



ACTUALIZACIONES / *Reviews*

MECANISMO DE ACCIÓN DE PTH EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE COLON HUMANO

Claudia Gentili, Natalia Calvo, Ana Russo de Boland *

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

Resumen

El concepto sobre el rol de la hormona paratiroidea (PTH) actuando sobre los tejidos blanco clásicos (hueso y riñón) se ha expandido a tejidos no clásicos como el intestino donde ejerce importantes funciones regulatorias. En células intestinales, PTH luego de unirse a su receptor (PTHr1) en la membrana plasmática, activa las vías de señalización de AMP γ /PKA, DAG/IP $_3$ /PKC, las cascadas de las MAP quinasas y regula la concentración de Ca $^{2+}$ intracelular. En la línea celular intestinal Caco-2, derivada de adenocarcinoma de colon humano, el tratamiento con PTH en ausencia de suero disminuye el número de células viables e induce cambios morfológicos consistentes con la apoptosis: alteración de los filamentos de actina y consecuentemente de la forma celular, pérdida de las uniones intercelulares, externalización de la fosfatidilserina de membrana, distribución perinuclear de las mitocondrias, condensación nuclear y fragmentación del ADN. Además la hormona induce la desfosforilación de la proteína pro-apoptótica Bad, su disociación de la proteína 14-3-3 y su translocación a las mitocondrias con la consecuente liberación de citocromo c y Smac/Diablo al citosol, lo que resulta en la activación de caspasa-3 y el clivaje de su sustrato PARP. En estas células, PTH además de activar la vía mitocondrial de la apoptosis, inhibe la vía de supervivencia de

AKT mediante la acción concertada de la serina-treonina fosfatasa PP2A y la vía del AMPc. El conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la apoptosis de células intestinales podría ser utilizado para generar fármacos pro-apoptóticos en el tratamiento del cáncer de colon humano.

Palabras clave: PTH, apoptosis, células intestinales, adenocarcinoma de colon

Summary

MECHANISM OF ACTION OF PTH ON CELLS OF HUMAN COLONIC ADENOCARCINOMA

Parathyroid hormone (PTH) besides acting on the classical target tissues, bone and kidney, regulates important physiological functions in the intestine. In intestinal cells, PTH, after binding to its receptor (PTHr1) at the plasma membrane, activates γ AMP/PKA, DAG/IP $_3$ /PKC signal transduction pathways, MAP kinases cascades and regulates intracellular Ca $^{2+}$ concentration. In the intestinal cell line Caco-2, derived from human colorectal adenocarcinoma, PTH treatment in serum free medium diminished the number of viable cells. Moreover, the hormone induced disruption of actin filaments with changes to cellular shape, alteration of cell-to-cell

* Correo electrónico: aboland@criba.edu.ar

junctions, externalization of membrane phosphatidylserine, mitochondrial cellular distribution to the perinuclear region, chromatin condensation and DNA fragmentation of the nucleus, which are morphological features consistent with apoptosis. In addition, the hormone induces the dephosphorylation of pro-apoptotic protein Bad, its dissociation of 14-3-3 protein and its translocation to the mitochondria with the subsequent release of cytochrome c and Smac/Diablo to the cytosol which resulted in activation of downstream caspase-3 and degradation of its substrate PARP. In these cells, PTH, besides activating the mitochondrial pathway of apoptosis, inhibits AKT survival pathway via the serine/threonine phosphatase PP2A and cAMP. Knowledge of the molecular mechanisms involved in apoptosis of intestinal cells could be used to generate pro-apoptotic drugs in the treatment of human colon cancer.

Key words: PTH, apoptosis, intestinal cells, colon adenocarcinoma

PTH: generalidades, mecanismo de acción en tejidos blanco

La hormona paratiroidea (PTH) es un polipéptido de 84 aminoácidos secretado por las glándulas paratiroideas. Regula la homeostasis del calcio, siendo el hueso y el riñón sus principales órganos blanco.¹ PTH, estimulando a la 1α -hidroxilasa renal, regula la síntesis de la forma hormonalmente activa de la vitamina D, $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamina D₃, que a su vez funciona en el duodeno aumentando la absorción intestinal de calcio.² En la mayoría de las células, PTH inicia sus efectos interactuando con el receptor tipo 1 acoplado a proteínas G (PTHr1), que posee siete dominios transmembrana, con un dominio amino terminal extracelular donde se une la hormona y un largo dominio carboxilo terminal intracelular.³ Hasta el presente,

