

ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

MODULACIÓN POR LA HORMONA PARATIROIDEA DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE COLON HUMANO

Natalia Calvo, Ana Russo de Boland, Claudia Gentili*

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, Argentina.

Resumen

La hormona paratiroidea (PTH) es un importante mediador de la remodelación ósea y actúa como regulador esencial de la homeostasis del calcio. Dependiendo del contexto celular, PTH también puede estimular o inhibir la apoptosis y provocar alteraciones en la regulación del ciclo celular. En trabajos previos demostramos que, en las células Caco-2 derivadas de adenocarcinoma de colon humano, la hormona (10^{-8} M) en ausencia de suero tiene efectos proapoptóticos y, con baja dosis de suero, efectos antiproliferativos: aumenta la expresión de la proteína inhibitoria del ciclo celular p27Kip1 y disminuye la expresión de las ciclinas D1 y D3 y de la quinasa dependiente de ciclina CDK6. En este trabajo profundizamos el estudio de los mecanismos moleculares que median la respuesta a PTH de las células Caco-2. Se evidenció que, en ausencia de suero, el receptor de PTH tipo 1 (RPTH1) se localiza exclusivamente en el núcleo. Además, el tratamiento con la hormona solo en la dosis de 10^{-8} M disminuye el número de células vivas, pero no se observan cambios en concentraciones menores. Más aún,

en ausencia de suero, solamente la expresión de la proteína inhibitoria del ciclo celular p15INK4B es modificada por el tratamiento hormonal. Estos resultados sugieren que PTH en una dosis de 10^{-8} M arresta la progresión del ciclo celular en las células Caco-2; sin embargo, según las condiciones experimentales, este efecto sería mediado por distintas proteínas asociadas al ciclo celular.

Palabras clave: PTH, células Caco-2, ciclo celular.

Summary

CELL CYCLE MODULATION BY PARATHYROID HORMONE IN HUMAN COLON ADENOCARCINOMA CELLS

Parathyroid hormone (PTH) is a major mediator of bone remodeling and acts as a key regulator of calcium homeostasis. Depending on the cellular context, PTH may also stimulate or inhibit apoptosis and induce alterations in cell cycle regulation. Previously we found that in Caco-2 cells, a cell line derived from human

* Correo electrónico: ncalvo@criba.edu.ar



colon adenocarcinoma, the hormone (10^{-8} M) in the absence of serum is pro-apoptotic and with low dose of serum has anti-proliferative effect increasing the protein expression of cell cycle inhibitor p27Kip1 and decreasing the expression of cyclins D1 and D3 and cyclin-dependent kinase CDK6. In this work we further studied the molecular mechanisms that mediate the response to PTH in Caco-2 cells cultured without serum. We evidenced that, in the absence of serum, PTH receptor type 1 (PTH1R) is located exclusively in the nucleus. Moreover, the hormone at 10^{-8} M decreases the number of living cells and no changes were observed at lower concentrations. Even more, only the protein expression of cell cycle inhibitor p15INK4B is modified by the hormone in the absence of serum. These results suggest that PTH at a dose of 10^{-8} M arrest cell cycle progression in Caco-2 cells; however, according to the experimental conditions, this effect would be mediated by different cell cycle associated proteins.

Key words: PTH, Caco-2 cells, cell cycle.

Introducción

La hormona paratiroidea (PTH) es un importante mediador de la remodelación ósea y actúa junto al calcitriol y a la calcitonina, como regulador esencial de la homeostasis del calcio y fósforo en los animales superiores, interactuando con el receptor de PTH tipo 1 (RPTH1).

La proliferación de células eucariotas depende de la progresión del ciclo celular. En los mamíferos, el ciclo celular es regulado por las ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (Cdks). La progresión de la fase G1 a la fase S requiere los complejos ciclina D-Cdk4/6 y ciclina E-Cdk2. Estos complejos fosforilan la proteína del retinoblastoma (Rb), lo que deriva en la disociación de Rb y E2F. La liberación de E2F provoca la activación de genes esenciales para que las células entren en la fase S. Existen dos tipos de inhibidores

de Cdks (Cdkls): los 4 miembros de la familia "INK" (p16INK4A, p15INK4B, p18INK4C y p19INK4D) que se unen e inhiben solo los complejos ciclina D-Cdk4/6, y los miembros CIP/KIP (p21Cip1, p27Kip1 y p57Kip2) que se unen e inhiben a ambos complejos regulando negativamente la progresión de la fase G1 a la fase S. Las alteraciones en el control de los mecanismos de regulación del ciclo celular contribuyen al cáncer.¹

