



---

**Universidad de Valladolid**

**Salicilato y antiinflamatorios no  
esteroideos inhiben la entrada de calcio y  
la proliferación de células de  
adenocarcinoma de páncreas**

**AUTOR: JESÚS PEÑA LÓPEZ**

**COAUTOR: JUAN PIÑEYROA GIGOSOS**

**TUTORES: CARLOS VILLALOBOS Y LUCÍA NÚÑEZ LLORENTE**

---

**Trabajo Fin de Grado de Medicina**

**CURSO 2017-2018**



## RESUMEN

El adenocarcinoma de páncreas (neoplasia maligna más frecuente en este órgano) presenta muy mal pronóstico con una supervivencia a los 5 años del 5% y un repertorio terapéutico limitado solo siendo el 20% de los pacientes candidatos a la cirugía (única técnica curativa). Estudios epidemiológicos correlacionan el consumo de aspirina y otros AINEs con una menor incidencia de diferentes tipos de cáncer, entre ellos el de páncreas. El mecanismo clásico antiinflamatorio de estos fármacos no explica este fenómeno por lo que se propone la hipótesis de que el salicilato inhibe la proliferación de las células tumorales inhibiendo parcialmente la entrada capacitativa del calcio (SOCE), principal vía de entrada de calcio al citosol en células no excitables. Esta inhibición se realizaría a través de un efecto desacoplante mitocondrial disipando el potencial electroquímico de la membrana mitocondrial interna lo que inhibiría la capacidad de la mitocondria de aclarar los incrementos de calcio favoreciendo la inactivación de los canales de calcio implicados en SOCE. Se propone la entrada capacitativa de calcio como nueva diana terapéutica ya que se ha demostrado que en el cáncer se produce una alteración de la homeostasis del calcio intracelular (remodelado).

En este trabajo se estudia el efecto del FCCP (desacoplante mitocondrial conocido), salicilato y sulindac en la proliferación de la línea celular Panc-1. Para comprobar el posible efecto sobre SOCE sobre estos fármacos se realizan estudios de imagen de calcio citosólico por fluorescencia. Los resultados obtenidos demuestran que el FCCP, salicilato y sulindac tienen un efecto antiproliferativo e inhibidor de SOCE. Por tanto, ambos experimentos apoyan la hipótesis de que la entrada capacitativa de calcio es una nueva diana terapéutica frente al cáncer de páncreas. Serían necesarios más estudios en esta línea para poder contemplar las posibilidades de traslación a la clínica.

### **Palabras clave:**

Salicilato, Sulindac, Calcio, SOCE, Adenocarcinoma de páncreas, Mitocondria.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN .....	1
Cáncer de páncreas.....	1
Efecto quimioprotector de los AINEs.....	2
Entrada capacitativa del calcio.....	4
Papel del salicilato y otros AINEs en la mitocondria .....	6
OBJETIVOS .....	7
MATERIAL .....	7
Células .....	7
Medios .....	7
Agonistas .....	8
Sondas.....	8
Microscopio.....	8
MÉTODOS .....	9
Proliferación celular.....	9
Registro de imagen de calcio citosólico .....	9
Análisis estadístico.....	11
RESULTADOS.....	12
Entrada capacitativa de calcio .....	14
Proliferación .....	12
DISCUSIÓN .....	16
CONCLUSIONES.....	18
AGRADECIMIENTOS .....	18
BIBLIOGRAFÍA .....	19
ANEXO.....	22
Recursos audiovisuales .....	22
Presentación TFG: Póster.....	23

## INTRODUCCIÓN

### A) CÁNCER DE PÁNCREAS

---

El cáncer de páncreas es la cuarta causa de muerte por cáncer en Europa (1). Se estima una incidencia anual de 6,5 casos por cada 100.000 y la esperanza de vida a los 5 años ronda el 5% (2). En España las cifras son similares siendo el séptimo cáncer en incidencia, pero el tercero en mortalidad (3).

Los principales factores de riesgo para desarrollar cáncer de páncreas son el tabaco (RR~2) y la edad (la incidencia se incrementa a partir de los 65 años). También se ha relacionado con la obesidad, la pancreatitis crónica, la diabetes mellitus... Menos del 10% se deben a mutaciones en la línea germinal heredadas, siendo BRCA2 probablemente el gen más frecuentemente alterados en casos de cáncer pancreático familiar (1).

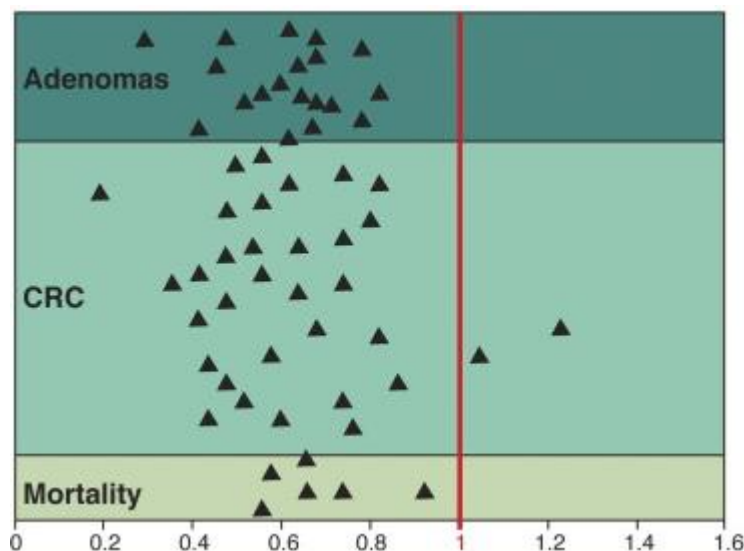
El adenocarcinoma ductal de páncreas constituye la neoplasia pancreática más frecuente (~80%). Se caracteriza por producir una intensa reacción estromal que se piensa que puede actuar como barrera contra la quimioterapia (1).

La clínica suele ser tardía e inespecífica y consiste en pérdida de peso, ictericia y abdominalgia. Los tumores localizados en la cabeza (~60%) pueden producir clínica precoz por efecto masa (1).

La resección quirúrgica es el único tratamiento curativo para esta enfermedad. Sin embargo, solo el 15-20% de los pacientes son candidatos a pancreatectomía debido a que esta enfermedad suele detectarse en estadios avanzados que contraindican la cirugía (presencia de metástasis, invasión de vasos...). La alternativa en esos casos es la quimioterapia con 5-FU, leucovorina, oxaliplatino e irinotecan (FOLFIRINOX) con una mediana de supervivencia global de 11 meses (frente a los 6 meses del antiguo tratamiento con gemcitabina) (1).

## B) EFECTO QUIMIOPROTECTOR DE LOS AINES

La primera prueba de que los AINEs (antiinflamatorios no esteroideos) podrían tener un efecto quimioprotector en el cáncer surge de forma casual en un estudio de casos y controles en 1988 que exploraba el riesgo de CRC (carcinoma colorrectal) con múltiples medicamentos y enfermedades (4). A partir de ahí, el efecto oncoprotector de los AINEs ha sido confirmado en humanos a partir de múltiples estudios observacionales como se observa en la Figura 1 que refleja los resultados de un metaanálisis de 59 estudios entre 1988 y 2006 en los que 57 muestran una disminución de la incidencia de adenomas, de CRC y de la mortalidad producida por estas patologías (5).



**Figura 1.** Riesgo relativo de neoplasia colorrectal en individuos usando aspirina, AINEs e inhibidores COX2 (5).

También existen ensayos clínicos que avalan este hecho. Por ejemplo, el CAPP2 fue un ensayo clínico en el que se comparó el consumo de aspirina a largo plazo con placebo en pacientes portadores de la mutación del síndrome de Lynch. El resultado fue que el consumo crónico de aspirina reduce la incidencia de cáncer colorrectal (6). También se ha comprobado que el sulindac es capaz de inducir una regresión del número y tamaño de pólipos neoplásicos en pacientes con PAF (poliposis adenomatosa familiar). Sin embargo, los autores concluyen que este efecto es incompleto y no puede sustituir al tratamiento quirúrgico (7).