se ha encontrado un solo receptor en osteoblastos⁴ y en células duodenales,⁵ pero se ha descrito un segundo receptor de PTH (PTHr2), en páncreas, cerebro, riñón y testículos⁶ y se ha postulado la existencia de otros.⁷ A pesar de ser un típico receptor de membrana, también se ha localizado al PTHr1 en el núcleo de células de riñón, hígado, intestino, útero y ovario de rata,⁸ en células MC3T3-E1⁹ y duodenales.⁵ El significado de la presencia nuclear del receptor de PTH no ha sido aclarado aún; es posible que PTHr1 transloque al núcleo para participar directamente en la regulación génica. Luego de unirse a su receptor en la membrana plasmática de los tejidos blanco, PTH estimula a la adenilil ciclasa con producción de AMPc, y a la fosfolipasa C que provoca la hidrólisis de fosfatidil inositol 4,5 bifosfato generando inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG).^{10,11} Luego de formarse estos segundos mensajeros, el AMPc activa a la proteína quinasa A (PKA),¹² el IP₃ libera calcio de depósitos intracelulares¹³ y el DAG activa a la proteína quinasa C (PKC)¹⁴ la cual una vez activada transloca a la membrana plasmática, donde activa, por fosforilación, canales de calcio.^{15,16} PTH también estimula otras vías de señalización intracelular, como a la fosfolipasa A2 (PLA2) que cataliza la hidrólisis de fosfolípidos generando ácidos grasos libres y lisofosfolípidos¹⁷ y a la fosfolipasa D (PLD) que cataliza la hidrólisis de fosfatidilcolina generando ácido fosfatídico.¹⁸ La hormona también activa a las cascadas de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), una familia de enzimas que regulan la proliferación y diferenciación celular.¹⁹ Se ha demostrado su participación en la proliferación de células osteoblásticas, renales e intestinales.²⁰⁻²² En células intestinales se demostró que la vía de la adenil ciclasa/AMPc/PKA, el calcio y la tirosina quinasa citosólica cSrc son parte del mecanismo por el cual PTH activa a las MAP quinasas ERK1 y ERK2 y vía incrementos en calcio intracelular a JNK1/2.^{22,23}



Vías de señalización y cáncer colorrectal

El intestino es uno de los tejidos que prolifera más rápidamente en el cuerpo. Un balance dinámico entre la proliferación celular en la cripta de las vellosidades y la pérdida de los enterocitos a través de la apoptosis o exfoliación mantiene la integridad del epitelio intestinal. La apoptosis es una forma de muerte celular genéticamente programada; puede ser activada o inhibida por una variedad de estímulos, tanto fisiológicos como patológicos y necesita de mecanismos de regulación de gran exactitud y seguridad. Una apoptosis defectuosa, que resulta en la falla de la muerte de una célula es responsable de un daño pre-maligno, permitiendo la progresión de enfermedades y la resistencia de células cancerosas a terapias citotóxicas, mostrando la importancia de la apoptosis en el tracto gastrointestinal.²⁴

El cáncer colorrectal está ubicado entre las primeras causas más frecuentes de mortalidad por enfermedad maligna en el mundo occidental y la carcinogénesis de esta enfermedad es un proceso complejo que involucra una disfunción progresiva de la proliferación del epitelio intestinal, apoptosis, diferenciación y mecanismos de supervivencia.²⁵ En medicina, es creciente el interés por entender los mecanismos moleculares que conducen a la patogénesis, progresión y metástasis del cáncer colorrectal y por conocer nuevos agentes químicos que inhiban las vías de señalización involucradas en estos procesos con el fin de generar nuevas perspectivas en el tratamiento del cáncer de colon humano. En este tipo de cáncer, son numerosos los trabajos de investigación que estudian la desregulación de las vías de señalización de las MAP quinasas ERK1/2 y fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)/AKT y los inhibidores específicos para ambas vías capaces de inducir apoptosis e inhibir el ciclo celular. Las isoformas de 42 y 44 KDa de ERK tienen un rol clave en una variedad de carcinomas humanos.²⁶ Normalmente, la activación de estas

quinasas es compleja, finamente regulada y requiere de una serie de eventos que involucra a la proteína Ras, que activa a Raf, que a su vez fosforila a la quinasa MEK activándola y ésta activa a las ERK1/2 fosforilándolas en residuos de tirosina y treonina. Sin embargo, hay evidencia que demuestra que esta vía de señalización está desregulada en el cáncer colorrectal humano y en tumores de colon de modelos animales.²⁷ La activación permanente de las ERKs puede deberse a una mutación y activación de Ras, de Raf o por la sobreexpresión y activación del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGF).