Se ha demostrado que PTH también puede estimular o inhibir la proliferación celular y provocar alteraciones en la regulación del ciclo celular.^{2,3} Varios estudios *in vitro* mostraron que PTH puede estimular la proliferación de células osteoblásticas dependiendo de las condiciones experimentales.^{4,5} En la línea celular TE-85, una línea celular precursora de osteoblastos,⁶ PTH estimula la proliferación a través de un mecanismo que incrementa la expresión de Cdk1.⁷ En condrocitos y células de condrosarcoma, una mutación que activa al RPTH1 causa un incremento en la expresión de ciclina D1 y ciclina A.⁸ PTH induce la expresión de la ciclina D1 en células osteoblásticas tempranas y su acción depende del estado de maduración de las células.² Sin embargo, PTH puede inhibir el crecimiento de varias líneas celulares de linaje osteogénico, tales como UMR 106-01, incrementando el nivel de expresión de p27 e inhibiendo la actividad de Cdk2^{9,10} y SaOS-2.¹¹ En las células de linaje osteogénico UMR 106-01 y en cultivo primario de calvaria de rata, PTH inhibe la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase S, induciendo la expresión de la fosfatasa dual MKP-1 (fosfatasa-1 de las proteínas quinasas activadas por mitógenos) y de p21Cip1 e inhibiendo la expresión de la ciclina D1, lo que sugiere que el arresto de células de linaje osteogénico en G1 puede ser una parte importante del efecto anabólico de PTH.³

El concepto sobre el papel de PTH actuando sobre los tejidos blanco clásicos, hueso y riñón se ha expandido al intestino, donde ejerce importantes funciones regulatorias.¹²⁻¹⁷ En

este trabajo, utilizamos como modelo experimental las células intestinales de adenocarcinoma de colon humano Caco-2 que están dotadas de la maquinaria molecular que les permite responder a PTH y constituyen un modelo apropiado para caracterizar la regulación por PTH de la proliferación, diferenciación y apoptosis. Previamente demostramos que en las células Caco-2, PTH en dosis de 10^{-8} M y en ausencia de suero disminuye el número de células viables, causa cambios morfológicos típicos de células apoptóticas,¹⁸ la activación de varios factores proapoptóticos¹⁹ y la inactivación de la quinasa Akt.²⁰ Recientemente observamos que, en estas células intestinales cultivadas con una baja dosis de suero, el tratamiento con PTH además afecta la progresión del ciclo celular incrementando el porcentaje de células en la fase G0/G1, aumentando la expresión de la proteína inhibitoria del ciclo celular p27Kip1 y disminuyendo la expresión de las ciclinas D1 y D3 y de la quinasa dependiente de la ciclina CDK6. Estos cambios son mediados por la vía de señalización de PKC.²¹ Nuestras investigaciones sugieren que PTH no solo tiene efectos proapoptóticos sino que además cumple un rol antiproliferativo en las células Caco-2. Con base en estas evidencias, el objetivo del presente trabajo fue profundizar el estudio respecto del papel de PTH en las células intestinales Caco-2.

Materiales y métodos

Modelo experimental

Se utilizó la línea celular intestinal Caco-2 derivada de adenocarcinoma de colon humano adquirida de la ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, Virginia). Se cultivaron las células a 37 °C, bajo atmósfera de 5,5% CO₂ en aire, en medio DMEM que contenía 20% de suero fetal bovino, penicilina 100 UI/ml, estreptomycin 100 mg/ml y gentamicina 50 mg/ml.

Tratamiento de las células Caco-2: las cé-

lulas fueron privadas de suero fetal bovino durante 24 horas y luego tratadas durante 6, 24 y 48 horas o 5 días y con distintas concentraciones (10^{-12} - 10^{-10} - 10^{-8} M) de PTH (1-34) vehiculizadas en medio DMEM.

Obtención de lisados celulares

Luego del tratamiento, el medio de cultivo fue removido y las células se lavaron 2 veces con PBS frío que contenía inhibidores de fosfatasa (NaF 25 mM y Na₃VO₄ 1 mM). A continuación, las células fueron lisadas en un *buffer* compuesto por Tris-HCl 50 mM (pH: 7,4), NaCl 150 mM, KCl 3 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 1%, Nonidet P-40 1%, aprotinina 20 µg/ml, leupeptina 20 µg/ml, fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) 1 mM, NaF 25 mM y Na₃VO₄ 1 mM y los lisados fueron colectados en tubos *ependorf*, mantenidos en hielo por 10 minutos, agitados por 45 segundos y colocados nuevamente en hielo por 10 minutos. Luego, los lisados fueron centrifugados a 14.000 g durante 15 minutos a 4 °C para descartar restos celulares. Se colectaron los sobrenadantes y se tomaron alícuotas para cuantificar las proteínas por el método colorimétrico de Bradford²² usando albúmina sérica bovina como estándar.

Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida

Los lisados proteicos se desnaturalizaron en *buffer* muestra de electroforesis 6X (Tris-HCl 0,375 M pH: 6,8; dodecilsulfato de sodio (SDS) 12%; glicerol 60%; β-mercaptoetanol 30% y azul de bromofenol como indicador del frente de corrida) y se calentaron en baño de agua a 100 °C durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras fueron sembradas (30 µg de proteína/calle) y separadas por electroforesis en geles de poli(acrilamida)-SDS (SDS-PAGE) discontinuos (gel de *stacking*: 4% acrilamida, gel de separación: 15% acrilamida) según la técnica de Laemmli.²³ En paralelo se sembraron marcadores coloreados de peso molecular conocido. La electroforesis se realizó con voltaje constante (100 voltios) utilizan-



do como *buffer* de corrida Tris 25 mM pH: 8,8; glicina 195 mM; SDS 0,1%.