La U.S. Preventive Services Task Force (USPSTF) elaboró tres revisiones sistemáticas con el objetivo de evaluar los riesgos y beneficios del uso de aspirina. Recomienda, con un grado de evidencia B, el uso de bajas dosis para la profilaxis primaria de la enfermedad cardiovascular en adultos de 50-59 años con riesgo cardiovascular elevado lo que también produce un beneficio en la disminución del cáncer colorrectal (8).

De un metanálisis de 8 ensayos clínicos que comparan consumo de aspirina con no consumo, se deduce que el consumo de aspirina disminuye la incidencia y la mortalidad del CRC y de otros tumores sólidos, entre ellos el cáncer de páncreas (9). Un estudio de 761 casos y 794 controles realizado en Sanghai con un seguimiento de 5 años muestra que el uso crónico de aspirina se asocia con un menor riesgo de cáncer pancreático (OR=0,54; 95%). Los autores realizan una estimación resumida de toda la literatura disponible obteniendo una OR=0,83±0,05 (bajas dosis OR=0,85±0,10) (10).

El mecanismo de acción responsable de los efectos antitumorales, antiproliferativos y/o proapoptóticos de los AINEs no se conoce con seguridad. En principio se podría plantear que se debe a su mecanismo más conocido, la inhibición de COX-1 o COX-2 interfiriendo con la síntesis de prostaglandinas. Esta hipótesis se podría apoyar en datos como la existencia de niveles elevados de prostaglandina E2 o de sobreexpresión de COX-2 en el cáncer de colon (11). Sin embargo, numerosos estudios sugieren que al menos parte de los efectos antitumorales son independientes de COX:

- El salicilato, principal metabolito de la aspirina, carece de grupo acetilo por lo que no inhibe COX-1 ni COX-2. Sin embargo, se ha propuesto que puede actuar inhibiendo la expresión de COX-2 (se plantea si puede ser a través de NFκB) (12).
- Análogos estructurales de AINEs que carecen de la capacidad de inhibir COX-1 o COX-2 como el enantiómero R-Flurbiprofeno pueden inhibir el crecimiento de células tumorales (13).
- Sulindac inhibe el crecimiento y promueve la apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon que carecen de COX-2 como HCT-15 (cáncer de colon) o en melanoma (14).

### C) ENTRADA CAPACITATIVA DEL CALCIO

---

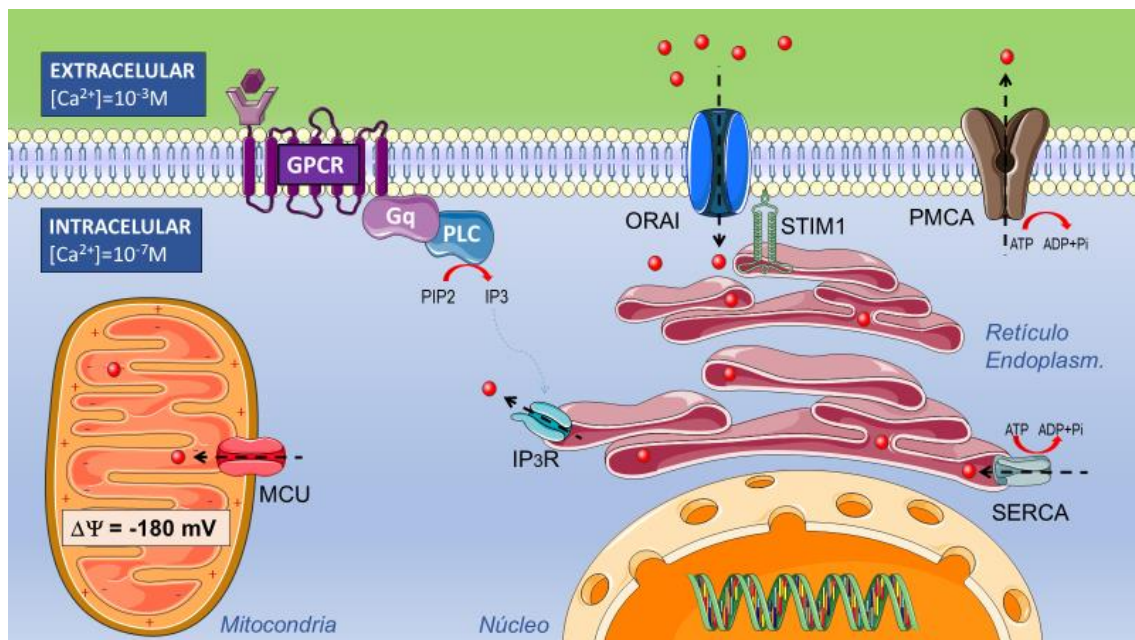
El ion calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ejerce funciones como segundo mensajero involucrándose en el control de diferentes procesos fisiológicos (15). A diferencia de otros segundos mensajeros, no se sintetiza o metaboliza en el interior de las células, sino que se regula por su transporte a través de canales específicos o bombas situados en la membrana plasmática o endomembranas de orgánulos como el retículo endoplasmático (RE) o la mitocondria. La concentración citoplasmática de calcio ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) es muy baja ( $10^{-7}\text{M}$ ) de manera que pequeños cambios en la conductancia de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  produce rápidos cambios. Esta baja concentración se consigue gracias a la acción de bombas que, mediante el consumo de ATP, expulsan  $\text{Ca}^{2+}$  al lumen del RE (SERCA) o al espacio extracelular (PMCA) donde en ambos casos las concentraciones son mayores ( $10^{-7}\text{M}$ ) (16).

Existen diversas vías de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (canales operados por voltaje, operados por receptor, acoplados a proteínas G, sensibles a estímulos mecánicos...) pero la entrada capacitativa del calcio, ilustrada en la figura 2, supone la vía de entrada más importante en células no excitables. También se denomina "*store operated calcium entry*" (SOCE) porque se activa con el vaciado de los depósitos intracelulares de calcio (principalmente el RE) (17). Este proceso puede ocurrir por la llegada de un estímulo a la célula (ej: hormona) que inicia una cascada de transducción de señales.

Recientemente se han descrito las proteínas implicadas en la activación de la entrada capacitativa de calcio, principalmente proteínas de la familia STIM (*stromal interaction molecule*) y ORAI. STIM1 es una proteína transmembrana situada en el RE que detecta una disminución de los niveles luminales de  $\text{Ca}^{2+}$  por debajo de  $200\mu\text{M}$  (a través de un dominio mano EF) sufriendo un cambio de conformación que induce su oligomerización (18). Los oligómeros de STIM interactúan con el receptor de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática ORAI1 produciendo su apertura y, por tanto, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el espacio extracelular al citoplasma. Esta corriente que puede ser detectada mediante técnicas electrofisiológicas se denomina  $I_{\text{CRAC}}$  (19).



En condiciones normales existe un mecanismo de control de SOCE de manera que el exceso de la  $[Ca^{2+}]_c$  inactiva el canal ORAI1. Sin embargo, estos incrementos locales de la  $[Ca^{2+}]_c$  pueden activar el uniportador mitocondrial de  $Ca^{2+}$  (MCU) en mitocondrias próximas provocando la entrada de calcio a la mitocondria y, por tanto, tamponar dicho exceso manteniendo abierto ORAI1. Aunque la concentración de  $Ca^{2+}$  en la matriz mitocondrial es similar a la del citoplasma, el  $Ca^{2+}$  fluye al interior de la mitocondria a favor del gradiente electroquímico. Esto se debe a que, en el interior de la membrana mitocondrial interna, existe un intenso potencial negativo ( $\Delta\Psi = -180\text{mV}$ ) producto del bombeo de protones ( $H^+$ ) al espacio intermembranoso durante el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial (19).



