrametil-bencidina (TMB), que fue el sustrato de membrana de unión al anticuerpo secundario, el cual desarrolla una reacción colorimétrica azul oscuro insoluble y permanente en la presencia de peroxidasa. Las muestras se midieron usando un lector de placas (Microplate Data Collection & Analysis software Gen5™ v20.9 -Epoch, Biotek®, Swindon; UK) y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 650 nm, a temperatura ambiente durante 30 minutos, tomando mediciones cada 5 minutos, para monitorizar el desarrollo de coloración. A continuación, con el fin de parar el desarrollo de dicha coloración, se añadieron 100 μL de solución *stop* o solución de parada en cada pocillo y se midió la absorbancia a 450 nm de longitud de onda en una única medida.

2.8.- VIABILIDAD CELULAR

La calceína-AM es un colorante que penetra en la célula y que puede utilizarse para determinar la viabilidad y/o citotoxicidad celular en la mayoría de las células eucariotas.

La calceína-AM es un compuesto no fluorescente, hidrofóbico, que fácilmente es absorbido por la célula viva. La hidrólisis del acetoximetil éster (AM) por esterasas intracelulares produce calceína, un compuesto hidrofílico y fuertemente fluorescente (fluorescencia verde) que es bien retenido en el citoplasma de la célula, manteniendo la membrana intacta (Figura 48).

El kit Live/Dead® viability/cytotoxicity discrimina rápidamente células vivas de aquellas muertas mediante la tinción simultánea con fluorescencia verde (calceína-AM) para indicar actividad de esterasas intracelulares y fluorescencia roja (yoduro de propidio) para indicar menos integridad de la membrana plasmática celular. Esto es aplicable a las células eucariotas, donde las condiciones de citotoxicidad producen estos efectos en la célula.

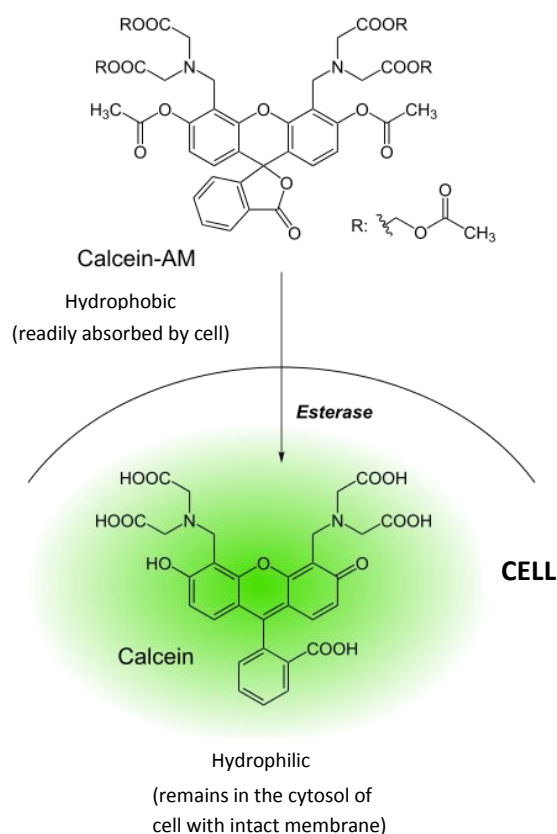


Figura 48. Reacción del marcador calceína (Imagen obtenida de G-Bosciences®, 2019).

Las líneas celulares MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231 se cultivaron a 37 °C con 5% de CO₂ en medios DMEM F-12 (MCF10A) o DMEM (MCF7, MDA-MB-231), suplementado con 20% (v/v) de suero de caballo y 10% (v/v) de suero bovino fetal, respectivamente y 100 U/mL de

penicilina y estreptomicina, e incubadas durante 45 minutos con 2 μM de calceína-AM y 15 minutos con 4 μM de yoduro de propidio. Posteriormente, se lavaron las células con HBS 1x y se resuspendieron en HBS 1x fresco. Los cubre objetos, donde están sembradas y adheridas las células, se montaron en una cámara de perfusión para colocarla en un microscopio de epifluorescencia invertida (Nikon Eclipse Ti-2) con adquisición de imagen y sistema de análisis para videomicroscopía (Nikon NIS-Elements AR). Las muestras se excitaron a una longitud de onda de 430 nm para la calceína y 555 nm para el yoduro de propidio, recogiendo una fluorescencia a una longitud de onda de 542 nm (verde) para las células vivas y 624 nm (rojo) para las células muertas. La intensidad de fluorescencia es proporcional al número de células vivas y muertas, respectivamente.

3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en estos estudios se expresan como media \pm el error estándar de la media (ESM).

Los resultados obtenidos se consideran significativos cuando el nivel de significancia (p) es menor de 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS



"Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo",

Albert Einstein.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante la realización de esta Tesis, con el fin de conseguir los objetivos expuestos anteriormente, han sido publicados en las siguientes revistas internacionales:

Diez-Bello R, Jardin I, Salido GM, Rosado JA. **Orai1 and Orai2 mediate store-operated calcium entry that regulates HL60 cell migration and FAK phosphorylation.** *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017 Jun;1864(6):1064-1070.
Epub 2016 Nov 16. PubMed PMID: 27865925.
doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.11.014.

Jardin I, Diez-Bello R, Lopez JJ, Redondo PC, Salido GM, Smani T, Rosado JA. **TRPC6 Channels Are Required for Proliferation, Migration and Invasion of Breast Cancer Cell Lines by Modulation of Orai1 and Orai3 Surface Exposure.** *Cancers (Basel).* 2018 Sep 14;10(9). pii: E331.
PubMed PMID: 30223530; PubMed Central PMCID: PMC6162527.
doi: 10.3390/cancers10090331.

Diez-Bello R, Jardin I, Lopez JJ, El Haouari M, Ortega-Vidal J, Altarejos J, Salido GM, Salido S, Rosado JA. **(-)-Oleocanthal inhibits proliferation and migration by modulating Ca²⁺ entry through TRPC6 in breast cancer cells.** *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019 Mar;1866(3):474-485.
Epub 2018 Oct 12. PubMed PMID: 30321616.
doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.10.010.

DISCUSIÓN



“Todos somos muy ignorantes, lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas”,

Albert Einstein.

DISCUSIÓN

El cáncer comprende un gran número de patologías diferentes y localizadas en diversos órganos corporales que comparten una serie de características comunes que definen la enfermedad. Debido a alteraciones en los mecanismos del ciclo celular, la gran mayoría de las células tumorales presentan una tasa de proliferación muy elevada y, en muchos casos incontrolada. Además, dichas alteraciones dotan a estas células de mecanismos que les permiten evitar los procesos de muerte natural programada o apoptosis. Las células tumorales poseen también la capacidad de migrar dentro del órgano afectado, ocupando el espacio de las células sanas, que tienen menos posibilidades de desarrollarse, ya que las células alteradas acaban consumiendo todos los nutrientes debido a su metabolismo acelerado. En algunas ocasiones, las células tumorales son capaces de atravesar las paredes de los vasos sanguíneos y linfáticos y viajar por el sistema circulatorio hasta otros órganos, en un proceso denominado metástasis, invadiendo estos órganos de manera muy agresiva. Para favorecer esta invasión, y el desarrollo de los otros procesos citados previamente, los tumores son capaces de inducir angiogénesis, formando nuevos vasos sanguíneos que los irrigen y asegurándose el aporte adecuado de nutrientes que les permita seguir creciendo. La transformación de una célula sana en una célula tumoral se debe principalmente a una alteración del balance entre los mecanismos de proliferación y los de apoptosis. Durante los últimos años, han surgido numerosas evidencias que demuestran que la transformación de una célula sana en una célula tumoral conlleva la alteración en los mecanismos que regulan la homeostasis del ion Ca^{2+} . Si bien es difícil imaginar que el desarrollo de una enfermedad multifactorial como el cáncer sea provocado exclusivamente por la desregulación del ion Ca^{2+} , desentramar las alteraciones de los mecanismos que regulan dicha homeostasis es crucial para entender la enfermedad.

Entre los procesos que promueven incrementos en la concentración de Ca^{2+} citosólico, necesarios para la activación de un gran número de respuestas fisiológicas, la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular activada por el vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} intracelulares o entrada capacitativa de calcio (ECC) es la más importante en células no excitables. Los componentes esenciales de la ECC son los miembros de las familias de proteínas STIM (STIM1 y STIM2), Orai (Orai1-3) y TRPC (TRPC1-7). El elevado número de isoformas, que aumenta si tenemos en cuenta los diferentes splicing alternativos que cada proteína puede sufrir, da una idea del control tan preciso que

requiere este mecanismo fundamental para el mantenimiento de la salud. Además, se está descubriendo un gran número de proteínas reguladoras de estos componentes principales de la ECC, como SARAF, EFHB o filamina A, que añaden un nivel más de complejidad a la ECC. Aunque existen numerosas publicaciones que demuestran que las células tumorales sufren alteraciones en la expresión de los diferentes componentes de la ECC, no se tiene todavía un conocimiento adecuado del papel de las proteínas STIM, Orai y TRPC, y sus reguladores, en la biología de dichas células (Smani, T. y cols., 2015). Por ejemplo, mientras que en la mayoría de las células tumorales la ECC está involucrada en la resistencia a la apoptosis, en las células de cáncer de próstata esta entrada de Ca^{2+} es pro-apoptótica. En este tipo celular, Orai3 se encuentra sobre-expresada, lo que lleva a una alteración del ratio Orai1:Orai3, que conduce a una reducción de la ECC, mientras que la entrada de Ca^{2+} a través de los canales activados por ácido araquidónico (ARC) se halla incrementada, lo que favorece la resistencia a la apoptosis y el crecimiento de este tipo de tumores (Dubois, C.F. y cols., 2014). Existen numerosos estudios que muestran la relevancia clínica de la ECC en la progresión de los tumores y su potencial en la diagnosis y prognosis de diferentes tipos de cánceres (Jardin, I. y Rosado J.A., 2016). Curiosamente, el papel de las proteínas STIM, Orai y TRPC en la biología tumoral no es similar en todas las líneas investigadas. Esta discrepancia puede ser atribuida a la variedad en la distribución espacial de estas proteínas en las células, o a que el patrón de expresión de las mismas difiera en cada tipo celular, e incluso porque esta expresión sea regulada por la misma célula tumoral, como sucede en el cáncer de mama, en donde Orai3 está regulado por el receptor del estrógeno (Motiani, R.K. y cols., 2010). Otro factor a tener en cuenta es que el ratio de expresión entre las diferentes splicing alternativas de STIM y Orai no ha sido estudiado todavía. Profundizar en ello puede darnos una visión más exacta del papel de la ECC en la fisiopatología de las células cancerígenas.

Por tanto, y en consonancia con lo escrito con anterioridad, para la realización de esta tesis nos planteamos como hipótesis de partida que la expresión de los miembros de las familias Orai y TRPC, que forman los canales en la membrana plasmática que median la ECC, pudiera estar alterada en diferentes tumores, otorgándoles pues, una ventaja biológica para su desarrollo y supervivencia.

Para la realización de esta tesis hemos empleado un amplio número de técnicas fisiológicas, específicas para el estudio de tumores, bioquímicas, de biología molecular y

biofísicas que nos han permitido abordar nuestros estudios desde ángulos muy diversos y obtener información tanto transversal como a un nivel más molecular.

En el primer trabajo presentado en esta tesis (*Diez-Bello R, Jardin I, Salido GM, Rosado JA. Orai1 and Orai2 mediate store-operated calcium entry that regulates HL60 cell migration and FAK phosphorylation. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2017 Jun;1864(6):1064-1070. Epub 2016 Nov 16. PubMed PMID: 27865925. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.11.014*), hemos estudiado el papel de los componentes esenciales de la ECC en la línea de leucemia mieloide aguda HL60. El análisis inicial de la expresión de los miembros de las familias STIM, Orai y TRPC, a nivel de ARNm y proteico (por Real-Time qPCR y Western blotting respectivamente), fue realmente sorprendente. En primer lugar, el ratio de expresión de Orai2 en esta línea celular era superior al de Orai1 y al de Orai3 (éste último casi indetectable). Por otro lado, tanto STIM1 como STIM2 mostraban una expresión similar. Finalmente, ninguno de los miembros de la familia TRPC estudiados, TRPC1, TRPC3 y TRPC6, se expresaban en la línea celular HL60. Estos datos hicieron que nos planteáramos dos preguntas:

¿Está la ECC modulada por Orai2 en la línea celular HL60? Aunque existen evidencias de que Orai2 se halla expresado de manera abundante en neuronas o en las células de carcinoma de colon HT29, no existen pruebas claras de que sea un componente fundamental para la ECC en ningún modelo celular. Por ejemplo, su función en neuronas es, sobre todo, la de propiciar una ECC moderada, aunque prolongada (Kraft, R y cols, 2015). En la línea HT29, el silenciamiento de Orai2 no tuvo efectos en la ECC (Sobradillo, D. y cols, 2014).