Electrotransferencia e inmunoblotting

Luego de la corrida electroforética se electrotransferieron las proteínas desde los geles hasta membranas de Inmobilon-P (PVDF: polivinil-difluoruro, Millipore, 0,45 μ m), según lo descrito en la literatura.²⁴ Las membranas electrotransferidas fueron bloqueadas en *buffer* TBST (50 mM Tris-HCl pH: 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20)-leche y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente, según cada ensayo. Las membranas lavadas fueron luego incubadas con el anticuerpo anti-globulina de la especie animal correspondiente al anticuerpo primario usado conjugado con peroxidasa y diluido con TBST-leche. Se lavaron nuevamente y se revelaron por quimioluminiscencia empleando un kit comercial. El peso molecular aparente de las bandas inmunorreactivas en las membranas se determinó transfiriendo paralelamente proteínas coloreadas de peso molecular conocido. La detección de los complejos inmunes se llevó a cabo mediante autorradiografía de las membranas correspondientes. Los anticuerpos primarios y secundarios se prepararon en TBST que contenía 1% de leche. Para remover el anticuerpo de las membranas y poder exponerlas a anticuerpos diferentes ("stripping"), las membranas se sumergieron en *buffer* (62,5 mM Tris-HCl pH: 6,8, 2% SDS y 50 mM β -mercaptoetanol) y luego se lavaron en TBST. Posteriormente se realizó el bloqueo continuando con el protocolo explicado anteriormente.

Inmunocitoquímica

Las células sembradas sobre cubreobjetos fueron fijadas y permeabilizadas con metanol frío a -20 °C. Luego de varios lavados, los sitios no específicos de ligado a proteínas fueron bloqueados con 5% de albúmina bovina (BSA) diluida en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, las muestras

fueron incubadas en presencia del anticuerpo primario monoclonal anti-RPTH1 durante toda la noche a 4 °C. Después de varios lavados, las preparaciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 647 (dilución 1:250) durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, luego de varios lavados, los preparados se montaron con una solución de glicerol 95% en PBS. Las células fueron teñidas con el colorante específico nuclear TO-PRO 1 (dilución 1:300) durante los últimos 30 minutos de incubación con el anticuerpo secundario.

Ensayos de viabilidad celular

Se estimó el número de células viables mediante dos ensayos de viabilidad celular:

1) CellTiter 96® AQueus One Solution Cell Proliferation Assay (MTS). Se empleó el kit comercial CellTiter 96® AQueus One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Este método colorimétrico se basa en que las células metabólicamente activas reducen el compuesto de tetrazolium MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium, sal inerte] a formazan. El desarrollo de color es directamente proporcional al número de células vivas presentes en el cultivo. Las células fueron sembradas en multiplacas de 96 pocillos por cuadruplicado. Luego del tratamiento hormonal, las células fueron incubadas con el reactivo durante 45 minutos a 37 °C; después, el medio fue recolectado y la absorbancia se leyó a 490 nm. Los resultados se expresaron como el porcentaje del valor promedio respecto del control.

2) Tinción con cristal violeta: las células fueron fijadas con metanol a -20 °C y después de varios lavados, se tiñeron con cristal violeta 0,1%, un colorante básico que tiñe núcleos, a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron lavadas varias veces con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y desteñidas con Triton X-100 0,2% durante 30 minutos seguido de una medición

a 590 nm empleando un espectrofotómetro Beckman DU530. El valor de la absorbancia se correlaciona con el número de células.

Tratamiento estadístico y expresión de los resultados

La significancia estadística de los datos obtenidos se evaluó mediante el t-test de Student considerándose significativos valores de $p < 0,05$. Los resultados se expresaron como promedio \pm desvío estándar (\pm DS) de por lo menos tres experimentos independientes.

Resultados

En las células Caco-2 cultivadas en presencia de suero observamos que el receptor tipo 1 de PTH (RPTH1) se localiza en la mem-

brana plasmática, el citosol y el núcleo de estas células intestinales.¹⁸ Como nuestras anteriores investigaciones evidencian efectos de PTH en las células Caco-2 privadas totalmente de suero, se evaluó en el presente trabajo la localización del RPTH1 en estas células intestinales cultivadas en ausencia de suero por inmunocitoquímica. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-RPTH1 y su correspondiente anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Alexa Flúor 647 (azul) y el colorante TO-PRO 1 (rojo) para poner de manifiesto la morfología nuclear. La Figura 1 obtenida por microscopía confocal muestra que -y a diferencia de lo observado en presencia de suero- en ausencia de este, el receptor se localiza exclusivamente en el núcleo.