En los últimos años, se observó que las alteraciones de la vía de señalización PI3K-AKT son frecuentes en el cáncer humano. AKT es una serina treonina quinasa que participa en la regulación de diferentes procesos celulares tales como proliferación, ciclo celular, supervivencia e inhibición de la apoptosis y requiere ser fosforilada para su activación completa.²⁸ La fosforilación de AKT ocurre a través de segundos mensajeros generados por PI3K y está altamente regulada por un balance entre eventos activados por quinasas e inactivados por fosfatasas, tales como la serina/treonina fosfatasa 2A (PP2A), que está involucrada en diversas funciones celulares, incluyendo la apoptosis.²⁹ En el cáncer de colon, la activación constitutiva de la vía PI3K-AKT puede ser debida a mutaciones de la subunidad catalítica p110 de PI3K, mutaciones de la subunidad regulatoria p85 de PI3K, activación de AKT ya sea por amplificación génica o hiperfosforilación o como resultado de mutaciones en los componentes de la vía.³⁰⁻³³

PTH y apoptosis en células de adenocarcinoma de colon humano

PTH puede inhibir o promover la apoptosis, dependiendo del tipo y contexto celular. En las células intestinales, la sobreexpresión del análogo tumoral de PTH (PTHrP) incrementa la apoptosis en ausencia de suero. No obs-

tante, en presencia de suero, PTHrP aumenta la proliferación de estas células a través de una vía intracrina.^{34,35} Además, se ha visto recientemente que PTHrP incrementa el crecimiento xenográfico y la activación de AKT en la línea celular de cáncer de colon humano LoVo.³⁶ En las células Caco-2, derivadas de adenocarcinoma de colon humano se demostró que, en ausencia de suero, PTH disminuye el número de células viables e induce cambios morfológicos consistentes con la apoptosis tales como alteración de los filamentos de actina y consecuentemente de la forma celular, pérdida de las uniones intercelulares, externalización de la fosfatidilserina de membrana plasmática, distribución perinuclear de las mitocondrias, condensación nuclear y fragmentación del ADN.³⁷

La apoptosis puede ser activada a partir de dos vías de señalización distintas. Una vía extrínseca que es iniciada por receptores de muerte (vía de los receptores de muerte), y otra vía intrínseca o mitocondrial que es regulada por miembros anti- y pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 e involucra la liberación hacia el citosol de varios componentes mitocondriales tales como citocromo c y Smac-Diablo que una vez en el citosol, promueven la activación de las caspasas, que son enzimas que favorecen la apoptosis.^{38,39} En las células Caco-2, PTH activa la vía de señalización mitocondrial provocando la desfosforilación de la proteína pro-apoptótica Bad, su disociación de la proteína 14-3-3 y su translocación a las mitocondrias que conduce a la liberación de los factores pro-apoptóticos citocromo c y Smac-Diablo desde las mitocondrias al citosol con la consecuente activación de la caspasa-3 y la degradación de su sustrato PARP.⁴⁰

En varios tipos de cánceres la vía de PI3K-AKT está permanentemente activada y, de acuerdo con estas observaciones, AKT está basalmente hiperfosforilada y constitutivamente activada en las células Caco-2. El tratamiento de estas células intestinales con PTH provoca la desfosforilación e inactivación de AKT a través de la fosfatasa PP2A,

que a su vez es activada por la hormona vía el AMP_c.⁴¹

La apoptosis y la proliferación celular están vinculados por ciertos reguladores del ciclo celular y un estímulo apoptótico puede afectar tanto la proliferación como la supervivencia. En las células Caco-2, PTH no afecta la expresión de p53, una proteína reguladora del ciclo celular, sugiriendo que, en estas células, la hormona es un estímulo apoptótico que induce la muerte celular por un mecanismo independiente de p53.⁴¹ La Figura 1 resume los efectos pro-apoptóticos de PTH en células de adenocarcinoma de colon.