¿Los canales que operan la ECC en la línea celular HL60 están formados exclusivamente por Orai1 y Orai2? Como se ha descrito en los antecedentes bibliográficos, existen dos tipos de canales que median la ECC, los canales CRAC (formados por STIM1-Orai1) y los canales SOC (en los que intervienen STIM1-Orai1-TRPC1) (Desai, P.N. y cols, 2015). La ausencia de TRPC1, y por tanto de canales SOC, en HL60 hace que el papel de Orai1 y Orai2 cobre más relevancia en la fisiopatología de éstas células.

Como se muestra en la sección de resultados, el silenciamiento de los canales Orai1 y Orai2, por separado o en conjunto, redujo de manera casi total la ECC en la línea tumoral HL60, teniendo Orai2 la mayor trascendencia en el mecanismo. Además, el

silenciamiento de ambas proteínas tuvo un efecto inhibitorio en la proliferación y la migración de la línea leucémica, debido a su papel fundamental en la fosforilación en tirosina de la cinasa de adhesión focal (FAK) que tiene un rol importante en la migración celular. Esta es la primera vez, que sepamos, donde el papel de Orai2 es tan fundamental como el de Orai1 en el mecanismo de la entrada capacitativa de Ca^{2+} . Los datos obtenidos en este trabajo abren la posibilidad de emplear el canal Orai2 como un biomarcador para leucemia mieloide aguda y una posible diana para futuras terapias.

A continuación, y dada la dificultad para encontrar células sanas para utilizarlas como control de la línea HL60, decidimos hacer un cambio de modelo celular para continuar con nuestras investigaciones sobre las implicaciones de los canales Orai y TRPC en las células tumorales. El modelo de cáncer elegido fue el de mama, y para ello usamos tres líneas mamarias, una no tumoral, MCF10A, que nos serviría como referencia de célula sana, y dos líneas tumorales, luminal A MCF7 y triple negativo MDA-MB-231. El papel de la ECC en células tumorales mamarias había sido descrito con anterioridad y conocíamos que, en la línea triple negativo MDA-MB-231, la ECC está regulada por STIM1 y Orai1, mientras que eran STIM1-2 y Orai3 las responsables de mediar la ECC en la línea luminal A MCF7. Además, en esta línea tumoral, Orai3 está regulada por los receptores $RE\alpha$, convirtiéndolo en un posible objetivo para una terapia contra el cáncer de mama tipo luminal A (Motiani, R.K. y cols., 2010).

Sin embargo, el papel de los canales TRPCs en estas líneas celulares había sido poco estudiado. Como se describe en el segundo trabajo de esta tesis (*Jardin I, Díez-Bello R, Lopez JJ, Redondo PC, Salido GM, Smani T, Rosado JA. TRPC6 Channels Are Required for Proliferation, Migration and Invasion of Breast Cancer Cell Lines by Modulation of Orai1 and Orai3 Surface Exposure. Cancers (Basel). 2018 Sep 14;10(9). pii: E331. PubMed PMID: 30223530; PubMed Central PMCID: PMC6162527. doi: 10.3390/cancers10090331*), hemos demostrado que el canal TRPC6 tiene un papel fundamental en la fisiopatología de las células tumorales mamarias. En primer lugar, mostramos que el canal TRPC6 se encuentra sobre-expresado en las líneas tumorales luminal A MCF7 y triple negativo MDA-MB-231 al comparar su expresión con la línea inmortalizada no tumoral mamaria MCF10A. Mediante técnicas de biología molecular, ARN de interferencia (shTRPC6) y la expresión de un mutante dominante negativo del canal (TRPC6dn), hemos probado que el canal TRPC6 tiene un papel fundamental en la ECC y, por tanto, en la proliferación, la migración, la invasión. El uso del plásmido de

silenciamiento shTRPC6 o del TRPC6dn condujo a una inhibición en todas las funciones citadas. De los datos obtenidos concluimos que el flujo de iones a través del canal TRPC6, tras un estímulo, promueve la localización de Orai3 y Orai1 en la membrana plasmática, y por tanto la ECC, en las líneas tumorales luminal A MCF7 y triple negativo MDA-MB-231.

Este trabajo es muy relevante porque en él mostramos por primera vez un papel diferencial en la activación de la ECC en células tumorales. En una célula sana, el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} tras un estímulo, conlleva a la activación de STIM1 y, en consecuencia, la de los canales Orai1 que median la entrada de Ca^{2+} desde el medio extra-celular, promoviendo, a su vez, la secreción de vesículas y la translocación de canales TRPC1 a la membrana plasmática que prolongan la duración del mecanismo de entrada de Ca^{2+} (Ong, H.L. y cols, 2017). Por el contrario, en nuestro modelo en células tumorales mamarias, la unión de un agonista a su receptor en la MP, promueve la entrada de iones a través del canal TRPC6, que propicia a su vez la translocación de canales Orai1 a la MP y la ECC incrementada que da a estas células tumorales una ventaja biológica frente a las células mamarias no tumorales.

Siguiendo la misma línea de investigación y en una colaboración con el Dpto. Química Inorgánica y Orgánica de la Universidad de Jaén, en el último trabajo presentado en esta tesis doctoral (Diez-Bello R, Jardin I, Lopez JJ, El Haouari M, Ortega-Vidal J, Altarejos J, Salido GM, Salido S, Rosado JA. (-)-Oleocanthal inhibits proliferation and migration by modulating Ca^{2+} entry through TRPC6 in breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019 Mar;1866(3):474-485. Epub 2018 Oct 12. PubMed PMID: 30321616. doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.10.010) nuestros experimentos demuestran que el extracto fenólico del aceite de oliva, (-)-oleocanthal (OLCT), tiene un papel importante en la movilización de Ca^{2+} y que inhibe la viabilidad, la proliferación y la migración de las líneas tumorales luminal A MCF7 y triple negativo MDA-MB-231, sin afectar a la línea no tumoral mamaria MCF10A. El efecto del OLCT se debe a una regulación a la baja de la expresión del canal TRPC6, anulando el flujo de iones necesario para que los canales Orai se transloquen a la MP y se produzca la ECC. Este trabajo está en clara sintonía con el anterior y demuestra que un control eficaz en la regulación de la expresión del canal TRPC6 podría utilizarse, en el futuro, como biomarcador y el OLCT como herramienta para combatir el cáncer de mama.

En resumen, los resultados presentados en esta tesis dejan patente la relevancia de la ECC en la fisiopatología del cáncer y la necesidad de profundizar en el conocimiento de sus componentes principales, las proteínas STIM, Orai y TRPC, que abrirán la puerta a nuevas herramientas para el pronóstico y terapia para combatir diferentes tipos de cáncer.

CONCLUSIONES



“Si he realizado descubrimientos invaluables ha sido más por tener paciencia que cualquier otro talento”,

Isaac Newton.

CONCLUSIONES

- La entrada capacitativa de calcio (ECC) en la línea celular HL60 está mayoritariamente soportada por Orai1 y Orai2. La expresión de transcripción de Orai2 está sumamente elevada en esta línea celular. Sin embargo, los canales controlados por STIM, Orai3, TRPC1, TRPC3 y TRPC6, se expresan escasamente.
- El silenciamiento de forma individual de Orai1 y Orai2 no altera la proliferación celular, sugiriendo que la función de estos canales no se requiere para desarrollar este proceso.
- Orai1 y Orai2 son esenciales para activar de forma completa el proceso de migración celular.
- El canal TRPC6 tiene un papel fundamental en la homeostasis del Ca^{2+} y en los mecanismos de proliferación e invasión en la línea celular de cáncer de mama triple negativa, MDA-MB-231.
- El OLCT induce una activación rápida y dependiente de la concentración de la entrada Ca^{2+} a través del canal TRPC6, seguida de la atenuación de la expresión del canal TRPC6. Esto último da lugar a la inhibición de la proliferación y migración en las líneas celulares tumorales de mama MCF7 y MDA-MB-231.

CONCLUSIONS

- Capacitative calcium entry in HL60 cell line is mainly operated by Orai1 and Orai2. The transcript of Orai2 is highly expressed in these cells. However, channels controlled by STIM, Orai3 and TRPC1, TRPC3 and TRPC6 are scarcely expressed.
- The individual silencing of Orai1 and Orai2 does not alter cell proliferation, suggesting that the function of these channels is not required to develop this process.
- Orai1 and Orai2 are essential to activate completely cell migration.
- TRPC6 channel plays a key role in calcium homeostasis and in the mechanisms of proliferation and invasion in the triple negative breast cancer cell line, MDA-MB-231.
- OLCT induces rapid and concentration-dependent activation of Ca^{2+} influx via TRPC6 channels, followed by a slow attenuation in TRPC6 channel expression at the protein level, which results in attenuation of proliferation and migration of the breast cancer cell lines MCF7 and MDA-MB-231.

BIBLIOGRAFÍA



“El científico no tiene por objeto un resultado inmediato. Él no espera que sus ideas avanzadas sean fácilmente aceptadas. Su deber es sentar las bases para aquellos que están por venir y señalar el camino”,

Nikola Tesla.

BIBLIOGRAFÍA

Abuznait, A. H., Qosa, H., Busnena, B. A., El Sayed, K. A. and Kaddoumi, A. (2013). "Olive-oil-derived oleocanthal enhances beta-amyloid clearance as a potential neuroprotective mechanism against Alzheimer's disease: in vitro and in vivo studies." ACS Chem Neurosci **4**(6): 973-982.

Adunyah, S. E. and Dean, W. L. (1987). "Regulation of human platelet membrane Ca²⁺ transport by cAMP- and calmodulin-dependent phosphorylation." Biochim Biophys Acta **930**(3): 401-409.

Agarwal, S., Zerillo, C., Kolmakova, J., Christensen, J. G., Harris, L. N., Rimm, D. L., Digiovanna, M. P. and Stern, D. F. (2009). "Association of constitutively activated hepatocyte growth factor receptor (Met) with resistance to a dual EGFR/Her2 inhibitor in non-small-cell lung cancer cells." Br J Cancer **100**(6): 941-949.

Akl, M. R., Ayoub, N. M., Mohyeldin, M. M., Busnena, B. A., Foudah, A. I., Liu, Y. Y. and Sayed, K. A. (2014). "Olive phenolics as c-Met inhibitors: (-)-Oleocanthal attenuates cell proliferation, invasiveness, and tumor growth in breast cancer models." PLoS One **9**(5): e97622.

Almirza, W. H., Peters, P. H., van Zoelen, E. J. and Theuvenet, A. P. (2012). "Role of TRPC channels, STIM1 and Orai1 in PGF(2alpha)-induced calcium signaling in NRK fibroblasts." Cell Calcium **51**(1): 12-21.

Alvarez, J., Montero, M. and Garcia-Sancho, J. (1992). "Cytochrome P450 may regulate plasma membrane Ca²⁺ permeability according to the filling state of the intracellular Ca²⁺ stores." FASEB J **6**(2): 786-792.

American Cancer Society (2019), from <https://www.cancer.org/>.

Antigny, F., Girardin, N. and Frieden, M. (2012). "Transient receptor potential canonical channels are required for in vitro endothelial tube formation." J Biol Chem **287**(8): 5917-5927.

Ariano, P., Dalmazzo, S., Owsianik, G., Nilius, B. and Lovisolo, D. (2011). "TRPC channels are involved in calcium-dependent migration and proliferation in immortalized GnRH neurons." Cell Calcium **49**(6): 387-394.

Asociación Española Contra el Cáncer (2019), from <https://www.aecc.es/es>.