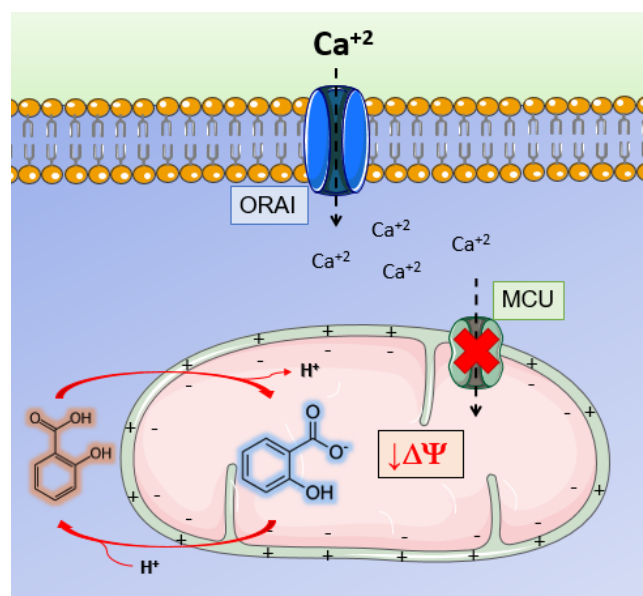
**Figura 2.** Entrada capacitativa del calcio (SOCE). Interacción entre la membrana plasmática, el retículo endoplasmático y la mitocondria.

Por tanto, la mitocondria puede tener un papel esencial en el mantenimiento de señales de  $Ca^{2+}$  iniciadas por SOCE. El aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  promueve actividades celulares como la proliferación o la migración siendo este mecanismo estudiado en primer lugar en el proceso de activación de los linfocitos T (20). Sin embargo, también se ha detectado que en el cáncer se producen cambios en la homeostasis del  $Ca^{2+}$  intracelular (remodelado) y que podrían contribuir en la aparición del fenotipo tumoral caracterizado por las “cancer hallmarks” (19). Por ejemplo, existe sobreexpresión de ORAI1 en el carcinoma microcítico de pulmón (21), en el carcinoma gástrico (22) o en el carcinoma escamoso esofágico (23).

Otra hipótesis sería que el aumento de SOCE también podría deberse en parte a la mayor negatividad del potencial mitocondrial como consecuencia del efecto Warburg que hace que no se consuma potencial mitocondrial en la síntesis de ATP al estar desviado el metabolismo a la glucólisis. De este modo, la mitocondria de la célula neoplásica actuaría como un sumidero masivo de  $\text{Ca}^{2+}$  que mantiene la corriente  $I_{\text{CRAC}}$  (25).

#### D) PAPEL DEL SALICILATO Y OTROS AINES EN LA MITOCONDRIA

El ácido salicílico (principal metabolito de la aspirina) ejerce una moderada función desacoplante mitocondrial (24) como se ilustra en la figura 3. Se introduce en la matriz mitocondrial a favor del gradiente químico. Ahí, el pH básico favorece su disociación a salicilato que debería quedar atrapado por tener una carga eléctrica. Sin embargo, la carga negativa del grupo carboxilo se deslocaliza en el anillo aromático permitiendo la salida al citosol donde capta un protón. El resultado neto de este ciclo es la despolarización de la mitocondrial y la disminución de la fuerza electromotriz que induce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (19). Esto produce la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  cerca de los canales ORAI1 favoreciendo su inactivación. Otros AINEs como el sulindac también se comportan como desacoplantes mitocondriales de forma incluso más potente (25). Por tanto, estos fármacos funcionarían como bloqueantes de la captación de calcio mitocondrial.



**Figura 3.** Papel del ácido salicílico en la modulación de SOCE. Disminución del potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) como consecuencia de su difusión y desprotonación en la matriz mitocondrial. Se produce una disminución del gradiente que promueve la entrada de calcio al interior de la mitocondria. En consecuencia, se produce una acumulación de calcio cerca de los canales ORAI.

Se ha comprobado que moléculas con acción desacoplante mitocondrial como el FCCP (Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona) interfieren con SOCE (25) lo que pone de manifiesto la función reguladora de la mitocondria.

## OBJETIVOS

- Demostrar la inhibición in vitro de la proliferación celular del adenocarcinoma de páncreas con el uso despolarizantes de la membrana mitocondrial y AINEs.
- Demostrar la inhibición de SOCE con el uso de despolarizantes de la membrana mitocondrial y AINEs en el adenocarcinoma de páncreas.

## MATERIAL

### A) CÉLULAS:

---

PANC1 → Línea celular establecida a partir de adenocarcinoma ductalobtenido de un hombre caucásico de 56 años. Su cariotipo es hipertriploide (26). Se cultivaron en frascos de cultivo NUNC a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 10%. La línea celular fue cedida por la Dra. Maite Iglesias Badiola de la Universidad Francisco de Vitoria de Madrid.

La línea celular se subcultivó una vez por semana lavando con PBS (phosphate buffered saline), incubando 4 min con tripsina-EDTA, centrifugando a 1200g durante 4 min y resuspendiendo en medio de proliferación. La proliferación celular fue controlada en cada subcultivo mediante conteo celular en una cámara de Neubauer.

### B) MEDIOS:

---

- a) Proliferación → DMEM + FBS 10%: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) con glucosa 1g/L y suplementado con: FBS (*Fetal bovine serum*) 10 %, L-glutamina 1%, Penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 µg/mL.
- b) MEC (Medio externo completo):
  - MEC Ca1 → NaCl 145 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, Glucosa 10 mM, 10 HEPES/NaOH Ph 7.42.
  - MEC Ca0 → MEC Ca1 + EGTA 0,5M en TRIS-HCL

### C) AGONISTAS:

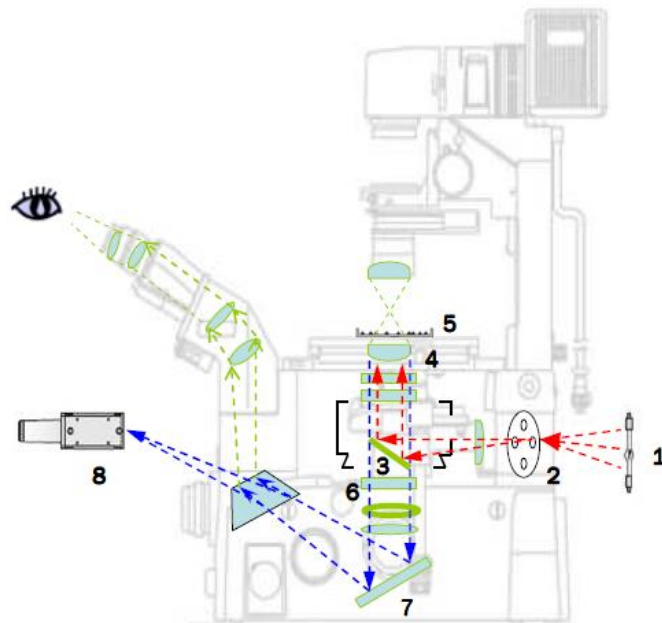
- a) AINEs: Salicilato 500 $\mu$ M y Sulindac 1-10-100 $\mu$ M
- b) FCCP 1-10-100 $\mu$ M
- c) Tapsigargina 1 $\mu$ M (Inhibidor suicida SERCA – Activa SOCE)

### D) SONDAS:

- FURA-2/AM → Indicador fluorescente de la concentración de calcio.

### E) MICROSCOPIO:

- a) Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Tokio, Japón) → Microscopio invertido empleado para contar número de células en la cámara de Neubauer.
- b) Zeiss S100TV → Microscopio de fluorescencia invertido empleado en experimentos de imagen citosólica de calcio. Equipado con una cámara de imagen de fluorescencia Hamamatsy, ruedas de filtros de excitación y emisión y sistema de perfusión (se ilustra en la figura 4).



**Figura 4.** Representación del equipo de imagen de fluorescencia empleado para los experimentos de determinación de  $[Ca^{2+}]_c$ . (1) Lámpara de xenón (Zeiss X-Cite Series 120), (2) Rueda que alterna filtros monocromados de excitación ( $\lambda=340$  y  $380$ nm), (3) Espejo dicroico inclinado  $45^\circ$ , (4) Objetivo de inmersión 40x, (5) Cámara termostatzada con células que posee sistema de perfusión continuo (Warner Instruments, Hamden CT), (6) Espejo dicroico que refleja  $\lambda > 520$ nm, (7) Filtro de emisión ( $\lambda=520$ nm) y (8) Cámara de adquisición de imágenes (ORCA-ER de Hamamatsu Photonics).