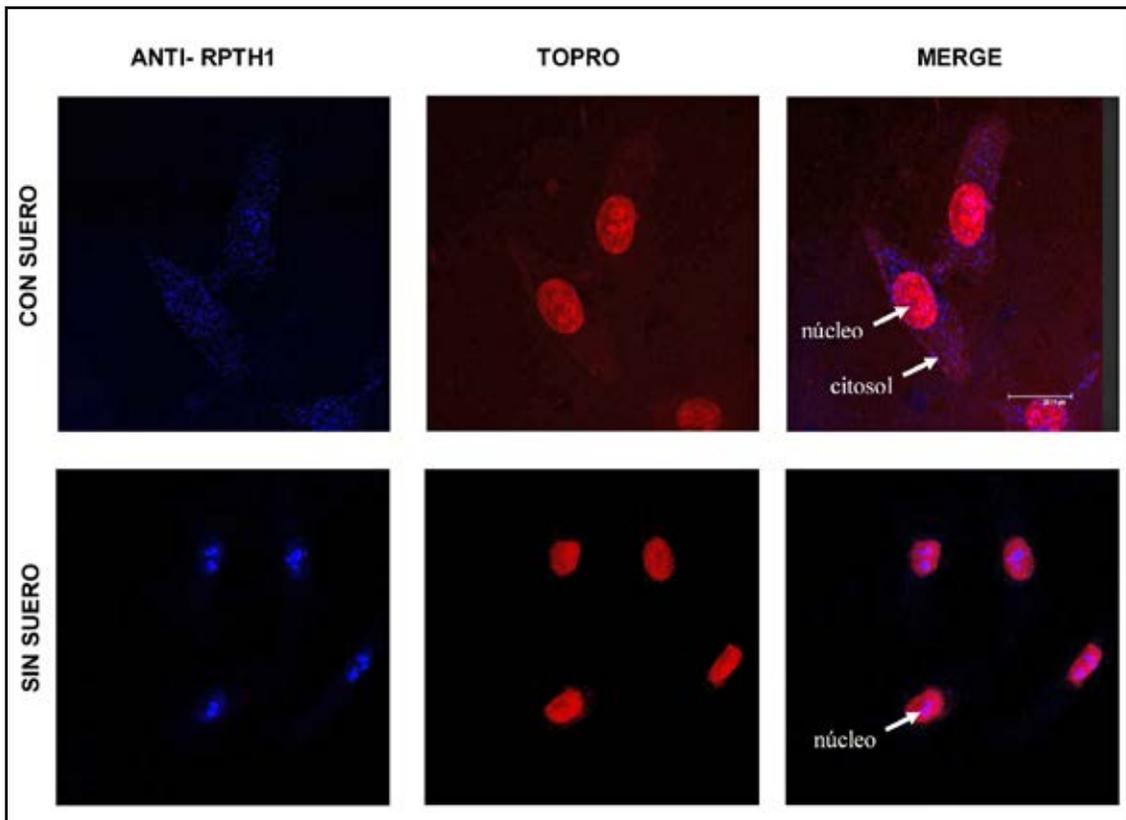


Figura 1. Distribución subcelular del RPTH1 en las células Caco-2 en ausencia y en presencia de suero. Se muestran imágenes de fluorescencia representativas de tres experimentos independientes obtenidas por microscopía confocal. Se observan los núcleos teñidos con TO-PRO (rojo), la presencia del RPTH1 (azul) y las zonas de co-localización (violeta) que indican la presencia del receptor a nivel nuclear y citosólico.



Luego evaluamos si el efecto de PTH en las células Caco-2 privadas de suero es dependiente de la dosis hormonal. Para tal fin, las células fueron estimuladas con PTH (10^{-12} - 10^{-10} - 10^{-8} M) durante 5 días e incubadas con el reactivo MTS para medir la capacidad metabólica de estas células intestinales como indicador de viabilidad celular. Como se observa en la Figura 2A, la hormona en una dosis de 10^{-8} M disminuyó en un 50%

la producción de formazan (el producto de la biorreducción del MTS). Más aún, la estimación del número de células usando el colorante nuclear cristal violeta reveló que PTH (10^{-8} M) disminuyó la absorbancia en aproximadamente un 46% respecto de las células control (Figura 2B). No se observaron cambios con respecto a las células control cuando las células Caco-2 fueron expuestas a dosis menores.

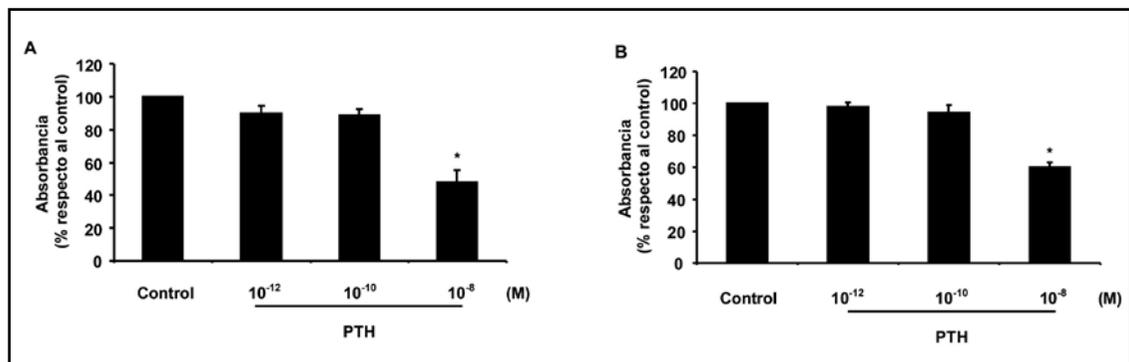


Figura 2. Efectos de PTH sobre la viabilidad celular. El número de células viables fue determinado por (MTS) (A) y cristal violeta (B). Los resultados fueron expresados como porcentaje con respecto al control de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. * $p < 0,05$ con respecto al control.