Aydar, E., Yeo, S., Djamgoz, M. and Palmer, C. (2009). "Abnormal expression, localization and interaction of canonical transient receptor potential ion channels in human breast cancer cell lines and tissues: a potential target for breast cancer diagnosis and therapy." Cancer Cell Int **9**: 23.

Aytes, A., Mollevi, D. G., Martinez-Iñiesta, M., Nadal, M., Vidal, A., Morales, A., Salazar, R., Capella, G. and Villanueva, A. (2012). "Stromal interaction molecule 2 (STIM2) is frequently overexpressed in colorectal tumors and confers a tumor cell growth suppressor phenotype." Mol Carcinog **51**(9): 746-753.

Baba, Y., Hayashi, K., Fujii, Y., Mizushima, A., Watarai, H., Wakamori, M., Numaga, T., Mori, Y., Iino, M., Hikida, M. and Kurosaki, T. (2006). "Coupling of STIM1 to store-operated Ca^{2+} entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(45): 16704-16709.

Baba, Y. and Kurosaki, T. (2009). "Physiological function and molecular basis of STIM1-mediated calcium entry in immune cells." Immunol Rev **231**(1): 174-188.

Bandyopadhyay, B. C., Pingle, S. C. and Ahern, G. P. (2011). "Store-operated Ca^{2+} signaling in dendritic cells occurs independently of STIM1." J Leukoc Biol **89**(1): 57-62.

Bautista, D. M., Hoth, M. and Lewis, R. S. (2002). "Enhancement of calcium signalling dynamics and stability by delayed modulation of the plasma-membrane calcium-ATPase in human T cells." J Physiol **541**(Pt 3): 877-894.

Beauchamp, E. M., Kosciuczuk, E. M., Serrano, R., Nanavati, D., Swindell, E. P., Viollet, B., O'Halloran, T. V., Altman, J. K. and Platanias, L. C. (2015). "Direct binding of arsenic trioxide to AMPK and generation of inhibitory effects on acute myeloid leukemia precursors." Mol Cancer Ther **14**(1): 202-212.

Beauchamp, G. K., Keast, R. S., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q., Lee, C. H., Smith, A. B. and Breslin, P. A. (2005). "Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil." Nature **437**(7055): 45-46.

Bell, N., Hann, V., Redfern, C. P. and Cheek, T. R. (2013). "Store-operated Ca^{2+} entry in proliferating and retinoic acid-differentiated N- and S-type neuroblastoma cells." Biochim Biophys Acta **1833**(3): 643-651.

Benarroch, E. E. (2011). "NMDA receptors: recent insights and clinical correlations." Neurology **76**(20): 1750-1757.

Berna-Erro, A., Braun, A., Kraft, R., Kleinschnitz, C., Schuhmann, M. K., Stegner, D., Wultsch, T., Eilers, J., Meuth, S. G., Stoll, G. and Nieswandt, B. (2009). "STIM2 regulates capacitive Ca^{2+} entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death." Sci Signal **2**(93): ra67.

Berna-Erro, A., Redondo, P. C. and Rosado, J. A. (2012). "Store-operated Ca^{2+} entry." Adv Exp Med Biol **740**: 349-382.

Berridge, M. J. (1995). "Capacitative calcium entry." Biochem J **312** (Pt 1): 1-11.

Berridge, M. J. (1997). "Elementary and global aspects of calcium signalling." J Physiol **499** (Pt 2): 291-306.

Berridge, M. J. (2001). "The versatility and complexity of calcium signalling." Novartis Found Symp **239**: 52-64; discussion 64-57, 150-159.

Berridge, M. J. (2005). "Unlocking the secrets of cell signaling." Annu Rev Physiol **67**: 1-21.

Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Roderick, H. L. (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 517-529.

Bezprozvanny, I. and Ehrlich, B. E. (1993). "ATP modulates the function of inositol 1,4,5-trisphosphate-gated channels at two sites." Neuron **10**(6): 1175-1184.

Bezprozvanny, I., Watras, J. and Ehrlich, B. E. (1991). "Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum." Nature **351**(6329): 751-754.

Bird, G. S. and Putney, J. W., Jr. (1993). "Inhibition of thapsigargin-induced calcium entry by microinjected guanine nucleotide analogues. Evidence for the involvement of a small G-protein in capacitative calcium entry." J Biol Chem **268**(29): 21486-21488.

Birnbaumer, L., Zhu, X., Jiang, M., Boulay, G., Peyton, M., Vannier, B., Brown, D., Platano, D., Sadeghi, H., Stefani, E. and Birnbaumer, M. (1996). "On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for TRP proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15195-15202.

Birnie, G. D. (1988). "The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation." Br J Cancer Suppl **9**: 41-45.

Blaustein, M. P. and Lederer, W. J. (1999). "Sodium/calcium exchange: its physiological implications." Physiol Rev **79**(3): 763-854.

Bomben, V. C. and Sontheimer, H. (2010). "Disruption of transient receptor potential canonical channel 1 causes incomplete cytokinesis and slows the growth of human malignant gliomas." Glia **58**(10): 1145-1156.

Bomben, V. C., Turner, K. L., Barclay, T. T. and Sontheimer, H. (2011). "Transient receptor potential canonical channels are essential for chemotactic migration of human malignant gliomas." J Cell Physiol **226**(7): 1879-1888.

Bootman, M. D., Collins, T. J., Peppiatt, C. M., Prothero, L. S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S. C., Seo, J. T., Berridge, M. J., Ciccolini, F. and Lipp, P. (2001). "Calcium signalling-an overview." Semin Cell Dev Biol **12**(1): 3-10.

Breastcancer.org. (2019), from <https://www.breastcancer.org>.

Brechard, S., Melchior, C., Plancon, S., Schenten, V. and Tschirhart, E. J. (2008). "Store-operated Ca²⁺ channels formed by TRPC1, TRPC6 and Orai1 and non-store-operated channels formed by TRPC3 are involved in the regulation of NADPH oxidase in HL60 granulocytes." Cell Calcium **44**(5): 492-506.

Busnena, B. A., Foudah, A. I., Melancon, T. and El Sayed, K. A. (2013). "Olive secoiridoids and semisynthetic bioisostere analogues for the control of metastatic breast cancer." Bioorg Med Chem **21**(7): 2117-2127.

Cai, R., Ding, X., Zhou, K., Shi, Y., Ge, R., Ren, G., Jin, Y. and Wang, Y. (2009). "Blockade of TRPC6 channels induced G2/M phase arrest and suppressed growth in human gastric cancer cells." Int J Cancer **125**(10): 2281-2287.

Calloway, N., Owens, T., Corwith, K., Rodgers, W., Holowka, D. and Baird, B. (2011). "Stimulated association of STIM1 and Orai1 is regulated by the balance of PtdIns(4,5)P₂ between distinct membrane pools." J Cell Sci **124**(Pt 15): 2602-2610.

- Caroni, P. and Carafoli, E. (1981). "The Ca^{2+} -pumping ATPase of heart sarcolemma. Characterization, calmodulin dependence, and partial purification." *J Biol Chem* **256**(7): 3263-3270.
- Castro, N. E. and Lange, C. A. (2010). "Breast tumor kinase and extracellular signal-regulated kinase 5 mediate Met receptor signaling to cell migration in breast cancer cells." *Breast Cancer Res* **12**(4): R60.
- Catlin, S. N., Busque, L., Gale, R. E., Guttorp, P. and Abkowitz, J. L. (2011). "The replication rate of human hematopoietic stem cells in vivo." *Blood* **117**(17): 4460-4466.
- Cavallini, L., Coassin, M. and Alexandre, A. (1995). "Two classes of agonist-sensitive Ca^{2+} stores in platelets, as identified by their differential sensitivity to 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone and thapsigargin." *Biochem J* **310** (Pt 2): 449-452.
- Cicerale, S., Conlan, X. A., Barnett, N. W., Sinclair, A. J. and Keast, R. S. (2009). "Influence of heat on biological activity and concentration of oleocanthal-a natural anti-inflammatory agent in virgin olive oil." *J Agric Food Chem* **57**(4): 1326-1330.
- Cohen, A. W., Razani, B., Schubert, W., Williams, T. M., Wang, X. B., Iyengar, P., Brasaemle, D. L., Scherer, P. E. and Lisanti, M. P. (2004). "Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation." *Diabetes* **53**(5): 1261-1270.
- Collins, S. J. (1987). "The HL60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression." *Blood* **70**(5): 1233-1244.
- Contrera-Leal, E., Zarain-Herzberg, A. and Santiago-García, J. (2010). "Enfermedades asociadas con mutaciones y cambios en la expresión de las ATPasas- Ca^{2+} del retículo sarco(endo)plásmico." *Revista Médica de la Sociedad Veracruzana* **10**: 40-48.
- Cooke, V. G., LeBleu, V. S., Keskin, D., Khan, Z., O'Connell, J. T., Teng, Y., Duncan, M. B., Xie, L., Maeda, G., Vong, S., Sugimoto, H., Rocha, R. M., Damascena, A., Brentani, R. R. and Kalluri, R. (2012). "Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway." *Cancer Cell* **21**(1): 66-81.
- Courjaret, R. and Machaca, K. (2012). "STIM and Orai in cellular proliferation and division." *Front Biosci (Elite Ed)* **4**: 331-341.
- Cusimano, A., Balasus, D., Azzolina, A., Augello, G., Emma, M. R., Di Sano, C., Gramignoli, R., Strom, S. C., McCubrey, J. A., Montalto, G. and Cervello, M. (2017). "Oleocanthal exerts antitumor effects on human liver and colon cancer cells through ROS generation." *Int J Oncol* **51**(2): 533-544.
- Chadwick, C. C., Saito, A. and Fleischer, S. (1990). "Isolation and characterization of the inositol trisphosphate receptor from smooth muscle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(6): 2132-2136.
- Chen, D. and Evans, P.A. (2017). "A Concise, Efficient and Scaleable Total Synthesis of Thapsigargin and Nortrilobolide from (R)-(-)-Carvone." *J Am Chem Soc* **139**(17):6046-6049.

Chen, L., Zhao, Q. and Lv, X. (2011). "Characteristics and prognosis of coexisting adnexa malignancy with endometrial cancer: a single institution review of 51 cases." Arch Gynecol Obstet **283**(5): 1133-1137.

Chen, W., Thielmann, I., Gupta, S., Subramanian, H., Stegner, D., van Kruchten, R., Dietrich, A., Gambaryan, S., Heemskerk, J. W., Hermanns, H. M., Nieswandt, B. and Braun, A. (2014). "Orai1-induced store-operated Ca^{2+} entry enhances phospholipase activity and modulates canonical transient receptor potential channel 6 function in murine platelets." J Thromb Haemost **12**(4): 528-539.

Chen, Y. F., Chen, Y. T., Chiu, W. T. and Shen, M. R. (2013). "Remodeling of calcium signaling in tumor progression." J Biomed Sci **20**: 23.

Chen, Y. F., Chiu, W. T., Chen, Y. T., Lin, P. Y., Huang, H. J., Chou, C. Y., Chang, H. C., Tang, M. J. and Shen, M. R. (2011). "Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(37): 15225-15230.

Chigurupati, S., Venkataraman, R., Barrera, D., Naganathan, A., Madan, M., Paul, L., Pattisapu, J. V., Kyriazis, G. A., Sugaya, K., Bushnev, S., Lathia, J. D., Rich, J. N. and Chan, S. L. (2010). "Receptor channel TRPC6 is a key mediator of Notch-driven glioblastoma growth and invasiveness." Cancer Res **70**(1): 418-427.

Darbellay, B., Arnaudeau, S., Bader, C. R., König, S. and Bernheim, L. (2011). "STIM1L is a new actin-binding splice variant involved in fast repetitive Ca^{2+} release." J Cell Biol **194**(2): 335-346.

Deng, X., Wang, Y., Zhou, Y., Soboloff, J. and Gill, D. L. (2009). "STIM and Orai: dynamic intermembrane coupling to control cellular calcium signals." J Biol Chem **284**(34): 22501-22505.

Derler, I., Fahrner, M., Muik, M., Lackner, B., Schindl, R., Groschner, K. and Romanin, C. (2009). "A Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) modulatory domain (CMD) within STIM1 mediates fast Ca^{2+} -dependent inactivation of Orai1 channels." J Biol Chem **284**(37): 24933-24938.