## MÉTODOS

### A) PROLIFERACIÓN CELULAR

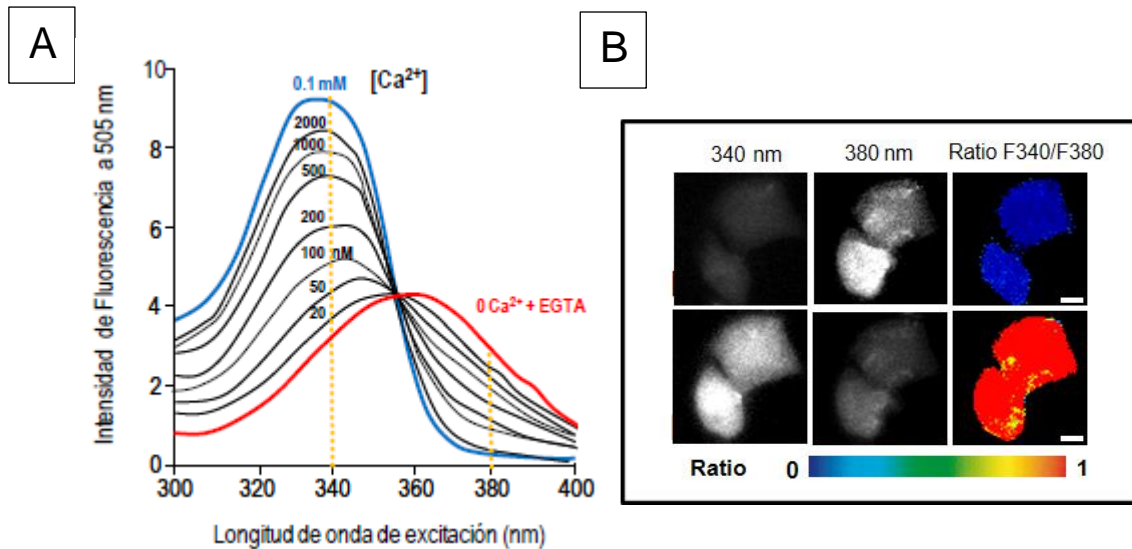
Para estimar la proliferación celular, las células PANC1 fueron sembradas en placas de 6 pocillos, en medio DMEM + FBS 10%, en 2 mL y a una densidad aproximada de  $14 \times 10^5$  células/pocillo. Por cada experimento se cultivaron tres replicados en ausencia (*Control*) o presencia de los siguientes fármacos: Salicilato 500  $\mu$ M, Sulindac 10-100  $\mu$ M y FCCP 10  $\mu$ M. Al inicio del experimento se tomó una muestra de 50  $\mu$ l de cada pocillo para su recuento con cámara de Neubauer.

Las células se incubaron durante 120h a 37°C y en atmósfera al 10% CO<sub>2</sub>. Transcurrido ese periodo, se lavó cada pocillo con PBS y se levantaron las células incubando con tripsina-EDTA a 37°C durante 4 min. Se obtuvieron de nuevo 50 $\mu$ l de nuevo para contar con cámara de Neubauer. Para medir la proliferación se determinó la tasa de proliferación:

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

### B) REGISTRO DE IMAGEN DE CALCIO CITOSÓLICO:

La monitorización de la concentración citosólica de Ca<sup>2+</sup> libre ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>) a tiempo real en células vivas a nivel de célula única se realizó por medio de imagen de fluorescencia usando la sonda fluorescente fura-2/AM. Esta molécula es un derivado del quelante de Ca<sup>2+</sup> fluorescente fura-2 más un grupo penta-acetoximetil ester. Dicho grupo es hidrófobo, confiriendo a la molécula la capacidad de atravesar la membrana plasmática al ser incubada. En el citosol fura-2/AM es de-esterificado por enzimas liberando fura-2 ácido que, al estar cargada negativamente, no puede atravesar la membrana plasmática y salir del citosol. Fura-2 tiene alta afinidad por el Ca<sup>2+</sup> y su unión aumenta la emisión de fluorescencia al ser excitado a longitudes de onda de 340 nm y disminuye al ser excitado a 380 nm como se ilustra en la figura 5. Por tanto, se puede medir el cociente ratiométrico 340/380, que aumentará cuanto mayor sea la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> (27).



**Figura 5.** (A) Espectro de excitación del fura-2. El aumento de  $Ca^{2+}$  produce un aumento de la luorescencia excitada a 340nm y disminuye la excitada a 380nm. (B) Imagen de  $Ca^{2+}$  citosólico mediante microscopia de fluorescencia. Células en estado basal y tras estímulo cargadas con fura-2/AM y excitadas a 340 y 380nm, así como el cociente F340/F380 codificado en pseudocolor (0/Azul  $\rightarrow$  1/Rojo). Las barras blancas representan  $10\mu m$ .

Para las medidas de entrada capacitativa de calcio, las células fueron sembradas en cubreobjetos de 12 mm de diámetro tratados con poli-L-lisina (0,01 mg/ml) a una densidad de  $20 \times 10^3$  células/ml en gota y cultivadas en medio DMEM enriquecido en placas de 4 pocillos. Pasadas 24 horas, se retira el cubreobjetos del medio, se lava en MEC Ca1 y se incuban las células en MEC Ca1 con fura-2/AM  $4 \mu M$  durante 1 h en oscuridad (para evitar que se produzca el foto-apagamiento o photobleaching de la sonda) y a temperatura ambiente. A continuación, se lava de nuevo el cubreobjetos en MEC Ca0 y se trata las células en MEC Ca0 con tapsigargina  $1 \mu M$  durante 10 min, en oscuridad y a temperatura ambiente. La tapsigargina es un inhibidor selectivo e irreversible de la bomba SERCA que provoca el vaciamiento pasivo de los depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  activándose ORAI1. A continuación, los cubreobjetos se vuelven a lavar en MEC Ca0.

Seguidamente, los cubreobjetos con las células tratadas se montaron en la platina termostaticada a  $37^\circ C$  de un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss S100TV), con un sistema de perfusión continuado que permite elegir la administración de MEC Ca0 y MEC Ca1 (produciendo un rápido incremento de  $[Ca^{2+}]_c$ ). Se realizó en ausencia (*Control*) o presencia de los siguientes fármacos: salicilato  $500 \mu M$ , sulindac  $1-10-100 \mu M$  y FCCP  $1-10-100 \mu M$ . Se empleó el siguiente esquema de perfusión:

<u>TIEMPO</u>	<u>PERFUSIÓN</u>
0'	MEC Ca0
1'	MEC Ca1 ( <i>Pico control</i> )
2'	MEC Ca0
2' 30''	MEC Ca0 + Agonista
7'	MEC Ca1 + Agonista ( <i>Pico agonista</i> )
8'	MEC Ca0 + Agonista
8' 30''	MEC Ca0
13'	Stop

Los resultados obtenidos son analizados por el software de análisis de imágenes Aquacosmos 2.6 (Hamamatsu Photonics).