Si bien la modulación por PTH de la expresión de ciertas proteínas reguladoras del ciclo celular había sido estudiada en las células Caco-2 cultivadas con baja dosis de suero,²¹ hasta el momento desconocíamos si PTH regulaba también la expresión de proteínas asociadas al ciclo celular en estas células intestinales en ausencia total de suero. Por lo tanto, las células Caco-2 privadas de suero fueron expuestas a PTH (10^{-8} M) por diferentes intervalos de tiempo (6 a 48 horas) y los niveles proteicos de las ciclinas D1 y D3 y de los inhibidores específicos de Cdks p15INK4B y p27Kip1 fueron analizados por Western blot utilizando anticuerpos específicos. Se observó que el tratamiento con PTH (6 y 24 horas) aumenta los niveles proteicos de p15INK4B, mientras que

no se modifica la expresión de las ciclinas D1 y D3 ni del inhibidor p27Kip1 (Figura 3).

Discusión

En la mayoría de las células, PTH inicia sus efectos interactuando con el receptor tipo 1 acoplado a proteínas G (RPTH1), que posee siete dominios transmembrana, con un dominio amino terminal extracelular donde se une la hormona y un largo dominio carboxilo terminal intracelular.²⁵ Hasta el presente, se ha encontrado un solo receptor en osteoblastos²⁶ y en células duodenales,¹⁷ pero se ha descrito un segundo receptor de PTH (RPTH2) en páncreas, cerebro, riñón y testículos²⁷ y se ha postulado la existencia de otros. El RPTH1 es el primer miembro de

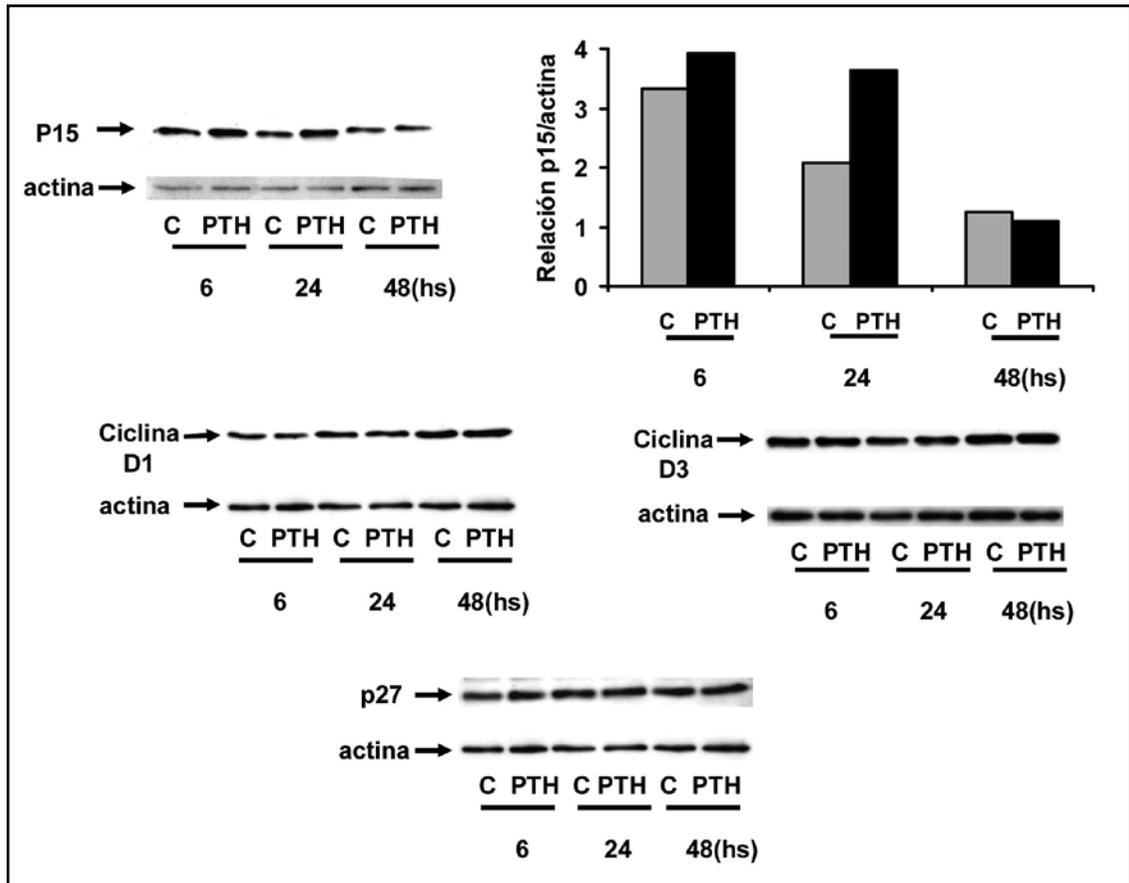


Figura 3. Modulación por PTH de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular. Las células fueron tratadas con PTH durante 6-48 horas, seguido de análisis por Western blot usando anticuerpos específicos.