Derler, I., Plenk, P., Fahrner, M., Muik, M., Jardin, I., Schindl, R., Gruber, H. J., Groschner, K. and Romanin, C. (2013). "The extended transmembrane Orai1 N-terminal (ETON) region combines binding interface and gate for Orai1 activation by STIM1." J Biol Chem **288**(40): 29025-29034.

Desai, P. N., Zhang, X., Wu, S., Janoshazi, A., Bolimuntha, S., Putney, J. W. and Trebak, M. (2015). "Multiple types of calcium channels arising from alternative translation initiation of the Orai1 message." Sci Signal **8**(387): ra74.

Deschler, B. and Lubbert, M. (2006). "Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology." Cancer **107**(9): 2099-2107.

Dhennin-Duthille, I., Gautier, M., Faouzi, M., Guilbert, A., Brevet, M., Vaudry, D., Ahidouch, A., Sevestre, H. and Ouadid-Ahidouch, H. (2011). "High expression of transient receptor potential channels in human breast cancer epithelial cells and tissues: correlation with pathological parameters." Cell Physiol Biochem **28**(5): 813-822.

Dietrich, A., Mederos y Schnitzler, M., Emmel, J., Kalwa, H., Hofmann, T. and Gudermann, T. (2003). "N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity." *J Biol Chem* **278**(48): 47842-47852.

Ding, X., He, Z., Zhou, K., Cheng, J., Yao, H., Lu, D., Cai, R., Jin, Y., Dong, B., Xu, Y. and Wang, Y. (2010). "Essential role of TRPC6 channels in G2/M phase transition and development of human glioma." *J Natl Cancer Inst* **102**(14): 1052-1068.

Dionisio, N., Albarran, L., Lopez, J. J., Berna-Erro, A., Salido, G. M., Bobe, R. and Rosado, J. A. (2011). "Acidic NAADP-releasable Ca²⁺ compartments in the megakaryoblastic cell line MEG01." *Biochim Biophys Acta* **1813**(8): 1483-1494.

Dohner, H., Weisdorf, D. J. and Bloomfield, C. D. (2015). "Acute Myeloid Leukemia." *N Engl J Med* **373**(12): 1136-1152.

Domen, J., Wagers, A. Weissman, I.L. (2006). "Bone Marrow (Hematopoietic) Stem Cells". *Regenerative Medicine. Department of Health and Human Services.* </info/scireport/regenerativemedicine>: 14-34.

Dominguez-Rodriguez, A., Ruiz-Hurtado, G., Benitah, J. P. and Gomez, A. M. (2012). "The other side of cardiac Ca²⁺ signaling: transcriptional control." *Front Physiol* **3**: 452.

Dragoni, S., Turin, I., Laforenza, U., Potenza, D. M., Bottino, C., Glasnov, T. N., Prestia, M., Ferulli, F., Saitta, A., Mosca, A., Guerra, G., Rosti, V., Luinetti, O., Ganini, C., Porta, C., Pedrazzoli, P., Tanzi, F., Montagna, D. and Moccia, F. (2014). "Store-operated Ca²⁺ entry does not control proliferation in primary cultures of human metastatic renal cellular carcinoma." *Biomed Res Int* **2014**: 739494.

Dubois, C., Vanden Abeele, F., Lehen'kyi, V., Gkika, D., Guarmit, B., Lepage, G., Slomianny, C., Borowiec, A. S., Bidaux, G., Benahmed, M., Shuba, Y. and Prevarskaya, N. (2014). "Remodeling of channel-forming ORAI proteins determines an oncogenic switch in prostate cancer." *Cancer Cell* **26**(1): 19-32.

Eder, J. P., Vande Woude, G. F., Boerner, S. A. and LoRusso, P. M. (2009). "Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer." *Clin Cancer Res* **15**(7): 2207-2214.

Eder, P., Schindl, R., Romanin, C. and Groschner, K. (2007). "Protein-Protein Interactions in TRPC Channel Complexes." Chapter 24. *TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades.* Boca Raton (FL), CRC Press/Taylor & Francis.

El Boustany, C., Bidaux, G., Enfissi, A., Delcourt, P., Prevarskaya, N. and Capiod, T. (2008). "Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation." *Hepatology* **47**(6): 2068-2077.

El Hindi, S. and Reiser, J. (2011). "TRPC channel modulation in podocytes-inching toward novel treatments for glomerular disease." *Pediatr Nephrol* **26**(7): 1057-1064.

Elnagar, A. Y., Sylvester, P. W. and El Sayed, K. A. (2011). "(-)-Oleocanthal as a c-Met inhibitor for the control of metastatic breast and prostate cancers." *Planta Med* **77**(10): 1013-1019.

Elliott, B. E., Hung, W. L., Boag, A. H. and Tuck, A. B. (2002). "The role of hepatocyte growth factor (scatter factor) in epithelial-mesenchymal transition and breast cancer." Can J Physiol Pharmacol **80**(2): 91-102.

Endo, M. (2009). "Calcium-induced calcium release in skeletal muscle." Physiol Rev **89**(4): 1153-1176.

Enfissi, A., Prigent, S., Colosetti, P. and Capiod, T. (2004). "The blocking of capacitative calcium entry by 2-aminoethyl diphenylborate (2-APB) and carboxyamidotriazole (CAI) inhibits proliferation in Hep G2 and Huh-7 human hepatoma cells." Cell Calcium **36**(6): 459-467.

Fabian, A., Fortmann, T., Bulk, E., Bomben, V. C., Sontheimer, H. and Schwab, A. (2011). "Chemotaxis of MDCK-F cells toward fibroblast growth factor-2 depends on transient receptor potential canonical channel 1." Pflugers Arch **461**(2): 295-306.

Fabian, A., Fortmann, T., Dieterich, P., Riethmuller, C., Schon, P., Mally, S., Nilius, B. and Schwab, A. (2008). "TRPC1 channels regulate directionality of migrating cells." Pflugers Arch **457**(2): 475-484.

Falk, H., Matthiessen, L. W., Wooler, G. and Gehl, J. (2018). "Calcium electroporation for treatment of cutaneous metastases; a randomized double-blinded phase II study, comparing the effect of calcium electroporation with electrochemotherapy." Acta Oncol **57**(3): 311-319.

Faouzi, M., Hague, F., Potier, M., Ahidouch, A., Sevestre, H. and Ouadid-Ahidouch, H. (2011). "Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells." J Cell Physiol **226**(2): 542-551.

Fasolato, C., Hoth, M. and Penner, R. (1993). "A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative calcium influx." J Biol Chem **268**(28): 20737-20740.

Feldman, B., Fedida-Metula, S., Nita, J., Sekler, I. and Fishman, D. (2010). "Coupling of mitochondria to store-operated Ca^{2+} -signaling sustains constitutive activation of protein kinase B/Akt and augments survival of malignant melanoma cells." Cell Calcium **47**(6): 525-537.

Feske, S. (2009). "Orai1 and STIM1 deficiency in human and mice: roles of store-operated Ca^{2+} entry in the immune system and beyond." Immunol Rev **231**(1): 189-209.

Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M. and Rao, A. (2006). "A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function." Nature **441**(7090): 179-185.

Fini, L., Hotchkiss, E., Fogliano, V., Graziani, G., Romano, M., De Vol, E. B., Qin, H., Selgrad, M., Boland, C. R. and Ricciardiello, L. (2008). "Chemopreventive properties of pinoresinol-rich olive oil involve a selective activation of the ATM-p53 cascade in colon cancer cell lines." Carcinogenesis **29**(1): 139-146.

Fiorio Pla, A., Avanzato, D., Munaron, L. and Ambudkar, I. S. (2012). "Ion channels and transporters in cancer. 6. Vascularizing the tumor: TRP channels as molecular targets." Am J Physiol Cell Physiol **302**(1): C9-15.

Flourakis, M., Lehen'kyi, V., Beck, B., Raphael, M., Vandenberghe, M., Abeele, F. V., Roudbaraki, M., Lepage, G., Mauroy, B., Romanin, C., Shuba, Y., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2010). "Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells." Cell Death Dis **1**: e75.

Fogli, S., Arena, C., Carpi, S., Polini, B., Bertini, S., Digiaco, M., Gado, F., Saba, A., Saccomanni, G., Breschi, M. C., Nieri, P., Manera, C. and Macchia, M. (2016). "Cytotoxic Activity of Oleocanthal Isolated from Virgin Olive Oil on Human Melanoma Cells." Nutr Cancer **68**(5): 873-877.

Francone, T. D., Landmann, R. G., Chen, C. T., Sun, M. Y., Kuntz, E. J., Zeng, Z., Dematteo, R. P., Paty, P. B. and Weiser, M. R. (2007). "Novel xenograft model expressing human hepatocyte growth factor shows ligand-dependent growth of c-Met-expressing tumors." Mol Cancer Ther **6**(4): 1460-1466.

Frandsen, S. K., Gissel, H., Hojman, P., Tramm, T., Eriksen, J. and Gehl, J. (2012). "Direct therapeutic applications of calcium electroporation to effectively induce tumor necrosis." Cancer Res **72**(6): 1336-1341.

Frandsen, S. K., Kruger, M. B., Mangalanathan, U. M., Tramm, T., Mahmood, F., Novak, I. and Gehl, J. (2017). "Normal and Malignant Cells Exhibit Differential Responses to Calcium Electroporation." Cancer Res **77**(16): 4389-4401.

Frischauf, I., Zayats, V., Deix, M., Hochreiter, A., Jardin, I., Muik, M., Lackner, B., Svobodova, B., Pammer, T., Litvinukova, M., Sridhar, A. A., Derler, I., Bogeski, I., Romanin, C., Ettrich, R. H. and Schindl, R. (2015). "A calcium-accumulating region, CAR, in the channel Orai1 enhances Ca²⁺ permeation and SOCE-induced gene transcription." Sci Signal **8**(408): ra131.

Fukushima, M., Tomita, T., Janoshazi, A. and Putney, J. W. (2012). "Alternative translation initiation gives rise to two isoforms of Orai1 with distinct plasma membrane mobilities." J Cell Sci **125**(Pt 18): 4354-4361.

Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N. and Mikoshiba, K. (1989). "Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400." Nature **342**(6245): 32-38.

Furuya, Y., Lundmo, P., Short, A. D., Gill, D. L. and Isaacs, J. T. (1994). "The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin." Cancer Res **54**(23): 6167-6175.

Gachet, C. (2008). "P2 receptors, platelet function and pharmacological implications." Thromb Haemost **99**(3): 466-472.

Galan, C., Zbidi, H., Bartegi, A., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2009). "STIM1, Orai1 and hTRPC1 are important for thrombin- and ADP-induced aggregation in human platelets." Arch Biochem Biophys **490**(2): 137-144.

Ge, Y. L., Zhang, X., Zhang, J. Y., Hou, L. and Tian, R. H. (2009). "The mechanisms on apoptosis by inhibiting VEGF expression in human breast cancer cells." Int Immunopharmacol **9**(4): 389-395.

Gherardi, E., Birchmeier, W., Birchmeier, C. and Vande Woude, G. (2012). "Targeting MET in cancer: rationale and progress." Nat Rev Cancer **12**(2): 89-103.

Giacosa, A., Barale, R., Bavaresco, L., Gatenby, P., Gerbi, V., Janssens, J., Johnston, B., Kas, K., La Vecchia, C., Mainguet, P., Morazzoni, P., Negri, E., Pelucchi, C., Pezzotti, M. and Rondanelli, M. (2013). "Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice." Eur J Cancer Prev **22**(1): 90-95.

Gilio, K., van Kruchten, R., Braun, A., Berna-Erro, A., Feijge, M. A., Stegner, D., van der Meijden, P. E., Kuijpers, M. J., Varga-Szabo, D., Heemskerk, J. W. and Nieswandt, B. (2010). "Roles of platelet STIM1 and Orai1 in glycoprotein VI- and thrombin-dependent procoagulant activity and thrombus formation." J Biol Chem **285**(31): 23629-23638.

Giordano, S., Di Renzo, M. F., Narsimhan, R. P., Cooper, C. S., Rosa, C. and Comoglio, P. M. (1989). "Biosynthesis of the protein encoded by the c-met proto-oncogene." Oncogene **4**(11): 1383-1388.