Una forma de analizar cuantitativamente la entrada de Ca<sup>2+</sup> es midiendo el valor máximo que alcanza la señal obtenida(28). Así, se puede establecer una proporción entre la señal obtenida en el control y la obtenida con el agonista:

$$INHIBICIÓN\ SOCE\ (\%) = 100 - 100 * \left[ \frac{Ratio^{F340}/F380\ Agonista}{Ratio^{F340}/F380\ Control} \right]$$

### **C) ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

---

Los datos mostrados proceden de al menos tres experimentos independientes. Los resultados se muestran como media ( $\bar{X}$ )  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Cuando se han comparado dos medias se ha utilizado la t de Student para muestras no pareadas, según correspondiese. Para la comparación de datos incluidos en dos o más grupos se ha empleado el análisis de la varianza ANOVA de dos vías. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### A) FCCP, SALICILATO Y SULINDAC INHIBEN LA PROLIFERACIÓN DE PANC-1

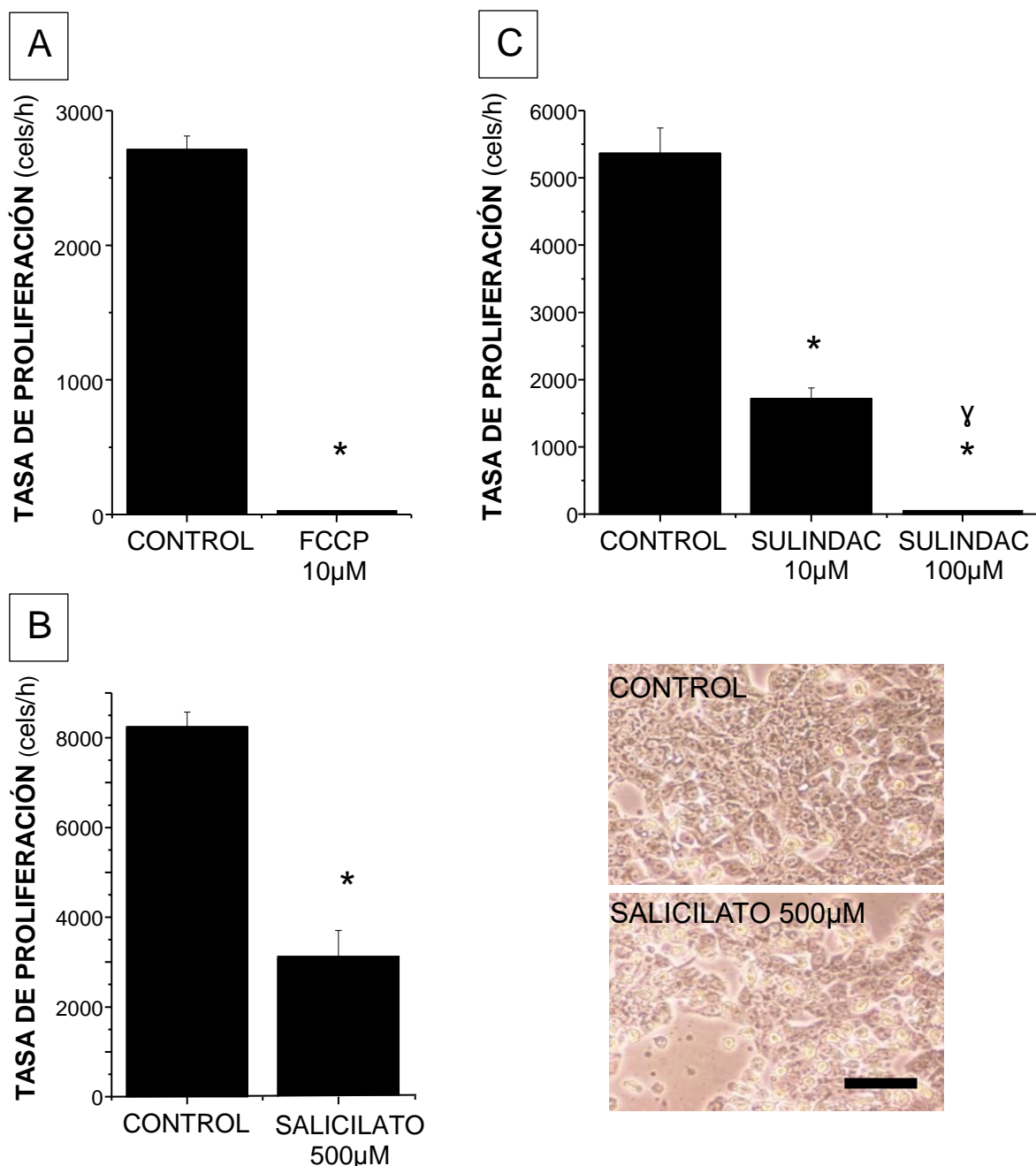
---

Para estudiar el efecto anti-proliferativo de fármacos desacoplantes mitocondriales como salicilato, o AINEs como el sulindac, primero se comparó el efecto sobre la proliferación de un desacoplante clásico como el FCCP. La figura 6A muestra el efecto anti-proliferativo del FCCP sobre la línea celular Panc-1 al ser incubada en presencia y ausencia (*control*) de esta molécula durante 120 h. A continuación, se procedió a confirmar el efecto anti-proliferativo del salicilato y el sulindac. Para ello, se cultivó Panc-1 en presencia y ausencia (*control*) de estos fármacos durante 120 h. Se empleó esta línea celular porque no expresa COX1 y su expresión de COX2 es similar a la del epitelio pancreático sano (29).

- La figura 6B muestra el efecto del salicilato 500 $\mu$ M. Empleamos dicha concentración porque conocemos que es la IC<sub>50</sub> (concentración de fármaco que inhibe un 50%) de estudios en otras líneas celulares neoplásicas (24). Esto concuerda con nuestros resultados.
- La figura 6C muestra el efecto del sulindac 10 $\mu$ M y 100 $\mu$ M. Empleamos inicialmente 100 $\mu$ M por haber sido la IC<sub>50</sub> obtenida en un estudio similar (27). Sin embargo, en nuestra línea celular, producía la muerte del cultivo por lo que también se empleó sulindac 10 $\mu$ M. Nosotros obtuvimos unos resultados similares, pero a una concentración 10 veces menor. Durante el transcurso de este trabajo se ha detectado que los efectos del sulindac en la proliferación (y, por tanto, deducimos que la concentración) disminuyen a medida que transcurre el tiempo desde que se elaboró el stock lo que podría explicar esta diferencia entre ambos estudios.

En definitiva, los resultados indican que tanto salicilato como sulindac inhiben más de un 60% la proliferación de células de adenocarcinoma de páncreas. Asimismo, estos resultados son similares a los obtenidos al utilizar FCCP, un despolarizante clásico.





**Figura 6.** Efectos del FCCP, el sulindac y el salicilato en el crecimiento de células Panc-1. Tasa de proliferación medida en células por hora, expresada como  $\bar{X} \pm \text{EEM}$  y obtenida en 3-4 experimentos independientes. (A) Efecto de FCCP 10µM sobre la tasa de proliferación. (B) Efecto del salicilato 500µM sobre la proliferación, las imágenes, obtenidas por microscopio invertido, muestran un experimento representativo (la barra negra representa 100µm). (C) Efecto de Sulindac 10 y 100µM sobre la proliferación. \* $p < 0,05$  vs Control, † $p < 0,05$  sulindac 10µM vs sulindac 100µM.

Se realizó un experimento representativo ( $n=1$ ) en el que se comparó sulindac 10µM, BTP 2,5µM (inhibidor directo de ORA1) y la combinación de ambos. Se obtuvo un resultado similar en los tres casos de manera que los tres tratamientos inhibían la proliferación un 60% lo que indica que el mecanismo de acción es probablemente coincidente.