la familia de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) al que se le detectó localización nuclear en células de riñón, hígado, intestino, útero y ovario de rata.²⁸ En cultivos sincronizados de células osteoblásticas murinas MC3T3-E1, el RPTH1 trafica al núcleo durante el tiempo de duplicación del ADN²⁹ y forma un complejo con proteínas reguladoras del transporte nuclear, importina α 1 e importina β .³⁰ Además se reportó que el receptor se localiza en el nucleoplasma y que esta ubicación se asocia a ciertas etapas del ciclo celular.²⁹ De acuerdo con estos datos, demostramos que el receptor RPTH1, en presencia de suero, se localiza en la membrana plasmática, el núcleo y citoplasma de las células Caco-2.¹⁸ Sin embargo, en ausencia de suero, observamos que el receptor de PTH se

ubica exclusivamente en el núcleo, en estas células intestinales. Si bien el significado de la presencia del RPTH1 en el núcleo se desconoce, y aunque la señalización a través del receptor de PTH involucra la activación de vías mensajeras citosólicas tales como AC/AMPC/PKA y PLC/IP₃/DAG, no deben descartarse efectos nucleares directos en la regulación génica. Al respecto, aunque la mayoría de los GPCR nucleares parecen regular vías de señalización similares a las observadas en la superficie celular,³¹ algunos de estos receptores regulan más directamente eventos nucleares tales como la síntesis de ADN,²⁹ la iniciación de la transcripción,³² la expresión de genes,³³⁻³⁵ y la modificación de las histonas.³⁶

Nuestras investigaciones previas indicaban que PTH tiene efectos proapoptóticos y



antiproliferativos en las células Caco-2. Los resultados presentados en este trabajo muestran que, en ausencia de suero, el tratamiento con la hormona solo en la dosis de 10^{-8} M disminuye el número de células vivas pero sin que se observen cambios en concentraciones menores (10^{-12} - 10^{-10} M), confirmando además que en estas dosis la PTH no tiene efectos opuestos (proliferativos y/o antiapoptóticos) a aquellos observados en 10^{-8} M.

Se sabe que el ciclo celular es regulado principalmente por complejos que contienen CDKs y ciclinas, que son esenciales para la progresión del ciclo celular y su inactivación conduce al arresto del ciclo celular.^{37,38} Los complejos responsables de la progresión celular a través de la fase G1 del ciclo celular y el inicio de la replicación del ADN incluyen ciclina D-CDK4/CDK6 y ciclina E-CDK2.³⁹ La proliferación aberrante de las células cancerosas implica la desregulación de los principales reguladores de la fase G1 del ciclo celular, y la sobreexpresión de las ciclinas y CDK proporciona un crecimiento selectivo de las células del tumor.⁴⁰ Por lo tanto, el estudio de los complejos CDK-ciclina que promueven la progresión del tumor es terapéuticamente relevante para el tratamiento del cáncer. Previamente observamos que, en las células Caco-2 cultivadas con baja dosis de suero, PTH aumenta la expresión de la proteína inhibitoria del ciclo celular p27Kip1 y disminuye la expresión de las ciclinas D1 y D3 y de la quinasa dependiente de la ciclina CDK6.²¹ Sin embargo, en el presente trabajo comprobamos que solamente la expresión de la proteína inhibitoria p15INK4B es afectada por el tratamiento con PTH en ausencia de suero. Asimismo, p15INK4B es un miembro de la familia de los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina D (CDK1) que induce el arresto del ciclo celular en la fase G1. Esta proteína se une tempranamente en la fase G1 a CDK4 o 6 y evita su interacción con la ciclina D.^{41,42} La sobreexpresión de p15INK4B y el incremento de su nivel proteico llevan al arresto del crecimiento

en varios sistemas *in vivo* e *in vitro*.⁴³ Se ha observado que, en células de músculo liso vascular, el mutante del análogo tumoral de PTH (PTHrP) inhibe la proliferación de estas células incrementando el nivel de expresión de p15INK4B y p27Kip1.⁴⁴

Es sabido que en un modelo celular, PTH puede ejercer efectos opuestos incluso activando la misma vía de señalización. Este comportamiento particular de la hormona podría deberse a diferencias en las condiciones experimentales.⁴⁻⁶ PTH estimula la actividad de la adenilil ciclasa en células óseas humanas cultivadas tanto en una densidad celular alta como baja. Sin embargo, la hormona estimula la proliferación de estas células solo cuando se cultivaron en una densidad celular alta.⁵ Nosotros hemos observado un efecto antiproliferativo de PTH en las células Caco-2 cultivadas sin suero y en bajas dosis de suero. Sin embargo, la presencia o ausencia de suero puede modificar la respuesta celular a PTH. Al respecto, la sobreexpresión del PTHrP, capaz de unirse al mismo receptor que PTH (RPTH1), promueve la proliferación en la línea intestinal de rata IEC-6 en presencia de suero,⁴⁵ pero su ausencia induce apoptosis.⁴⁶