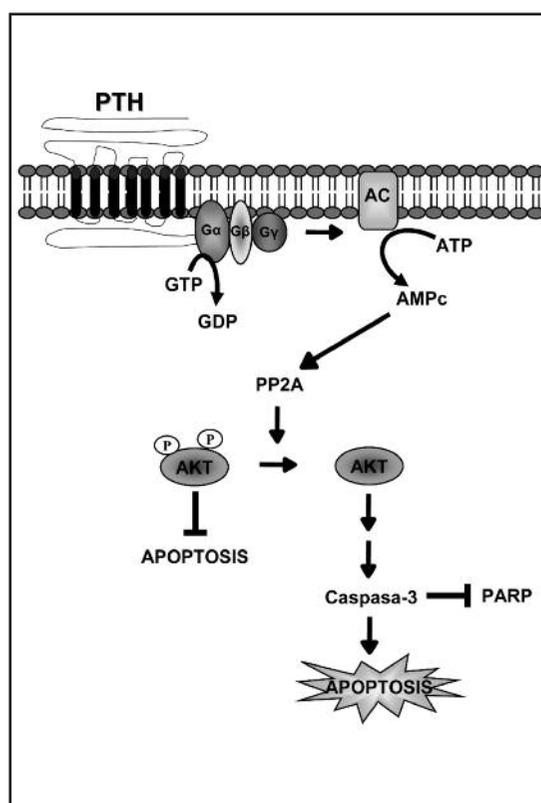


Figura 1. Eventos pro-apoptóticos en las células de adenocarcinoma de colon Caco-2: PTH induce la activación de la vía AMP_c-PP2A y la consecuente desfosforilación e inactivación de AKT que conduce a la activación de caspasa-3 y la degradación de su sustrato PARP.



Conclusiones

El concepto sobre el rol de PTH actuando sobre los tejidos blanco clásicos, hueso y riñón, se ha expandido al intestino donde ejerce importantes funciones regulatorias. Las células intestinales, incluyendo a las derivadas de adenocarcinoma de colon humano Caco-2, están dotadas de la maquinaria molecular que les permite responder a la hormona peptídica y constituyen un modelo apropiado para caracterizar la regulación por PTH de la proliferación, diferenciación y apoptosis.

En las células intestinales PTH desempeña un importante rol en los mecanismos celulares que regulan el calcio intracelular y las cascadas mitogénicas, y en las células Caco-2 desencadena –en ausencia de suero– efectos pro-apoptóticos a través de la vía mitocondrial de la apoptosis e inhibición de la vía de supervivencia de AKT mediante la acción concertada de la fosfatasa PP2A y la vía del AMPc.

El entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en estos procesos en las células de adenocarcinoma de colon humano es importante para generar nuevas estrategias terapéuticas en el área biomédica.

(Recibido y aceptado: noviembre de 2009)

Referencias

1. Strewler GJ. The physiology of parathyroid hormone-related protein. *N Engl J Med* 2000; 342:177-85.
2. Horiuchi N, Suda T, Sasaki S, Takahashi H, Shimazawa E, Ogata E. Absence of regulatory effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ on 25-hydroxyvitamin D metabolism in rats constantly infused with parathyroid hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 73:869-75.
3. Abou-Samra AB, Juppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E, Urena P, Richards J, Bonventre JV, Potts JT Jr, Kronenberg HM, Segre GV. 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.
4. Juppner H. Receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide: exploration of their biological importance. *Bone* 1999; 25:87-90.
5. Gentili C, Morelli S, de Boland AR. Characterization of PTH/PTHrP receptor in rat duodenum: Effects of ageing. *J Cell Biochem* 2003; 88:1157-67.
6. Usdin TB, Bonner TI, Harta G, Mezey E. Distribution of parathyroid hormone-2 receptor messenger ribonucleic acid in rat. *Endocrinology* 1996;137:4285-97.
7. Orloff JJ, Stewart AF. The carboxy-terminus of parathyroid hormone-inert or invaluable? *Endocrinology* 1995; 136:4729-31.
8. Jans DA, Hassan G. Nuclear targeting by growth factors, cytokines, and their receptors: a role in signaling. *Bioessays* 1998; 20:400-11.
9. Watson PH, Fraher LJ, Watson PH, Fraher LJ, Natale BV, Kisiel M, Hendy GN, Hodsman AB. 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.
10. Chase LR, Aurbach GD. The effect of parathyroid hormone on the concentration of adenosine 3',5'-monophosphate in skeletal tissue in vitro. *J Biol Chem* 1970; 245:1520-6.
11. Hruska KA, Moskowitz D, Esbrit P, Civitelli R, Westbrook S, Huskey M. Stimulation of inositol trisphosphate and diacylglycerol production in renal tubular cells by parathyroid hormone. *J Clin Invest* 1987; 79:230-9.