Gross, S. A., Wissenbach, U., Philipp, S. E., Freichel, M., Cavalie, A. and Flockerzi, V. (2007). "Murine Orai2 splice variants form functional Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels." J Biol Chem **282**(27): 19375-19384.

Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." J Biol Chem **260**(6): 3440-3450.

Gueguinou, M., Harnois, T., Crottes, D., Uguen, A., Deliot, N., Gambade, A., Chantome, A., Haelters, J. P., Jaffres, P. A., Jourdan, M. L., Weber, G., Soriani, O., Bougnoux, P., Mignen, O., Bourmeyster, N., Constantin, B., Lecomte, T., Vandier, C. and 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**(24): 36168-36184.

Guilbert, A., Dhennin-Duthille, I., Hiani, Y. E., Haren, N., Khorsi, H., Sevestre, H., Ahidouch, A. and Ouadid-Ahidouch, H. (2008). "Expression of TRPC6 channels in human epithelial breast cancer cells." BMC Cancer **8**: 125.

Guyton, A. C., Ed. (1988). Tratado de Fisiología Médica. Madrid, McGraw-Hill Interamericana de España.

Gwack, Y., Srikanth, S., Feske, S., Cruz-Guilloty, F., Oh-hora, M., Neems, D. S., Hogan, P. G. and Rao, A. (2007). "Biochemical and functional characterization of Orai proteins." J Biol Chem **282**(22): 16232-16243.

Hamdollah Zadeh, M. A., Glass, C. A., Magnussen, A., Hancox, J. C. and Bates, D. O. (2008). "VEGF-mediated elevated intracellular calcium and angiogenesis in human microvascular endothelial cells in vitro are inhibited by dominant negative TRPC6." Microcirculation **15**(7): 605-614.

Hardie, R. C. and Minke, B. (1992). "The TRP gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors." Neuron **8**(4): 643-651.

Harper, A. G. and Sage, S. O. (2007). "A key role for reverse Na⁺/Ca²⁺ exchange influenced by the actin cytoskeleton in store-operated Ca²⁺ entry in human platelets:

evidence against the de novo conformational coupling hypothesis." Cell Calcium **42**(6): 606-617.

He, B., Liu, F., Ruan, J., Li, A., Chen, J., Li, R., Shen, J., Zheng, D. and Luo, R. (2012). "Silencing TRPC1 expression inhibits invasion of CNE2 nasopharyngeal tumor cells." Oncol Rep **27**(5): 1548-1554.

Hewavitharana, T., Deng, X., Soboloff, J. and Gill, D. L. (2007). "Role of STIM and Orai proteins in the store-operated calcium signaling pathway." Cell Calcium **42**(2): 173-182.

Hilgemann, D. W., Nicoll, D. A. and Philipson, K. D. (1991). "Charge movement during Na⁺ translocation by native and cloned cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger." Nature **352**(6337): 715-718.

Hofmann, T., Obukhov, A. G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T. and Schultz, G. (1999). "Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol." Nature **397**(6716): 259-263.

Hofstra, J. M., Coenen, M. J., Schijvenaars, M. M., Berden, J. H., van der Vlag, J., Hoefsloot, L. H., Knoers, N. V., Wetzels, J. F. and Nijenhuis, T. (2014). "TRPC6 single nucleotide polymorphisms and progression of idiopathic membranous nephropathy." PLoS One **9**(7): e102065.

Hogan, P. G., Lewis, R. S. and Rao, A. (2010). "Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and Orai." Annu Rev Immunol **28**: 491-533.

Holton, M. L., Wang, W., Emerson, M., Neyses, L. and Armesilla, A. L. (2010). "Plasma membrane calcium ATPase proteins as novel regulators of signal transduction pathways." World J Biol Chem **1**(6): 201-208.

Horinouchi, T., Higashi, T., Higa, T., Terada, K., Mai, Y., Aoyagi, H., Hatate, C., Nepal, P., Horiguchi, M., Harada, T. and Miwa, S. (2012). "Different binding property of STIM1 and its novel splice variant STIM1L to Orai1, TRPC3, and TRPC6 channels." Biochem Biophys Res Commun **428**(2): 252-258.

Hou, M. F., Kuo, H. C., Li, J. H., Wang, Y. S., Chang, C. C., Chen, K. C., Chen, W. C., Chiu, C. C., Yang, S. and Chang, W. C. (2011). "Orai1/CRACM1 overexpression suppresses cell proliferation via attenuation of the store-operated calcium influx-mediated signalling pathway in A549 lung cancer cells." Biochim Biophys Acta **1810**(12): 1278-1284.

Hou, X., Pedi, L., Diver, M. M. and Long, S. B. (2012). "Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai." Science **338**(6112): 1308-1313.

Huang, G. N., Zeng, W., Kim, J. Y., Yuan, J. P., Han, L., Muallem, S. and Worley, P. F. (2006). "STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, Icrac and TRPC1 channels." Nat Cell Biol **8**(9): 1003-1010.

Huang, J. B., Kindzelskii, A. L., Clark, A. J. and Petty, H. R. (2004). "Identification of channels promoting calcium spikes and waves in HT1080 tumor cells: their apparent roles in cell motility and invasion." Cancer Res **64**(7): 2482-2489.

Iacono, A., Gomez, R., Sperry, J., Conde, J., Bianco, G., Meli, R., Gomez-Reino, J. J., Smith, A. B., 3rd and Gualillo, O. (2010). "Effect of oleocanthal and its derivatives on

inflammatory response induced by lipopolysaccharide in a murine chondrocyte cell line." Arthritis Rheum **62**(6): 1675-1682.

Irvine, R. F., McNulty, T. J. and Schell, M. J. (1999). "Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate as a second messenger-a special role in neurones?" Chem Phys Lipids **98**(1-2): 49-57.

Iwamoto, T., Inoue, Y., Ito, K., Sakaue, T., Kita, S. and Katsuragi, T. (2004). "The exchanger inhibitory peptide region-dependent inhibition of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange by SN-6 [2-[4-(4-nitrobenzyloxy)benzyl]thiazolidine-4-carboxylic acid ethyl ester], a novel benzyloxyphenyl derivative." Mol Pharmacol **66**(1): 45-55.

Jardin, I., Gomez, L. J., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2009). "Dynamic interaction of hTRPC6 with the Orai1-STIM1 complex or hTRPC3 mediates its role in capacitative or non-capacitative Ca^{2+} entry pathways." Biochem J **420**(2): 267-276.

Jardin, I., Lopez, J. J., Redondo, P. C., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2009). "Store-operated Ca^{2+} entry is sensitive to the extracellular Ca^{2+} concentration through plasma membrane STIM1." Biochim Biophys Acta **1793**(10): 1614-1622.

Jardin, I., Redondo, P. C., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2008). "Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate enhances store-operated calcium entry through hTRPC6 channel in human platelets." Biochim Biophys Acta **1783**(1): 84-97.

Jardin, I. and Rosado, J. A. (2016). "STIM and calcium channel complexes in cancer." Biochim Biophys Acta **1863**(6 Pt B): 1418-1426.

Jardin, I., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2008). "Role of lipid rafts in the interaction between hTRPC1, Orai1 and STIM1." Channels (Austin) **2**(6): 401-403.

Jha, A., Ahuja, M., Maleth, J., Moreno, C. M., Yuan, J. P., Kim, M. S. and Muallem, S. (2013). "The STIM1 CTID domain determines access of SARAF to SOAR to regulate Orai1 channel function." J Cell Biol **202**(1): 71-79.

Ji, W., Xu, P., Li, Z., Lu, J., Liu, L., Zhan, Y., Chen, Y., Hille, B., Xu, T. and Chen, L. (2008). "Functional stoichiometry of the unitary calcium-release-activated calcium channel." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(36): 13668-13673.

Jia, X., Li, X., Xu, Y., Zhang, S., Mou, W., Liu, Y., Lv, D., Liu, C. H., Tan, X., Xiang, R. and Li, N. (2011). "SOX2 promotes tumorigenesis and increases the anti-apoptotic property of human prostate cancer cell." J Mol Cell Biol **3**(4): 230-238.

Kalluri, R. and Weinberg, R. A. (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." J Clin Invest **119**(6): 1420-1428.

Karakas, C. (2011). "Paget's disease of the breast." J Carcinog **10**: 31.

Kawasaki, T., Lange, I. and Feske, S. (2009). "A minimal regulatory domain in the C terminus of STIM1 binds to and activates Orai1 CRAC channels." Biochem Biophys Res Commun **385**(1): 49-54.

Kawasaki, T., Ueyama, T., Lange, I., Feske, S. and Saito, N. (2010). "Protein kinase C-induced phosphorylation of Orai1 regulates the intracellular Ca^{2+} level via the store-operated Ca^{2+} channel." J Biol Chem **285**(33): 25720-25730.

- Keiler, A. M., Zierau, O., Bernhardt, R., Scharnweber, D., Lemonakis, N., Termetzi, A., Skaltsounis, L., Vollmer, G. and Halabalaki, M. (2014). "Impact of a functionalized olive oil extract on the uterus and the bone in a model of postmenopausal osteoporosis." Eur J Nutr **53**(4): 1073-1081.
- Khanal, P., Oh, W. K., Yun, H. J., Namgoong, G. M., Ahn, S. G., Kwon, S. M., Choi, H. K. and Choi, H. S. (2011). "p-HPEA-EDA, a phenolic compound of virgin olive oil, activates AMP-activated protein kinase to inhibit carcinogenesis." Carcinogenesis **32**(4): 545-553.
- Khanfar, M. A., Bardaweel, S. K., Akl, M. R. and El Sayed, K. A. (2015). "Olive Oil-derived Oleocanthal as Potent Inhibitor of Mammalian Target of Rapamycin: Biological Evaluation and Molecular Modeling Studies." Phytother Res **29**(11): 1776-1782.
- Kim, E. J., Eom, S. J., Hong, J. E., Lee, J. Y., Choi, M. S. and Park, J. H. (2012). "Benzyl isothiocyanate inhibits basal and hepatocyte growth factor-stimulated migration of breast cancer cells." Mol Cell Biochem **359**(1-2): 431-440.
- Kini, S., Kapadia, R. M. and Amarapurkar, A. (2010). "Intussusception due to intestinal metastasis from lung cancer." Indian J Pathol Microbiol **53**(1): 141-143.
- Kondratska, K., Kondratskyi, A., Yassine, M., Lemonnier, L., Lepage, G., Morabito, A., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2014). "Orai1 and STIM1 mediate SOCE and contribute to apoptotic resistance of pancreatic adenocarcinoma." Biochim Biophys Acta **1843**(10): 2263-2269.
- Koss, D. J., Riedel, G., Bence, K. and Platt, B. (2013). "Store-operated Ca²⁺ entry in hippocampal neurons: Regulation by protein tyrosine phosphatase PTP1B." Cell Calcium **53**(2): 125-138.
- Kraft, R. (2015). "STIM and Orai proteins in the nervous system". Channels (Austin) **9**(5): 245-252.
- Kurzrock, R., Kantarjian, H. M., Druker, B. J. and Talpaz, M. (2003). "Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics." Ann Intern Med **138**(10): 819-830.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lee, K. P., Yuan, J. P., Zeng, W., So, I., Worley, P. F. and Muallem, S. (2009). "Molecular determinants of fast Ca²⁺-dependent inactivation and gating of the Orai channels." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(34): 14687-14692.
- LeGendre, O., Breslin, P. A. and Foster, D. A. (2015). "(-)-Oleocanthal rapidly and selectively induces cancer cell death via lysosomal membrane permeabilization." Mol Cell Oncol **2**(4): e1006077.
- Lewis, T. L., Brundage, K. M., Brundage, R. A. and Barnett, J. B. (2008). "3,4-Dichloropropionanilide (DCPA) inhibits T-cell activation by altering the intracellular calcium concentration following store depletion." Toxicol Sci **103**(1): 97-107.
- Li, M. and Xiong, Z. G. (2011). "Ion channels as targets for cancer therapy." Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol **3**(2): 156-166.