## **B) FCCP, SALICILATO Y SULINDAC INHIBEN LA ENTRADA CAPACITATIVA DE CALCIO**

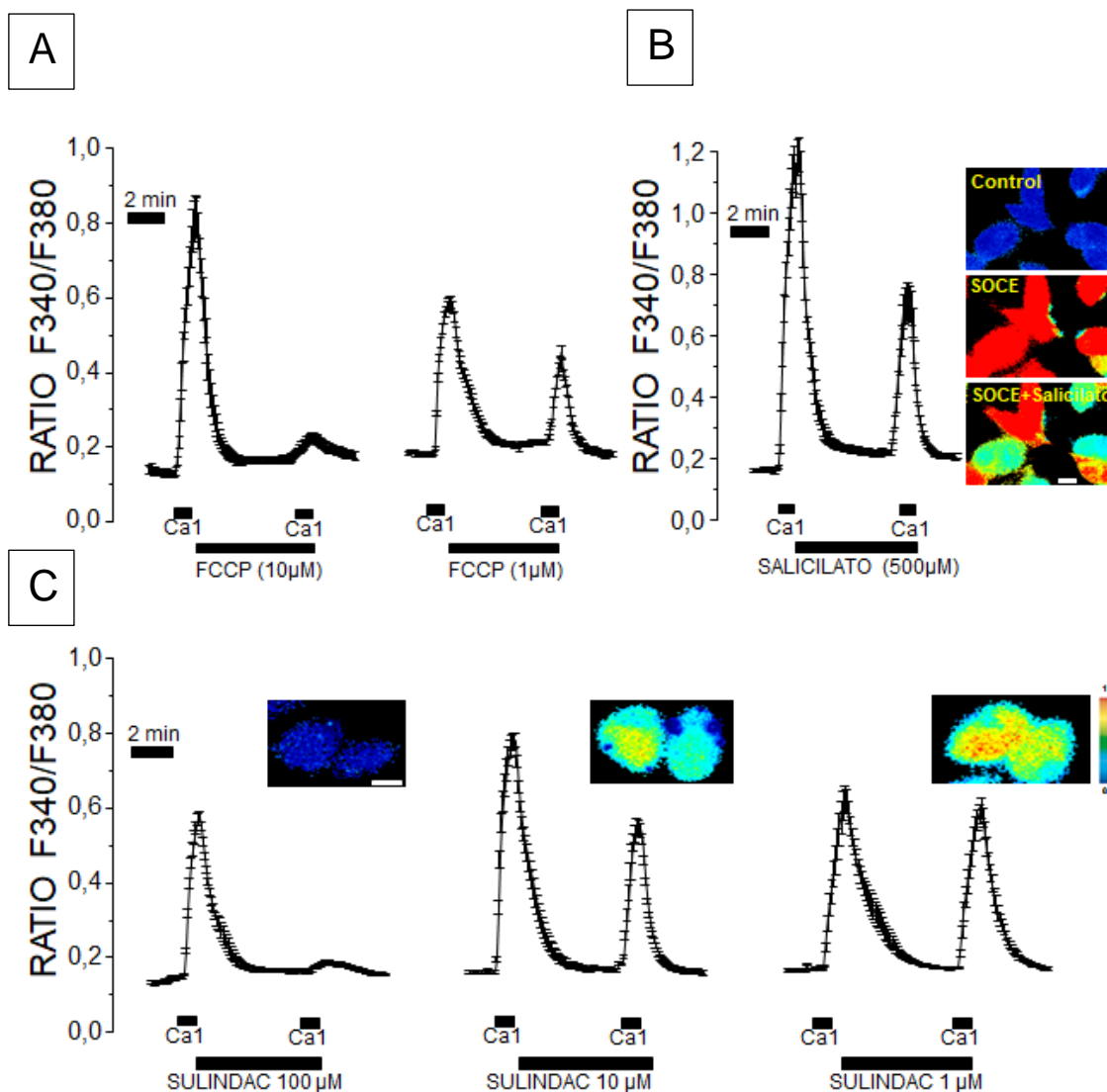
---

Se ha descrito que SOCE es un mecanismo de entrada del calcio que promueve eventos celulares como la proliferación (20). Por tanto, nuestro objetivo es determinar si el efecto anti-proliferativo del salicilato y AINEs como el sulindac podría deberse a la modulación de SOCE. Como se dijo en la introducción, la mitocondria ejerce un papel tamponador del calcio que entra en la célula a través de SOCE evitando la inactivación por calcio de ORAI1.

Nosotros proponemos que el salicilato y otros AINEs como el sulindac inhiben la proliferación a través del bloqueo de la entrada de calcio en la mitocondria (debido a su efecto desacoplante). Este bloqueo impide a la mitocondria tamponar el exceso de calcio que entra a la célula y, por tanto, se produce la inhibición de SOCE al inactivarse ORAI1.

Para estudiar la entrada capacitativa de calcio se han tratado las células Panc-1 durante 10 minutos con tapsigargina. Esta molécula es un inhibidor selectivo e irreversible de SERCA (bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE) lo que produce la depleción de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y, por tanto, la activación de STIM1 y ORAI1. No se produce la entrada inmediata de  $\text{Ca}^{2+}$ , porque las células se encuentran en medio sin calcio (MEC  $\text{Ca}^0$ ). Para medir el calcio citosólico, las células Panc-1 también se incubaron durante 1 hora en fura-2/AM lo que permite registrar, mediante un microscopio de fluorescencia, los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . El experimento consiste en valorar la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando se activa SOCE al añadir  $\text{Ca}^{2+}$  obtenida en ausencia (*Control*) o presencia de nuestros fármacos.

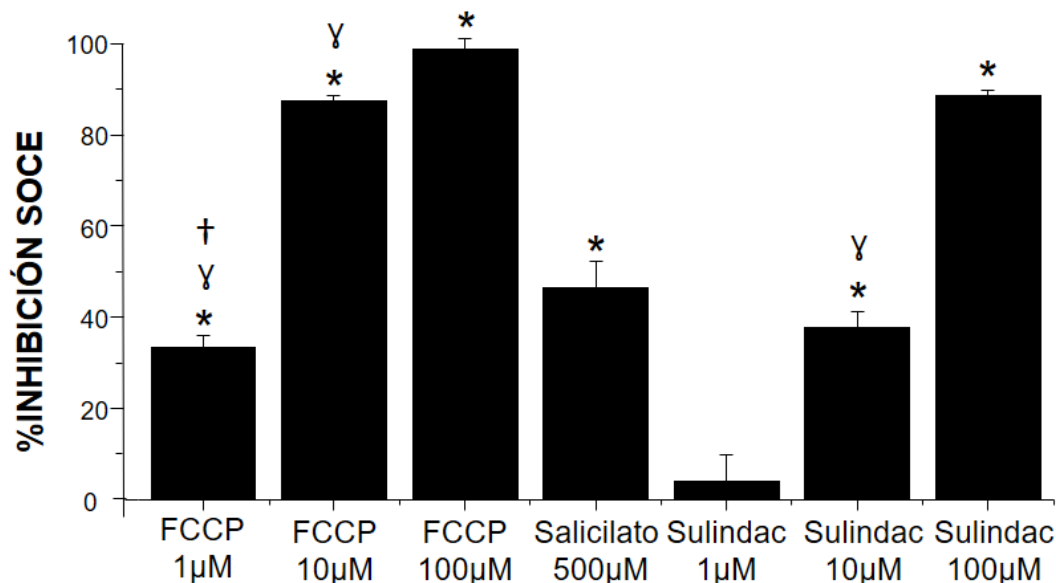
Para comprobar nuestra hipótesis se estudió el efecto de FCCP (desacoplante mitocondrial clásico) a  $1\mu\text{M}$  y  $10\mu\text{M}$  sobre SOCE como se observa en la figura 7A. De la misma manera también utilizamos salicilato  $500\mu\text{M}$  y sulindac  $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$  y  $100\mu\text{M}$ . La figura 7B y 7C muestran el efecto de estos fármacos sobre SOCE observándose una inhibición similar a la obtenida con el FCCP. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios, confirmándose de esta manera el papel de la mitocondria en SOCE (24).



**Figura 7.** Efectos del FCCP, el salicilato y el sulindac sobre la entrada capacitativa de Ca<sup>2+</sup> (SOCE) en células Panc-1. Cada trazo expresa la ratio F340/F380 lo que es directamente proporcional con la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> en el tiempo. Se refleja en cada caso un experimento representativo (n=3) y se representa como el promedio ( $\bar{X} \pm \text{EEM}$ ) de 20-40 células. En las gráficas se especifica el minuto en el que se expone las células a medio con Ca<sup>2+</sup>. (A) Efecto del FCCP 1 y 10 μM sobre SOCE. (B) Efecto del salicilato 500 μM sobre SOCE. Se acompaña de tres imágenes de pseudocolor que representan de arriba a abajo: situación basal, SOCE control y SOCE tras tratamiento con salicilato. (C) Efecto del sulindac 1, 10 y 100 μM sobre SOCE. Se acompaña de tres imágenes de pseudocolor que representan la entrada de Ca<sup>2+</sup> a la concentración de sulindac correspondiente.