12. Partridge NC, Kemp BE, Veroni MC, Martin TJ. Activation of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in normal and malignant bone cells by parathyroid hormone, prostaglandin E₂, and prostacyclin. *Endocrinology* 1981; 108:220-5.
13. Reid IR, Civitelli R, Halstead LR, Avioli LV, Hruska KA. Parathyroid hormone acutely elevates intracellular calcium in osteoblast-like cells. *Am. J. Physiol.* 253:E45-51.
14. Civitelli R, Reid IR, Westbrook S, Avioli LV, Hruska KA. PTH elevates inositol polyphosphates and diacylglycerol in a rat osteoblast-like cell line. *Am J Physiol* 1988; 255:E660-7.
15. Abou-Samra AB, Jueppner H, Westerberg D, Potts JT Jr, Segre GV. Parathyroid hormone causes translocation of protein kinase-C from cytosol to membranes in rat osteosarcoma cells. *Endocrinology* 1989; 124:1107-13.
16. Yamaguchi DT, Kleeman CR, Muallen S. Protein kinase C-activated calcium channel in the osteoblast-like clonal osteosarcoma cell line UMR-106. *J Biol Chem* 1987; 262:14967-73.
17. Suarez F, Silve C. Effect of parathyroid hormone on arachidonic acid metabolism in mouse osteoblasts: permissive action of dexamethasone. *Endocrinology* 1992; 130:592-8.
18. Singh AT, Kunnel JG, Strielemann PJ, Stern PH. Parathyroid hormone (PTH)-(1-34), [Nle(8,18), Tyr34]PTH-(3-34) amide, PTH-(1-31) amide, and PTH-related peptide-(1-34) stimulate phosphatidylcholine hydrolysis in UMR-106 osteoblastic cells: Comparison with effects of phorbol 12,13-ibutyrate. *Endocrinology* 1999; 140:131-7.
19. Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 1995; 80:179-85.
20. Cole JA. Parathyroid hormone activates mitogen-activated protein kinase in opossum kidney cells. *Endocrinology* 1999; 140:5771-9.
21. 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.
22. Gentili C, Morelli S, Boland R, de Boland AR. Parathyroid hormone activation of MAP kinase in rat duodenal cells in mediated by 3',5'-cyclic AMP and Ca²⁺. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1540:201-12.
23. Buzzi N, Boland R, de Boland AR. PTH regulation of c-JUN terminal kinase and p38 MAPK cascades in intestinal cells from young and aged rats. *Biogerontology* 2007; 8:189-99.
24. Butler LM, Hewett PJ, Fitridge RA, Cowled PA. Deregulation of apoptosis in colorectal carcinoma: theoretical and therapeutic implications. *Aust N Z J Surg* 1999; 69:88-94.
25. Calvert PM, Frucht H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med* 2002; 137:603-12.
26. Liang B, Wang S, Zhu XG, Yu YX, Cui ZR, Yu YZ. Increased expression of mitogen-activated protein kinase and its upstream regulating signal in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11:623-8.
27. Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2005; 6:322-7.
28. Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signaling: A hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* 2001; 26:657-64.
29. Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, et al. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 2001; 70:535-602.
30. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al.. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004; 304: 554
31. Philp AJ, Campbell IG, Leet C, et al. The phosphatidylinositol 3V-kinase p85a gene



- is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res* 2001; 61:7426-9.
32. Roy HK, Olusola BF, Clemens DL, Karolski WJ, Ratashak A, Lynch HT, Smyrk TC. AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2002; 23:201-5.
 33. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 2004; 9:667-76.
 34. 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.
 35. 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.
 36. Shen X, Rychahou PG, Evers BM, Falzon M. PTHrP increases xenograft growth and promotes integrin alpha6beta4 expression and Akt activation in colon cancer. *Cancer Lett* 2007; 258:241-52.
 37. 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.
 38. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88:355-65.
 39. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000; 69:217-45.
 40. 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.
 41. Calvo N, Russo de Boland A, Gentili C. PTH inactivates the AKT survival pathway in the colonic cell line Caco-2. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803: 343-51.