- Li, W., Sperry, J. B., Crowe, A., Trojanowski, J. Q., Smith, A. B., 3rd and Lee, V. M. (2009). "Inhibition of tau fibrillization by oleocanthal via reaction with the amino groups of tau." J Neurochem **110**(4): 1339-1351.
- Liao, Y., Erxleben, C., Abramowitz, J., Flockerzi, V., Zhu, M. X., Armstrong, D. L. and Birnbaumer, L. (2008). "Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(8): 2895-2900.
- Liou, J., Fivaz, M., Inoue, T. and Meyer, T. (2007). "Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(22): 9301-9306.
- Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. D., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr. and Meyer, T. (2005). "STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx." Curr Biol **15**(13): 1235-1241.
- Lioudyno, M. I., Kozak, J. A., Penna, A., Safrina, O., Zhang, S. L., Sen, D., Roos, J., Stauderman, K. A. and Cahalan, M. D. (2008). "Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(6): 2011-2016.
- Lis, A., Peinelt, C., Beck, A., Parvez, S., Monteilh-Zoller, M., Fleig, A. and Penner, R. (2007). "CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties." Curr Biol **17**(9): 794-800.
- Liu, H., Hughes, J. D., Rollins, S., Chen, B. and Perkins, E. (2011). "Calcium entry via Orai1 regulates glioblastoma cell proliferation and apoptosis." Exp Mol Pathol **91**(3): 753-760.
- Lodola, F., Laforenza, U., Bonetti, E., Lim, D., Dragoni, S., Bottino, C., Ong, H. L., Guerra, G., Ganini, C., Massa, M., Manzoni, M., Ambudkar, I. S., Genazzani, A. A., Rosti, V., Pedrazzoli, P., Tanzi, F., Moccia, F. and Porta, C. (2012). "Store-operated Ca²⁺ entry is remodelled and controls in vitro angiogenesis in endothelial progenitor cells isolated from tumoral patients." PLoS One **7**(9): e42541.
- Lopez, E., Berna-Erro, A., Bermejo, N., Brull, J. M., Martinez, R., Garcia Pino, G., Alvarado, R., Salido, G. M., Rosado, J. A., Cubero, J. J. and Redondo, P. C. (2013). "Long-term mTOR inhibitors administration evokes altered calcium homeostasis and platelet dysfunction in kidney transplant patients." J Cell Mol Med **17**(5): 636-647.
- Lopez, E., Berna-Erro, A., Salido, G. M., Rosado, J. A. and Redondo, P. C. (2013). "FKBP52 is involved in the regulation of SOCE channels in the human platelets and MEG 01 cells." Biochim Biophys Acta **1833**(3): 652-662.
- Lopez, E., Salido, G. M., Rosado, J. A. and Berna-Erro, A. (2012). "Unraveling STIM2 function." J Physiol Biochem **68**(4): 619-633.
- Lopez, J., Dionisio, N., Berna-Erro, A., Galan, C., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2012). "Two-pore channel 2 (TPC2) modulates store-operated Ca²⁺ entry." Biochim Biophys Acta **1823**(10): 1976-1983.

Lopez, J. J., Camello-Almaraz, C., Pariente, J. A., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2005). "Ca²⁺ accumulation into acidic organelles mediated by Ca²⁺- and vacuolar H⁺-ATPases in human platelets." Biochem J **390**(Pt 1): 243-252.

Lopez, J. J., Salido, G. M., Pariente, J. A. and Rosado, J. A. (2006). "Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular Ca²⁺ stores." J Biol Chem **281**(38): 28254-28264.

Lucas, L., Russell, A. and Keast, R. (2011). "Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal." Curr Pharm Des **17**(8): 754-768.

Luo, X., Hojaye, B., Jiang, N., Wang, Z. V., Tandan, S., Rakalin, A., Rothermel, B. A., Gillette, T. G. and Hill, J. A. (2012). "STIM1-dependent store-operated Ca²⁺ entry is required for pathological cardiac hypertrophy." J Mol Cell Cardiol **52**(1): 136-147.

Margarucci, L., Monti, M. C., Cassiano, C., Mozzicafreddo, M., Angeletti, M., Riccio, R., Tosco, A. and Casapullo, A. (2013). "Chemical proteomics-driven discovery of oleocanthal as an Hsp90 inhibitor." Chem Commun (Camb) **49**(52): 5844-5846.

Maroto, R., Kurosky, A. and Hamill, O. P. (2012). "Mechanosensitive Ca²⁺ permeant cation channels in human prostate tumor cells." Channels (Austin) **6**(4): 290-307.

McAndrew, D., Grice, D. M., Peters, A. A., Davis, F. M., Stewart, T., Rice, M., Smart, C. E., Brown, M. A., Kenny, P. A., Roberts-Thomson, S. J. and Monteith, G. R. (2011). "Orai1-mediated calcium influx in lactation and in breast cancer." Mol Cancer Ther **10**(3): 448-460.

McDonald, T. F., Pelzer, S., Trautwein, W. and Pelzer, D. J. (1994). "Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells." Physiol Rev **74**(2): 365-507.

Mekahli, D., Bultynck, G., Parys, J. B., De Smedt, H. and Missiaen, L. (2011). "Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(6).

Menendez, J. A., Vazquez-Martin, A., Colomer, R., Brunet, J., Carrasco-Pancorbo, A., Garcia-Villalba, R., Fernandez-Gutierrez, A. and Segura-Carretero, A. (2007). "Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin) in HER2-overexpressing breast cancer cells." BMC Cancer **7**: 80.

Mercer, J. C., Dehaven, W. I., Smyth, J. T., Wedel, B., Boyles, R. R., Bird, G. S. and Putney, J. W., Jr. (2006). "Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1." J Biol Chem **281**(34): 24979-24990.

Metcalfe, E. E., Traaseth, N. J. and Veglia, G. (2005). "Serine 16 phosphorylation induces an order-to-disorder transition in monomeric phospholamban." Biochemistry **44**(11): 4386-4396.

Mikoshiba, K. (2015). "Role of IP₃ receptor signaling in cell functions and diseases." Adv Biol Regul **57**: 217-227.

Missiaen, L., Taylor, C. W. and Berridge, M. J. (1991). "Spontaneous calcium release from inositol trisphosphate-sensitive calcium stores." Nature **352**(6332): 241-244.

Moccia, F., Zuccolo, E., Soda, T., Tanzi, F., Guerra, G., Mapelli, L., Lodola, F. and D'Angelo, E. (2015). "STIM and Orai proteins in neuronal Ca²⁺ signaling and excitability." Front Cell Neurosci **9**: 153.

Mohyeldin, M. M., Akl, M. R., Ebrahim, H. Y., Dragoi, A. M., Dykes, S., Cardelli, J. A. and El Sayed, K. A. (2016). "The oleocanthal-based homovanillyl sinapate as a novel c-Met inhibitor." Oncotarget **7**(22): 32247-32273.

Montell, C. (2001). "Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels." Sci STKE **2001**(90): re1.

Montell, C. (2005). "The TRP superfamily of cation channels." Sci STKE **2005**(272): re3.

Monti, M. C., Margarucci, L., Riccio, R. and Casapullo, A. (2012). "Modulation of tau protein fibrillization by oleocanthal." J Nat Prod **75**(9): 1584-1588.

Monti, M. C., Margarucci, L., Tosco, A., Riccio, R. and Casapullo, A. (2011). "New insights on the interaction mechanism between tau protein and oleocanthal, an extra-virgin olive-oil bioactive component." Food Funct **2**(7): 423-428.

Moore, C., Tymvios, C. and Emerson, M. (2010). "Functional regulation of vascular and platelet activity during thrombosis by nitric oxide and endothelial nitric oxide synthase." Thromb Haemost **104**(2): 342-349.

Motiani, R. K., Abdullaev, I. F. and Trebak, M. (2010). "A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells." J Biol Chem **285**(25): 19173-19183.

Motiani, R. K., Hyzinski-Garcia, M. C., Zhang, X., Henkel, M. M., Abdullaev, I. F., Kuo, Y. H., Matrougui, K., Mongin, A. A. and Trebak, M. (2013). "STIM1 and Orai1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion." Pflugers Arch **465**(9): 1249-1260.

Motiani, R. K., Zhang, X., Harmon, K. E., Keller, R. S., Matrougui, K., Bennett, J. A. and Trebak, M. (2013). "Orai3 is an estrogen receptor alpha-regulated Ca²⁺ channel that promotes tumorigenesis." FASEB J **27**(1): 63-75.

Muik, M., Fahrner, M., Derler, I., Schindl, R., Bergsmann, J., Frischauf, I., Groschner, K. and Romanin, C. (2009). "A Cytosolic Homomerization and a Modulatory Domain within STIM1 C Terminus Determine Coupling to Orai1 Channels." J Biol Chem **284**(13): 8421-8426.

Muik, M., Fahrner, M., Schindl, R., Stathopoulos, P., Frischauf, I., Derler, I., Plenk, P., Lackner, B., Groschner, K., Ikura, M. and Romanin, C. (2011). "STIM1 couples to Orai1 via an intramolecular transition into an extended conformation." EMBO J **30**(9): 1678-1689.

Mullins, F. M., Park, C. Y., Dolmetsch, R. E. and Lewis, R. S. (2009). "STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC channels." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(36): 15495-15500.

Munshi, N., Jeay, S., Li, Y., Chen, C. R., France, D. S., Ashwell, M. A., Hill, J., Moussa, M. M., Leggett, D. S. and Li, C. J. (2010). "ARQ 197, a novel and selective inhibitor of the human c-Met receptor tyrosine kinase with antitumor activity." *Mol Cancer Ther* **9**(6): 1544-1553.

National Cancer Institute (2019), from <https://www.cancer.gov/>.

Nakamura, T., Sakai, K. and Matsumoto, K. (2011). "Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor." *J Gastroenterol Hepatol* **26 Suppl 1**: 188-202.

Neher, E. (1992). "Cell physiology. Controls on calcium influx." *Nature* **355**(6358): 298-299.

Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T. and Peters, J. A. (2007). "Transient receptor potential cation channels in disease." *Physiol Rev* **87**(1): 165-217.

Nowell, P. C. and Hungerford, D. A. (1961). "Chromosome studies in human leukemia. II. Chronic granulocytic leukemia." *J Natl Cancer Inst* **27**: 1013-1035.

Ohba, T., Watanabe, H., Murakami, M., Takahashi, Y., Iino, K., Kuromitsu, S., Mori, Y., Ono, K., Iijima, T. and Ito, H. (2007). "Upregulation of TRPC1 in the development of cardiac hypertrophy." *J Mol Cell Cardiol* **42**(3): 498-507.

Ohkubo, T. and Yamazaki, J. (2012). "T-type voltage-activated calcium channel Cav3.1, but not Cav3.2, is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis in MCF7 human breast cancer cells." *Int J Oncol* **41**(1): 267-275.

Olah, T., Fodor, J., Ruzsnavszky, O., Vincze, J., Berbey, C., Allard, B. and Csernoch, L. (2011). "Overexpression of transient receptor potential canonical type 1 (TRPC1) alters both store operated calcium entry and depolarization-evoked calcium signals in C2C12 cells." *Cell Calcium* **49**(6): 415-425.

Ong, H. L., Liu, X., Sharma, A., Hegde, R. S. and Ambudkar, I. S. (2007). "Intracellular Ca²⁺ release via the ER translocon activates store-operated calcium entry." *Pflugers Arch* **453**(6): 797-808.

Ong, H. L. and Ambudkar, I. S. (2017). "STIM-TRP Pathways and Microdomain Organization: Contribution of TRPC1 in Store-Operated Ca²⁺ Entry: Impact on Ca²⁺ Signaling and Cell Function." *Adv Exp Med Biol* **993**: 159-188.

Paget, J. (1874). "An Address Delivered at the Opening of the Section of Surgery." *Br Med J* **2**(711): 221-222.

Pandol, S. J. and Schoeffield-Payne, M. S. (1990). "Cyclic GMP regulates free cytosolic calcium in the pancreatic acinar cell." *Cell Calcium* **11**(7): 477-486.

Pani, B., Ong, H. L., Liu, X., Rauser, K., Ambudkar, I. S. and Singh, B. B. (2008). "Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated Ca²⁺ entry (SOCE)." *J Biol Chem* **283**(25): 17333-17340.