Las imágenes se acompañan de escala de pseudocolor (valores de ratio 0 a 1) y barra blanca de calibración (representa 10 μm).

La figura 8 muestra cuantitativamente los resultados obtenidos. Para ello, se compara el valor máximo de la ratio F340/F380 obtenida con cada molécula y se compara con el del control. En el caso del sulindac se calcula la IC<sub>50</sub> obteniendo un valor de 45 μM.



**Figura 8.** Inhibición de SOCE respecto a control. Medida en porcentaje. Se representa el valor promedio ( $\bar{X} \pm EEM$ ) de la entrada de calcio máxima. \* $p < 0,05$  vs Control, † $p < 0,05$  FCCP/Sulindac 10µM vs FCCP/Sulindac 100µM y † $p < 0,05$  FCCP 1µM vs FCCP 10µM.

## DISCUSIÓN

El cáncer de páncreas presenta un pronóstico muy grave. Generalmente se diagnostica en estadios avanzados en los que ya no existe la posibilidad de realizar resección quirúrgica (única posibilidad curativa y no siempre efectiva) y, en ese caso, el arsenal quimioterapéutico es muy limitado produciendo una supervivencia mínima. Por tanto, sería útil estudiar nuevas dianas terapéuticas que pudieran ofrecer mejores resultados.

Se ha detectado que en el cáncer existe un remodelado del calcio intracelular que podría ser responsable de la aparición de características específicas críticas por lo que proponemos su papel como potencial diana terapéutica. Dentro de la homeostasis del calcio, la entrada capacitativa del calcio constituye la principal vía de entrada de este segundo mensajero en células no excitables.

A través de múltiples estudios se ha detectado que la aspirina y otros AINEs ejercen un efecto quimiopreventivo en el cáncer. Esta acción no puede ser explicada únicamente por su efecto anti-inflamatorio. Proponemos que, al menos en parte, es debida a la modulación de la entrada de calcio en el interior de la célula.

Para ello, en primer lugar, se confirmó el efecto anti-proliferativo del FCCP, desacoplante mitocondrial clásico. Empleamos esta molécula porque su mecanismo de acción es el que planteamos que tienen salicilato y sulindac. Seguidamente, se verificó el efecto quimiopreventivo de los AINEs en el cáncer de páncreas ya detectado mediante estudios epidemiológicos. Se comprobó que el salicilato y el sulindac producen una inhibición de la proliferación en la línea celular Panc-1. Se eligió esta línea celular porque no se ha demostrado que exprese COX-1 y porque sus niveles de COX-2 son similares a los del tejido sano. Por tanto, no se podrían explicar estos resultados por el efecto anti-inflamatorio de estos fármacos. En el caso del sulindac se demostró una relación dosis-respuesta al emplear varias concentraciones (10 $\mu$ M y 100 $\mu$ M).

En segundo lugar, se comprobó el efecto de estos fármacos en la entrada capacitativa del calcio. El FCCP produce una inhibición dosis-dependiente de SOCE lo que confirma la función de la mitocondria en la entrada capacitativa del calcio en las células Panc-1. El salicilato y el sulindac también producen una inhibición de SOCE (en el caso de sulindac también se demuestra una relación dosis-respuesta al emplear varias concentraciones: 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M y 100 $\mu$ M).

En definitiva, estos resultados confirman que salicilato y sulindac producen una inhibición de la proliferación y de la entrada capacitativa del calcio. Teniendo en cuenta que la señalización del calcio intracelular regula procesos celulares como la proliferación, es plausible pensar que ambos fenómenos están relacionados. Este trabajo no demuestra que el mecanismo de la inhibición de SOCE sea debida a la despolarización de la mitocondria. Sin embargo, FCCP (cuyo mecanismo sí se conoce) produce efectos similares y, de estudios en células de colon y otras células sí que se ha demostrado la acción desacoplante sobre la mitocondria del salicilato y otros AINEs (24).

Debemos plantearnos el rol activo de la mitocondria en el cáncer. La fosforilación oxidativa ineficaz (efecto Warburg) produce una disfunción mitocondrial que podría relacionarse con la resistencia a la apoptosis de las células neoplásicas (30). La restauración de la función mitocondrial podría ser otra diana terapéutica.

La pregunta es cómo trasladar estos resultados de laboratorio a la práctica clínica. La toma de AINEs o, incluso, de análogos estructurales con acción desacoplante pero sin los efectos adversos derivados de la inhibición de COX podría servir como tratamiento profiláctico en:

- Pacientes con alto riesgo de desarrollar cáncer
- Pacientes oncológicos intervenidos quirúrgicamente en los que se desea evitar la aparición de recidivas o metástasis

Es necesario llevar a cabo más estudios en esta dirección y comprobar si este tipo de tratamiento puede tener un beneficio clínico superior a sus riesgos.

## CONCLUSIONES

- FCCP, salicilato y sulindac inhiben la proliferación de la línea celular de adenocarcinoma de páncreas Panc-1.
- FCCP, salicilato y sulindac inhiben la entrada capacitativa de calcio en la línea celular de adenocarcinoma de páncreas Panc-1.

## FINANCIACIÓN Y CONFLICTOS DE INTERÉS

Este trabajo ha sido financiado con el proyecto BFU2015-70131R del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO). Los autores también han recibido las Becas de Colaboración 2017-2018 en departamentos universitarios convocadas por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

## AGRADECIMIENTOS

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

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

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C, Hollebecque A, Burtin P, Goéré D, et al. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 1 de septiembre de 2015;26(suppl\_5):v56-68.
2. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 28 de noviembre de 2016;22(44):9694-705.
3. *Las\_Cifras\_del\_cancer\_en\_Espana2018.pdf* [Internet]. [citado 22 de abril de 2018]. Disponible en: [https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las\\_Cifras\\_del\\_cancer\\_en\\_Espana2018.pdf](https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las_Cifras_del_cancer_en_Espana2018.pdf)
4. Kune GA, Kune S, Watson LF. Colorectal Cancer Risk, Chronic Illnesses, Operations, and Medications: Case Control Results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. *Cancer Res*. 1 de agosto de 1988;48(15):4399-404.
5. Arber N, Levin B. Chemoprevention of Colorectal Neoplasia: The Potential for Personalized Medicine. *Gastroenterology*. 1 de abril de 2008;134(4):1224-37.
6. Burn J, Gerdes A-M, Macrae F, Mecklin J-P, Moeslein G, Olschwang S, et al. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *Lancet*. 17 de diciembre de 2011;378(9809):2081-7.
7. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hylind LM, Celano P, et al. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med*. 6 de mayo de 1993;328(18):1313-6.
8. Dehmer SP, Maciosek MV, Flottemesch TJ, LaFrance AB, Whitlock EP. Aspirin for the Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Colorectal Cancer: A Decision Analysis for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 21 de junio de 2016;164(12):777.
9. Rothwell PM, Fowkes FGR, Belch JF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *The Lancet*. enero de 2011;377(9759):31-41.
10. Risch HA, Lu L, Streicher SA, Wang J, Zhang W, Ni Q, et al. Aspirin Use and Reduced Risk of Pancreatic Cancer. *Cancer Epidemiol Prev Biomark*. 1 de enero de 2017;26(1):68-74.
11. Rigas B, Kashfi K. Cancer Prevention: A New Era beyond Cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther*. 1 de julio de 2005;314(1):1-8.