PTH también puede ejercer el mismo efecto activando distintas vías de señalización y la presencia de RPTH1 en el núcleo podría tener un papel clave al respecto. En este sentido, Jong y col. demostraron que la activación del receptor mGluR5 intracelular genera distintas respuestas del Ca^{2+} , así como de las cascadas de señalización con respecto al receptor ubicado en la superficie celular. La activación por el glutamato del receptor intracelular mGluR5 participa en la regulación del Ca^{2+} nuclear, la activación transcripcional y la expresión génica necesaria para procesos fisiológicos tales como la plasticidad sináptica. La activación del receptor mGluR5 tanto de la superficie celular como intracelular conduce la fosforilación de JNK, la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulin- (CaMK) y CREB, mientras que solo la activación de

mGluR5 intracelular conduce a la fosforilación de ERK1/2 y de Elk-1.³³

Conclusión

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que PTH en una dosis de 10^{-8} M arresta la progresión del ciclo celular en las células Caco-2 tanto en presencia como en ausencia de suero; sin embargo, según las condiciones experimentales, este efecto sería mediado por distintas proteínas asociadas al ciclo celular, fenómeno que podría deberse a la ubicación exclusivamente nuclear del receptor de PTH, en ausencia de suero, en estas células intestinales. Una mayor com-

prensión de los fenómenos moleculares desencadenados por PTH y RPTH1 en células intestinales derivadas de adenocarcinoma de colon humano permitirá conocer su participación en cascadas de transducción de señales que deriven en el arresto del ciclo celular o la muerte celular programada.

El cáncer colorrectal está ubicado entre las primeras causas más frecuentes de mortalidad por enfermedad maligna en el mundo occidental.^{47,48} Los avances en las investigaciones de los mecanismos de regulación del ciclo celular podrían aportar nuevos conocimientos acerca de las interacciones moleculares involucradas en este tipo de cáncer.

Referencias

1. Viillard JF, Lacombe F, Belloc F, Pellegrin JL, Reiffers J. Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology. *Cancer Radiother* 2001; 5:109-29.
2. Datta NS, Pettway GJ, Chen C, Koh AJ, McCauley LK. Cyclin D1 as a target for the proliferative effects of PTH and PTHrP in early osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 2007; 22:951-64.
3. Qin L, Li X, Ko JK, Partridge NC. Parathyroid Hormone Uses Multiple Mechanisms to Arrest the Cell Cycle Progression of Osteoblastic Cells from G1 to S Phase. *J Biol Chem* 2005; 280:3104-11.
4. Swarthout JT, Doggett TA, Lemker JL, Partridge NC. Stimulation of Extracellular Signal-regulated Kinases and Proliferation in Rat Osteoblastic Cells by Parathyroid Hormone Is Protein Kinase C-dependent. *J Biol Chem* 2001; 276:7586-92.
5. MacDonald BR, Gallagher JA, Russell RG. Parathyroid hormone stimulates the proliferation of cells derived from human bone. *Endocrinology* 1986; 118:2445-9.
6. Finkelman RD, Mohan S, Linkhart TA, Abraham SM, Boussy JP, Baylink DJ. PTH stimulates the proliferation of TE-85 human osteosarcoma cells by a mechanism not involving either increased cAMP or increased secretion of IGF-I, IGF-II or TGF beta. *Bone Miner* 1992; 16:89-100.
7. Onishi T, Zhang W, Cao X, Hruska K. The mitogenic effect of parathyroid hormone is associated with E2F-dependent activation of cyclin-dependent kinase 1 (cdc2) in osteoblast precursors. *J Bone Miner Res* 1997; 12:1596-605.
8. Beier F, LuValle P. The cyclin D1 and cyclin A genes are targets of activated PTH/PTHrP receptors in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *Mol Endocrinol* 2002; 16:2163-73.
9. Partridge NC, Opie AL, Opie RT, Martin TJ. Inhibitory effects of parathyroid hormone on growth of osteogenic sarcoma cells. *Calcif Tissue Int* 1985; 37:519-25.
10. Onishi T, Hruska K. Expression of p27Kip1 in Osteoblast-Like Cells during Differentiation with Parathyroid Hormone. *Endocrinology* 1997; 138:1995-2004.
11. Nasu M, Sugimoto T, Kaji H, Chihara K. Es-