Paredes, R. M., Etzler, J. C., Watts, L. T., Zheng, W. and Lechleiter, J. D. (2008). "Chemical calcium indicators." *Methods* **46**(3): 143-151.

Parekh, A. B. and Penner, R. (1997). "Store depletion and calcium influx." Physiol Rev **77**(4): 901-930.

Parekh, A. B. and Putney, J. W., Jr. (2005). "Store-operated calcium channels." Physiol Rev **85**(2): 757-810.

Park, C. Y., Hoover, P. J., Mullins, F. M., Bachhawat, P., Covington, E. D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K. C., Dolmetsch, R. E. and Lewis, R. S. (2009). "STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1." Cell **136**(5): 876-890.

Park, M., Dean, M., Kaul, K., Braun, M. J., Gonda, M. A. and Vande Woude, G. (1987). "Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(18): 6379-6383.

Parkash, J. and Asotra, K. (2010). "Calcium wave signaling in cancer cells." Life Sci **87**(19-22): 587-595.

Parkinson, L. and Keast, R. (2014). "Oleocanthal, a phenolic derived from virgin olive oil: a review of the beneficial effects on inflammatory disease." Int J Mol Sci **15**(7): 12323-12334.

Patel, S., Marchant, J. S. and Brailoiu, E. (2010). "Two-pore channels: Regulation by NAADP and customized roles in triggering calcium signals." Cell Calcium **47**(6): 480-490.

Pei, T., Meng, Q., Han, J., Sun, H., Li, L., Song, R., Sun, B., Pan, S., Liang, D. and Liu, L. (2016). "(-)-Oleocanthal inhibits growth and metastasis by blocking activation of STAT3 in human hepatocellular carcinoma." Oncotarget **7**(28): 43475-43491.

Penna, A., Demuro, A., Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Safrina, O., Parker, I. and Cahalan, M. D. (2008). "The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers." Nature **456**(7218): 116-120.

Penniston, J. T. and Enyedi, A. (1998). "Modulation of the plasma membrane Ca²⁺ pump." J Membr Biol **165**(2): 101-109.

Periasamy, M. and Kalyanasundaram, A. (2007). "SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease." Muscle Nerve **35**(4): 430-442.

Peruzzi, B. and Bottaro, D. P. (2006). "Targeting the c-Met signaling pathway in cancer." Clin Cancer Res **12**(12): 3657-3660.

Pitt, J., Roth, W., Lacor, P., Smith, A. B., 3rd, Blankenship, M., Velasco, P., De Felice, F., Breslin, P. and Klein, W. L. (2009). "Alzheimer's-associated Abeta oligomers show altered structure, immunoreactivity and synaptotoxicity with low doses of oleocanthal." Toxicol Appl Pharmacol **240**(2): 189-197.

Pitt, S. C., Sippel, R. S. and Chen, H. (2009). "Contralateral papillary thyroid cancer: does size matter?" Am J Surg **197**(3): 342-347.

Pozo-Guisado, E., Campbell, D. G., Deak, M., Alvarez-Barrientos, A., Morrice, N. A., Alvarez, I. S., Alessi, D. R. and Martin-Romero, F. J. (2010). "Phosphorylation of STIM1 at

ERK1/2 target sites modulates store-operated calcium entry." *J Cell Sci* **123**(Pt 18): 3084-3093.

Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P. and Meldolesi, J. (1994). "Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores." *Physiol Rev* **74**(3): 595-636.

Prevarskaya, N., Skryma, R. and Shuba, Y. (2011). "Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors." *Nat Rev Cancer* **11**(8): 609-618.

Putney, J. W., Jr. (1986). "A model for receptor-regulated calcium entry." *Cell Calcium* **7**(1): 1-12.

Qosa, H., Batarseh, Y. S., Mohyeldin, M. M., El Sayed, K. A., Keller, J. N. and Kaddoumi, A. (2015). "Oleocanthal enhances amyloid-beta clearance from the brains of TgSwDI mice and in vitro across a human blood-brain barrier model." *ACS Chem Neurosci* **6**(11): 1849-1859.

Raghav, K. P., Wang, W., Liu, S., Chavez-MacGregor, M., Meng, X., Hortobagyi, G. N., Mills, G. B., Meric-Bernstam, F., Blumenschein, G. R., Jr. and Gonzalez-Angulo, A. M. (2012). "cMET and phospho-cMET protein levels in breast cancers and survival outcomes." *Clin Cancer Res* **18**(8): 2269-2277.

Redondo, P. C., Harper, M. T., Rosado, J. A. and Sage, S. O. (2006). "A role for cofilin in the activation of store-operated calcium entry by de novo conformational coupling in human platelets." *Blood* **107**(3): 973-979.

Reshetnikova, G., Troyanovsky, S. and Rimm, D. L. (2007). "Definition of a direct extracellular interaction between Met and E-cadherin." *Cell Biol Int* **31**(4): 366-373.

Rho, O., Kim, D. J., Kiguchi, K. and Digiovanni, J. (2011). "Growth factor signaling pathways as targets for prevention of epithelial carcinogenesis." *Mol Carcinog* **50**(4): 264-279.

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., Velicelebi, G. and Stauderman, K. A. (2005). "STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function." *J Cell Biol* **169**(3): 435-445.

Rosado, J. A. (2017). "Introduction: Overview of the Pathophysiological Implications of Store-Operated Calcium Entry in Mammalian Cells." *Adv Exp Med Biol* **993**: 391-395.

Rosado, J. A., Brownlow, S. L. and Sage, S. O. (2002). "Endogenously expressed TRP1 is involved in store-mediated Ca²⁺ entry by conformational coupling in human platelets." *J Biol Chem* **277**(44): 42157-42163.

Rosado, J. A., Díez, R., Smani, T. and Jardin, I. (2015). "STIM and Orai1 Variants in Store-Operated Calcium Entry." *Front Pharmacol* **6**: 325.

Rosado, J. A., Jenner, S. and Sage, S. O. (2000). "A role for the actin cytoskeleton in the initiation and maintenance of store-mediated calcium entry in human platelets. Evidence for conformational coupling." *J Biol Chem* **275**(11): 7527-7533.

Rosado, J. A. and Sage, S. O. (2000). "Regulation of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by small GTPases and phosphoinositides in human platelets." *J Biol Chem* **275**(26): 19529-19535.

Rosado, J. A. and Sage, S. O. (2001). "Activation of store-mediated calcium entry by secretion-like coupling between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type II and human transient receptor potential (hTRP1) channels in human platelets." *Biochem J* **356**(Pt 1): 191-198.

Rosignoli, P., Fuccelli, R., Fabiani, R., Servili, M. and Morozzi, G. (2013). "Effect of olive oil phenols on the production of inflammatory mediators in freshly isolated human monocytes." *J Nutr Biochem* **24**(8): 1513-1519.

Rothberg, B. S., Wang, Y. and Gill, D. L. (2013). "Orai channel pore properties and gating by STIM: implications from the Orai crystal structure." *Sci Signal* **6**(267): pe9.

Rowley, J. D. (1973). "Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining." *Nature* **243**(5405): 290-293.

Sabbioni, S., Barbanti-Brodano, G., Croce, C. M. and Negrini, M. (1997). "GOK: a gene at 11p15 involved in rhabdomyosarcoma and rhabdoid tumor development." *Cancer Res* **57**(20): 4493-4497.

Sage, S. O., Merritt, J. E., Hallam, T. J. and Rink, T. J. (1989). "Receptor-mediated calcium entry in fura-2-loaded human platelets stimulated with ADP and thrombin. Dual-wavelengths studies with Mn^{2+} ." *Biochem J* **258**(3): 923-926.

Saito, H., Minamiya, Y., Watanabe, H., Takahashi, N., Ito, M., Toda, H., Konno, H., Mitsui, M., Motoyama, S. and Ogawa, J. (2011). "Expression of the transient receptor potential channel C3 correlates with a favorable prognosis in patients with adenocarcinoma of the lung." *Ann Surg Oncol* **18**(12): 3377-3383.

Sakorafas, G. H. (2001). "Breast cancer surgery--historical evolution, current status and future perspectives." *Acta Oncol* **40**(1): 5-18.

Salido, G. M., Jardin, I. and Rosado, J. A. (2011). "The TRPC ion channels: association with Orai1 and STIM1 proteins and participation in capacitative and non-capacitative calcium entry." *Adv Exp Med Biol* **704**: 413-433.

Sargeant, P., Farndale, R. W. and Sage, S. O. (1993). "ADP- and thapsigargin-evoked Ca^{2+} entry and protein-tyrosine phosphorylation are inhibited by the tyrosine kinase inhibitors genistein and methyl-2,5-dihydroxycinnamate in fura-2-loaded human platelets." *J Biol Chem* **268**(24): 18151-18156.

Scotece, M., Gomez, R., Conde, J., Lopez, V., Gomez-Reino, J. J., Lago, F., Smith, A. B., 3rd and Gualillo, O. (2012). "Further evidence for the anti-inflammatory activity of oleocanthal: inhibition of MIP-1alpha and IL-6 in J774 macrophages and in ATDC5 chondrocytes." *Life Sci* **91**(23-24): 1229-1235.

Scotece, M., Gomez, R., Conde, J., Lopez, V., Gomez-Reino, J. J., Lago, F., Smith, A. B., 3rd and Gualillo, O. (2013). "Oleocanthal inhibits proliferation and MIP-1alpha expression in human multiple myeloma cells." *Curr Med Chem* **20**(19): 2467-2475.

Scrimgeour, N., Litjens, T., Ma, L., Barritt, G. J. and Rychkov, G. Y. (2009). "Properties of Orai1 mediated store-operated current depend on the expression levels of STIM1 and Orai1 proteins." J Physiol **587**(Pt 12): 2903-2918.

Shi, Y., Ding, X., He, Z. H., Zhou, K. C., Wang, Q. and Wang, Y. Z. (2009). "Critical role of TRPC6 channels in G2 phase transition and the development of human oesophageal cancer." Gut **58**(11): 1443-1450.

Shuttleworth, T. J., Thompson, J. L. and Mignen, O. (2007). "STIM1 and the noncapacitative ARC channels." Cell Calcium **42**(2): 183-191.

Sierra, J. R. and Tsao, M. S. (2011). "c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer." Ther Adv Med Oncol **3**(1 Suppl): S21-35.

Simmerman, H. K. and Jones, L. R. (1998). "Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function." Physiol Rev **78**(4): 921-947.

Singh, B. B., Liu, X., Tang, J., Zhu, M. X. and Ambudkar, I. S. (2002). "Calmodulin regulates Ca²⁺-dependent feedback inhibition of store-operated Ca²⁺ influx by interaction with a site in the C terminus of TRPC1." Mol Cell **9**(4): 739-750.

Sinkins, W. G., Estacion, M. and Schilling, W. P. (1998). "Functional expression of TRPC1: a human homologue of the *Drosophila* TRP channel." Biochem J **331** (Pt 1): 331-339.

Smani, T., Shapovalov, G., Skryma, R., Prevarskaya, N., Rosado, J. A. (2015). "Functional and physiopathological implications of TRP channels." Biochim Biophys Acta **1853**(8):1772-1782.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.

Smyth, J. T., Petranka, J. G., Boyles, R. R., DeHaven, W. I., Fukushima, M., Johnson, K. L., Williams, J. G. and Putney, J. W., Jr. (2009). "Phosphorylation of STIM1 underlies suppression of store-operated calcium entry during mitosis." Nat Cell Biol **11**(12): 1465-1472.

Soboloff, J., Spassova, M. A., Tang, X. D., Hewavitharana, T., Xu, W. and Gill, D. L. (2006). "Orai1 and STIM1 reconstitute store-operated calcium channel function." J Biol Chem **281**(30): 20661-20665.

Sobradillo, D., Hernandez-Morales, M., Ubierna, D., Moyer, M.P., Nunez, L. and Villalobos, C. (2014). "A reciprocal shift in transient receptor potential channel 1 (TRPC1) and stromal interaction molecule 2 (STM2) contributes to Ca²⁺ remodeling and cancer hallmarks in colorectal carcinoma cells." J Biol Chem **289**(42):28765-28782.

Spassova, M. A., Soboloff, J., He, L. P., Xu, W., Dziadek, M. A. and Gill, D. L. (2006). "STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca²⁺ channels." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(11): 4040-4045.