12. Xu X-M, Sansores-Garcia L, Chen X-M, Matijevic-Aleksic N, Du M, Wu KK. Suppression of inducible cyclooxygenase 2 gene transcription by aspirin and sodium salicylate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 de abril de 1999;96(9):5292-7.
13. Wechter WJ, Leipold DD, Murray ED, Quiggle D, McCracken JD, Barrios RS, et al. E-7869 (R-Flurbiprofen) Inhibits Progression of Prostate Cancer in the TRAMP Mouse. *Cancer Res*. 15 de abril de 2000;60(8):2203-8.
14. Kashfi K, Rigas B. Non-COX-2 targets and cancer: Expanding the molecular target repertoire of chemoprevention. *Biochem Pharmacol*. 1 de octubre de 2005;70(7):969-86.
15. Petersen OH, Michalak M, Verkhratsky A. Calcium signalling: past, present and future. *Cell Calcium*. octubre de 2005;38(3-4):161-9.
16. de la Fuente S, Fonteriz RI, Montero M, Alvarez J. Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the endoplasmic reticulum measured with a new low-Ca<sup>2+</sup>-affinity targeted aequorin. *Cell Calcium*. julio de 2013;54(1):37-45.
17. Parekh AB, Putney JW. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*. abril de 2005;85(2):757-810.
18. Soboloff J, Rothberg BS, Madesh M, Gill DL. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 23 de agosto de 2012;13(9):549-65.
19. Villalobos C, Sobradillo D, Hernández-Morales M, Núñez L. Calcium remodeling in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1864(6):843-9.
20. Lewis RS. Calcium Signaling Mechanisms in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 2001;19(1):497-521.
21. Zhan Z-Y, Zhong L-X, Feng M, Wang J-F, Liu D-B, Xiong J-P. Over-expression of Orai1 mediates cell proliferation and associates with poor prognosis in human non-small cell lung carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(5):5080-8.
22. Xia J, Wang H, Huang H, Sun L, Dong S, Huang N, et al. Elevated Orai1 and STIM1 expressions upregulate MACC1 expression to promote tumor cell proliferation, metabolism, migration, and invasion in human gastric cancer. *Cancer Lett*. 10 de octubre de 2016;381(1):31-40.
23. Zhu H, Zhang H, Jin F, Fang M, Huang M, Yang CS, et al. Elevated Orai1 expression mediates tumor-promoting intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 17 de abril de 2014;5(11):3455-71.
24. Valero RA, Senovilla L, Núñez L, Villalobos C. The role of mitochondrial potential in control of calcium signals involved in cell proliferation. *Cell Calcium*. 1 de septiembre de 2008;44(3):259-69.



25. Hernández-Morales M, Sobradillo D, Valero RA, Muñoz E, Ubierna D, Moyer MP, et al. Mitochondria sustain store-operated currents in colon cancer cells but not in normal colonic cells: reversal by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Oncotarget*. 21 de julio de 2017;8(33):55332-52.
26. Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer*. 15 de mayo de 1975;15(5):741-7.
27. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 25 de marzo de 1985;260(6):3440-50.
28. Bird GS, DeHaven WI, Smyth JT, Putney JW. Methods for studying store-operated calcium entry. *Methods*. 1 de noviembre de 2008;46(3):204-12.
29. Molina MA, Sitja-Arnau M, Lemoine MG, Frazier ML, Sinicrope FA. Increased Cyclooxygenase-2 Expression in Human Pancreatic Carcinomas and Cell Lines: Growth Inhibition by Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Cancer Res*. 1 de septiembre de 1999;59(17):4356-62.
30. Bhat TA, Kumar S, Chaudhary AK, Yadav N, Chandra D. Restoration of mitochondria function as a target for cancer therapy. *Drug Discov Today*. mayo de 2015;20(5):635-43.

## ANEXO

### A) RECURSOS AUDIOVISUALES:

---

La figura 9 consiste en un código QR que permite al lector acceder a contenido multimedia complementario:



**Figura 9.** Código QR de acceso a material audiovisual. Permite acceso a la visualización de contenido multimedia en la plataforma Youtube.

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

## B) PRESENTACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO: PÓSTER

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

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

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



IBGM  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR

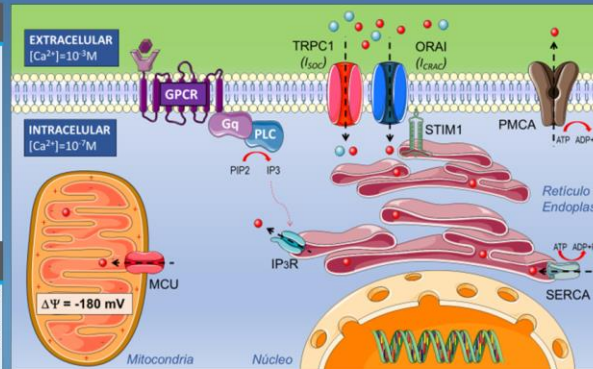
#### INTRODUCCIÓN

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

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

#### MATERIAL Y MÉTODOS

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

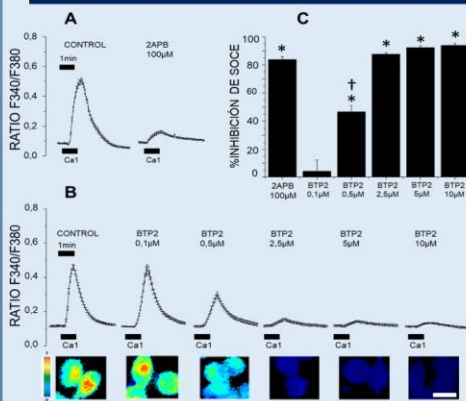


**Figura 1.** SOCE, Entrada capacitativa de calcio

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

#### RESULTADOS

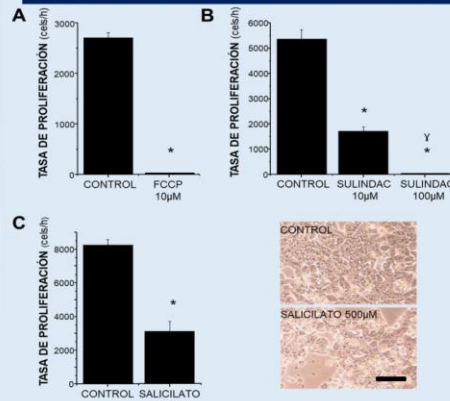
##### 2APB Y BTP2 INHIBEN LA ENTRADA CAPACITATIVA DE CALCIO (SOCE)



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

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

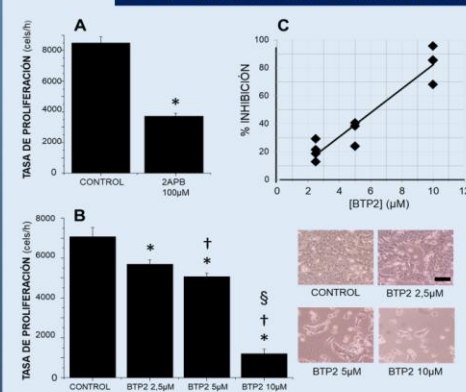
##### FCCP, SALICILATO Y SULINDAC INHIBEN LA PROLIFERACIÓN CELULAR



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

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

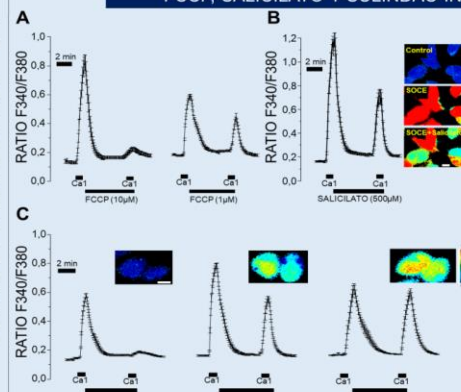
##### 2APB Y BTP2 INHIBEN LA PROLIFERACIÓN CELULAR



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

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

##### FCCP, SALICILATO Y SULINDAC INHIBEN SOCE



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

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

#### CONCLUSIONES

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

#### BIBLIOGRAFÍA

- Villalobos C, Sobradillo D, Hernández-Morales M, Núñez L. Calcium remodeling in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1864(6):843-9.
- Hernández-Morales M, Sobradillo D, Valero RA, Muñoz E, et al. Mitochondria sustain store-operated currents in colon cancer cells but not in normal colonic cells: reversal by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Oncotarget*. 21 de julio de 2017;8(33):55332-52.
- Valero RA, Senovilla L, Núñez L, Villalobos C. The role of mitochondrial potential in control of calcium signals involved in cell proliferation. *Cell Calcium*. 1 de septiembre de 2008;44(3):259-69.