- trogen modulates osteoblast proliferation and function regulated by parathyroid hormone in osteoblastic SaOS-2 cells: role of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-5. *J Endocrinol* 2000; 167:305-13.
12. Gentili C, Boland R, Russo de Boland A. PTH stimulates PLCbeta and PLCgamma isoenzymes in rat enterocytes: influence of ageing. *Cell Signal* 2001; 13:131-8.
 13. Gentili C, Morelli S, Boland R, Russo de Boland A. Parathyroid hormone activation of map kinase in rat duodenal cells is mediated by 3',5'-cyclic AMP and Ca²⁺. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1540:201-12.
 14. Gentili C, Russo de Boland A. Age-related decline in mitogen-activated protein kinase phosphorylation in PTH-stimulated rat enterocytes. *Exp Gerontol* 2000; 35: 1003-15.
 15. Gentili C, Morelli S, Russo de Boland A. 1alpha,25(OH)2D3 and parathyroid hormone (PTH) signaling in rat intestinal cells: activation of cytosolic PLA2. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89-90:297-301.
 16. Gentili C, Morelli S, Russo de Boland A. Involvement of PI3-kinase and its association with c-Src in PTH-stimulated rat enterocytes. *J Cell Biochem* 2002; 86: 773-83.
 17. Gentili C, Morelli S, Russo de Boland A. Characterization of PTH/PTHrP receptor in rat duodenum: effects of ageing. *J Cell Biochem* 2003; 88:1157-67.
 18. Calvo N, German O, Russo de Boland A, Gentili C. Pro-apoptotic effects of PTH in intestinal cells. *Biochem Cell Biol* 2009; 87:389-400.
 19. Calvo N, Gentili C, Russo de Boland A. The early phase of programmed cell death in caco-2 intestinal cells exposed to PTH. *J Cell Biochem* 2008; 105:989-97.
 20. Calvo N, Russo de Boland A, Gentili C. PTH inactivates the AKT survival pathway in the colonic cell line Caco-2. *Biochim Biophys Acta MCR* 2010; 1803:343-51.
 21. Calvo N, Gentili C, Russo de Boland A. Parathyroid hormone and the regulation of cell cycle in colon adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta MCR* 2011; 1813:1749-57.
 22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of proteins binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
 23. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
 24. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4.
 25. Abou-Samra AB, Jüppner H, Force T, et al. Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:2732-6.
 26. Jüppner H. Receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide: exploration of their biological importance. *Bone* 1999; 25:87-90.
 27. Usdin TB, Bonner TI, Harta G, Mezey E. Distribution of parathyroid hormone-2 receptor messenger ribonucleic acid in rat. *Endocrinology* 1996; 137:4285-97.
 28. Jans DA, Hassan G. Nuclear targeting by growth factors, cytokines, and their receptors: a role in signaling. *Bioessays* 1998; 20:400-11.
 29. Watson PH, Fraher LJ, Watson PH, et al. Nuclear localization of the type 1 parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor in MC3T3-E1 cells: association with serum induced cell proliferation. *Bone* 2000; 26:221-5.
 30. Pickard BW, Hodsman AB, Fraher LJ, Watson PH. Type 1 parathyroid hormone receptor (PTH1R) nuclear trafficking: association of PTH1R with importin alpha1 and beta. *Endocrinology* 2006; 147: 3326-32.
 31. Boivin B, Vaniotis G, Allen BG, Hébert TE. G protein-coupled receptors in and on the cell nucleus: a new signaling paradigm?. *J Recept Signal Transduct Res* 2008; 28: 15-28.

32. Boivin B, Lavoie C, Vaniotis G, et al. Functional β -adrenergic receptor signalling on nuclear membranes in adult rat and mouse ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2006; 71:69-78.
33. Jong YJ, Kumar V, O'Malley KL. Intracellular metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) activates signaling cascades distinct from cell surface counterparts. *J Biol Chem* 2009; 284:35827-38.
34. Savard M, Barbaz D, Belanger S, et al. Expression of endogenous nuclear bradykinin B2 receptors mediating signaling in immediate early gene activation. *J Cell Physiol* 2008; 216:234-44.
35. Vaniotis G, Del Duca D, Trieu P, Rohlicek CV, Hébert TE, Allen BG. Nuclear β -adrenergic receptors modulate gene expression in adult rat heart. *Cell Signal* 2011; 23:89-98.
36. Re M, Pampillo M, Savard M, et al. The human gonadotropin releasing hormone type I receptor is a functional intracellular GPCR expressed on the nuclear membrane. *PLoS One* 2010; 5:e11489.
37. Devault A, Cavadore JC, Fesquet D, et al. Concerted roles of cyclin A, cdc25+ mitotic inducer, and type 2A phosphatase in activating the cyclin B/cdc2 protein kinase at the G2/M phase transition. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1991; 56:503-13.
38. Van den Heuvel S, Harlow E. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* 1993; 262:2050-4.
39. Sherr CJ, Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 2004; 18:2699-711.
40. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274:1672-7.
41. Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 1994; 371:257-61.
42. Wolff L, Garin MT, Koller R, et al. Hypermethylation of the Ink4b locus in murine myeloid leukemia and increased susceptibility to leukemia in p15(Ink4b)-deficient mice. *Oncogene* 2003; 22:9265-74.
43. Fuxe J, Akusjärvi G, Goike HM, Roos G, Collins VP, Pettersson RF. Adenovirus-mediated overexpression of p15INK4B inhibits human glioma cell growth, induces replicative senescence, and inhibits telomerase activity similarly to p16INK4A. *Cell Growth Differ* 2000; 11:373-84.
44. Fiaschi-Taesch N, Sicari B, Ubriani K, Cozar-Castellano I, Takane KK, Stewart AF. Mutant parathyroid hormone-related protein, devoid of the nuclear localization signal, markedly inhibits arterial smooth muscle cell cycle and neointima formation by coordinate up-regulation of p15Ink4b and p27kip1. *Endocrinology* 2009; 150:1429-39.
45. Ye Y, Falzon M, Seitz PK, Cooper CW. Overexpression of parathyroid hormone-related protein promotes cell growth in the rat intestinal cell line IEC-6. *Regul Pept* 2001; 99:169-74.
46. Ye Y, Wang C, Du P, Falzon M, Seitz PK, Cooper CW. Overexpression of parathyroid hormone-related protein enhances apoptosis in the rat intestinal cell line, IEC-6. *Endocrinology* 2001; 142:1906-14.
47. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1996. *CA Cancer J Clin* 1996; 46:5-27.
48. Martin R, Paty P, Fong Y, et al. Simultaneous liver and colorectal resections are safe for synchronous colorectal liver metastasis. *J Am Coll Surg* 2003; 197:233-41.