Sporikova, Z., Koudelakova, V., Trojanec, R. and Hajduch, M. (2018). "Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer." Clin Breast Cancer **18**(5): e841-e850.

- Srikanth, S., Jung, H. J., Ribalet, B. and Gwack, Y. (2010). "The intracellular loop of Orai1 plays a central role in fast inactivation of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels." J Biol Chem **285**(7): 5066-5075.
- Stanisz, H., Saul, S., Muller, C. S., Kappl, R., Niemeyer, B. A., Vogt, T., Hoth, M., Roesch, A. and Bogeski, I. (2014). "Inverse regulation of melanoma growth and migration by Orai1/STIM2-dependent calcium entry." Pigment Cell Melanoma Res **27**(3): 442-453.
- Stanisz, H., Vultur, A., Herlyn, M., Roesch, A. and Bogeski, I. (2016). "The role of Orai-STIM calcium channels in melanocytes and melanoma." J Physiol **594**(11): 2825-2835.
- Stathopoulos, P. B. and Ikura, M. (2013). "Structure and function of endoplasmic reticulum STIM calcium sensors." Curr Top Membr **71**: 59-93.
- Stathopoulos, P. B., Li, G. Y., Plevin, M. J., Ames, J. B. and Ikura, M. (2006). "Stored Ca²⁺ depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca²⁺ entry." J Biol Chem **281**(47): 35855-35862.
- Stathopoulos, P. B., Zheng, L. and Ikura, M. (2009). "Stromal interaction molecule 1 (STIM 1) and STIM2 calcium sensing regions exhibit distinct unfolding and oligomerization kinetics." J Biol Chem **284**(2): 728-732.
- Streb, H., Irvine, R. F., Berridge, M. J. and Schulz, I. (1983). "Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate." Nature **306**(5938): 67-69.
- Strehler, E. E. and Zacharias, D. A. (2001). "Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps." Physiol Rev **81**(1): 21-50.
- Sun, S., Li, W., Zhang, H., Zha, L., Xue, Y., Wu, X. and Zou, F. (2012). "Requirement for store-operated calcium entry in sodium butyrate-induced apoptosis in human colon cancer cells." Biosci Rep **32**(1): 83-90.
- Sun, X., Wei, Q., Cheng, J., Bian, Y., Tian, C., Hu, Y. and Li, H. (2017). "Enhanced Stim1 expression is associated with acquired chemo-resistance of cisplatin in osteosarcoma cells." Hum Cell **30**(3): 216-225.
- Tajeddine, N. and Gailly, P. (2012). "TRPC1 protein channel is major regulator of epidermal growth factor receptor signaling." J Biol Chem **287**(20): 16146-16157.
- Takahashi, Y., Murakami, M., Watanabe, H., Hasegawa, H., Ohba, T., Munehisa, Y., Nobori, K., Ono, K., Iijima, T. and Ito, H. (2007). "Essential role of the N-terminus of murine Orai1 in store-operated Ca²⁺ entry." Biochem Biophys Res Commun **356**(1): 45-52.
- Tang, J., Lin, Y., Zhang, Z., Tikunova, S., Birnbaumer, L. and Zhu, M. X. (2001). "Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels." J Biol Chem **276**(24): 21303-21310.
- Taylor, C. W. and Richardson, A. (1991). "Structure and function of inositol trisphosphate receptors." Pharmacol Ther **51**(1): 97-137.

Thastrup, O., Dawson, A. P., Scharff, O., Foder, B., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Bjerrum, P. J., Christensen, S. B. and Hanley, M. R. (1989). "Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage." *Agents Actions* **27**(1-2): 17-23.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350-4354.

Toyoshima, C. (2008). "Structural aspects of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum." *Arch Biochem Biophys* **476**(1): 3-11.

Trebak, M. (2010). "The puzzling role of TRPC3 channels in motor coordination." *Pflugers Arch* **459**(3): 369-375.

Trebak, M., Vazquez, G., Bird, G. S. and Putney, J. W., Jr. (2003). "The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels." *Cell Calcium* **33**(5-6): 451-461.

Tresguerres, J. A. F., Ed. (1992). *Fisiología Humana*. Madrid, McGraw-Hill Interamericana de España.

Trusolino, L., Bertotti, A. and Comoglio, P. M. (2010). "MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(12): 834-848.

Tsai, F. C., Seki, A., Yang, H. W., Hayer, A., Carrasco, S., Malmersjo, S. and Meyer, T. (2014). "A polarized Ca²⁺, diacylglycerol and STIM1 signalling system regulates directed cell migration." *Nat Cell Biol* **16**(2): 133-144.

Umemura, M., Baljinnyam, E., Feske, S., De Lorenzo, M. S., Xie, L. H., Feng, X., Oda, K., Makino, A., Fujita, T., Yokoyama, U., Iwatsubo, M., Chen, S., Goydos, J. S., Ishikawa, Y. and Iwatsubo, K. (2014). "Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) regulates melanoma proliferation and cell migration." *PLoS One* **9**(2): e89292.

Ustyugova, I. V., Frost, L. L., Van Dyke, K., Brundage, K. M., Schafer, R. and Barnett, J. B. (2007). "3,4-dichloropropionaniline suppresses normal macrophage function." *Toxicol Sci* **97**(2): 364-374.

Vazquez, G., Wedel, B. J., Aziz, O., Trebak, M. and Putney, J. W., Jr. (2004). "The mammalian TRPC cation channels." *Biochim Biophys Acta* **1742**(1-3): 21-36.

Vig, M., Beck, A., Billingsley, J. M., Lis, A., Parvez, S., Peinelt, C., Koomoa, D. L., Soboloff, J., Gill, D. L., Fleig, A., Kinet, J. P. and Penner, R. (2006). "CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel." *Curr Biol* **16**(20): 2073-2079.

Vougogiannopoulou, K., Lemus, C., Halabalaki, M., Pergola, C., Werz, O., Smith, A. B., 3rd, Michel, S., Skaltsounis, L. and Deguin, B. (2014). "One-step semisynthesis of oleacein and the determination as a 5-lipoxygenase inhibitor." *J Nat Prod* **77**(3): 441-445.

Vuoriluoto, K., Haugen, H., Kiviluoto, S., Mpindi, J. P., Nevo, J., Gjerdrum, C., Tiron, C., Lorens, J. B. and Ivaska, J. (2011). "Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer." *Oncogene* **30**(12): 1436-1448.

- Wang, Y., Deng, X., Hewavitharana, T., Soboloff, J. and Gill, D. L. (2008). "STIM, Orai and TRPC channels in the control of calcium entry signals in smooth muscle." Clin Exp Pharmacol Physiol **35**(9): 1127-1133.
- Wang, Y., Deng, X., Mancarella, S., Hendron, E., Eguchi, S., Soboloff, J., Tang, X. D. and Gill, D. L. (2010). "The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels." Science **330**(6000): 105-109.
- Wang, Y., Deng, X., Zhou, Y., Hendron, E., Mancarella, S., Ritchie, M. F., Tang, X. D., Baba, Y., Kurosaki, T., Mori, Y., Soboloff, J. and Gill, D. L. (2009). "STIM protein coupling in the activation of Orai channels." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(18): 7391-7396.
- Wes, P. D., Chevesich, J., Jeromin, A., Rosenberg, C., Stetten, G. and Montell, C. (1995). "TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9652-9656.
- Williams, M. R., Riach, R. A., Collison, D. J. and Duncan, G. (2001). "Role of the endoplasmic reticulum in shaping calcium dynamics in human lens cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(5): 1009-1017.
- Woodard, G. E., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2008). "Enhanced exocytotic-like insertion of Orai1 into the plasma membrane upon intracellular Ca²⁺ store depletion." Am J Physiol Cell Physiol **294**(6): C1323-1331.
- Worley, P. F., Zeng, W., Huang, G. N., Yuan, J. P., Kim, J. Y., Lee, M. G. and Muallem, S. (2007). "TRPC channels as STIM1-regulated store-operated channels." Cell Calcium **42**(2): 205-211.
- Wuytack, F., Raeymaekers, L., De Smedt, H., Eggermont, J. A., Missiaen, L., Van Den Bosch, L., De Jaegere, S., Verboomen, H., Plessers, L. and Casteels, R. (1992). "Ca²⁺-transport ATPases and their regulation in muscle and brain." Ann N Y Acad Sci **671**: 82-91.
- Xia, J., Pan, R., Gao, X., Meucci, O. and Hu, H. (2014). "Native store-operated calcium channels are functionally expressed in mouse spinal cord dorsal horn neurons and regulate resting calcium homeostasis." J Physiol **592**(16): 3443-3461.
- Xie, Y. C., Schafer, R. and Barnett, J. B. (1997). "The immunomodulatory effects of the herbicide propanil on murine macrophage interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production." Toxicol Appl Pharmacol **145**(1): 184-191.
- Xu, S. Z. and Beech, D. J. (2001). "TRPC1 is a membrane-spanning subunit of store-operated Ca²⁺ channels in native vascular smooth muscle cells." Circ Res **88**(1): 84-87.
- Yanamandra, N., Buzzeo, R. W., Gabriel, M., Hazlehurst, L. A., Mari, Y., Beaupre, D. M. and Cuevas, J. (2011). "Tipifarnib-induced apoptosis in acute myeloid leukemia and multiple myeloma cells depends on Ca²⁺ influx through plasma membrane Ca²⁺ channels." J Pharmacol Exp Ther **337**(3): 636-643.
- Yang, N., Tang, Y., Wang, F., Zhang, H., Xu, D., Shen, Y., Sun, S. and Yang, G. (2013). "Blockade of store-operated Ca²⁺ entry inhibits hepatocarcinoma cell migration and invasion by regulating focal adhesion turnover." Cancer Lett **330**(2): 163-169.

Yang, S., Zhang, J. J. and Huang, X. Y. (2009). "Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis." Cancer Cell **15**(2): 124-134.

Yao, Y., Ferrer-Montiel, A. V., Montal, M. and Tsien, R. Y. (1999). "Activation of store-operated Ca^{2+} current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger." Cell **98**(4): 475-485.

Young, K. W., Bootman, M. D., Channing, D. R., Lipp, P., Maycox, P. R., Meakin, J., Challiss, R. A. and Nahorski, S. R. (2000). "Lysophosphatidic acid-induced Ca^{2+} mobilization requires intracellular sphingosine 1-phosphate production. Potential involvement of endogenous EDG-4 receptors." J Biol Chem **275**(49): 38532-38539.

Yuan, J. P., Zeng, W., Dorwart, M. R., Choi, Y. J., Worley, P. F. and Muallem, S. (2009). "SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels." Nat Cell Biol **11**(3): 337-343.

Yuan, J. P., Zeng, W., Huang, G. N., Worley, P. F. and Muallem, S. (2007). "STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels." Nat Cell Biol **9**(6): 636-645.

Zanou, N., Shapovalov, G., Louis, M., Tajeddine, N., Gallo, C., Van Schoor, M., Anguish, I., Cao, M. L., Schakman, O., Dietrich, A., Lebacqz, J., Ruegg, U., Roulet, E., Birnbaumer, L. and Gailly, P. (2010). "Role of TRPC1 channel in skeletal muscle function." Am J Physiol Cell Physiol **298**(1): C149-162.

Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Stauderman, K. A. and Cahalan, M. D. (2005). "STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane." Nature **437**(7060): 902-905.

Zhang, X., Zhang, W., Gonzalez-Cobos, J. C., Jardin, I., Romanin, C., Matrougui, K. and Trebak, M. (2014). "Complex role of STIM1 in the activation of store-independent Orai1/3 channels." J Gen Physiol **143**(3): 345-359.

Zhu, M. X., Ma, J., Parrington, J., Galione, A. and Evans, A. M. (2010). "TPCs: Endolysosomal channels for Ca^{2+} mobilization from acidic organelles triggered by NAADP." FEBS Lett **584**(10): 1966-1974.

Zhu, X., Chu, P. B., Peyton, M. and Birnbaumer, L. (1995). "Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* TRP gene." FEBS Lett **373**(3): 193-198.

Zhu, X., Jiang, M., Peyton, M., Boulay, G., Hurst, R., Stefani, E. and Birnbaumer, L. (1996). "TRP, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry." Cell **85**(5): 661-671.