



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**Tesis de Doctor en Biología**

**“MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ANÁLOGO TUMORAL DE  
LA HORMONA PARATIROIDEA (PTHrP) EN CÉLULAS DE  
CÁNCER DE COLON HUMANO”**

**María Julia Martín**

**Bahía Blanca**

**2018**

**Argentina**





**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**Tesis de Doctor en Biología**

**“MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ANÁLOGO  
TUMORAL DE LA HORMONA PARATIROIDEA  
(PTHrP) EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON  
HUMANO”**

**María Julia Martín**

**Bahía Blanca      2018      Argentina**

## PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia durante el período comprendido entre el 1 de Abril de 2013 y el 5 de diciembre de 2017, bajo la dirección de la Dra. Claudia Gentili, Profesora Adjunta de Estructura y Función del Cuerpo Humano e Investigadora Independiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Lic en Cs. Biológicas María Julia Martín



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación  
Continua

La presente tesis ha sido aprobada el ...../...../..... , mereciendo la  
calificación de .....(.....)

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional del Sur y al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia por facilitarme sus recursos y el equipamiento necesario para desarrollar esta Tesis Doctoral.

Al Dr. Ricardo Boland y a la Dra. Ana Russo de Boland, por abrirme las puertas del laboratorio de Química Biológica y brindarme la posibilidad de crecer en investigación.

A la Dra. Emma Casanave, por su gran apoyo en muchos sentidos, por darme apoyo tanto como profesora, como directora del INBIOSUR, Instituto del cual formo parte con orgullo.

Al CONICET, por otorgarme la beca para poder desarrollar mi doctorado en estos 5 años

A la Dra. Claudia Gentili por todo. Por elegir dirigirme, por su enorme paciencia y compromiso, su predisposición, su compañía. Por apoyarme en todo momento tanto en lo profesional como en lo personal. Por “educarme” en tantas cosas.

A la Dra. Natalia Calvo, por apoyarme cada vez que lo necesité, desde su experiencia, por sus palabras tranquilizadoras, sos una gran compañera.

Al Dr. Martín Abba y su equipo de trabajo, por darme un lugar y ayudarme en mis estadías en La Plata.

A La Dra Carbone, Martín Carriquirborde y Florencia Gentil, por su ayuda en los experimentos *in vivo* y sus consejos.

Al Doctor Horacio Maturi, el Dr. Ariel Swenger y la Dra. Graciela Gigola, por el aporte de sus conocimientos y por su ayuda en la histología e histopatología de los experimentos *in vivo*.

A las Dras. Verónica Gonzales Pardo, Susana Morelli, Claudia Buitrago, Virginia Lezcano, Paola Scodelaro y al Dr. Sebastian Katz por estar siempre dispuestos a responder inquietudes, por ayudarme durante estos años cada vez que lo requerí.

A Peter Carriere, Bele Novoa, Paula Roxette Irazoqui, Ale Suarez, Cintita Tapia por ser mis amigos, mis compañeros, con quienes compartí un sinnúmero de anécdotas, los quiero muchísimo.

A mi papa y mi mama que sin ellos no hubiese podido llegar hasta acá. Por ser mis ejemplos de esfuerzo, de dar lo mejor de mí misma. Y por estar siempre tan cerca, a pesar de vivir lejos. Los amo.

A mi hermano, a mi abuela, mis tíos y mis primas, quienes han tenido palabras de apoyo y de cariño.

A mis amigas Valen, Micky, Cintita, Maite, Sofi, por estar siempre que las necesité, por compartir este camino juntas.

A todos aquellos que me han acompañado y no he nombrado sus recuerdos los llevo conmigo.

## Resumen

La hormona paratiroidea (PTH) es un importante mediador de la remodelación ósea y actúa junto al calcitriol ( $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamina  $\text{D}_3$ ), como regulador esencial de la homeostasis del calcio y fósforo. El péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) es una poli hormona que tiene un papel importante en el desarrollo del feto y en la homeostasis de tejidos adultos actuando principalmente en forma parácrina. Puede ser expresada y secretada por varios tumores y es responsable de la hipercalcemia humoral maligna, siendo éste un signo de mal pronóstico en las neoplasias malignas. Al momento de comenzar este Trabajo de Tesis había poca información acerca del rol de PTHrP actuando como factor parácrino sobre células derivadas del cáncer colorrectal (CCR). En el presente Trabajo se evidencia que PTHrP es capaz de inducir un aumento en la proliferación celular de dos líneas celulares derivadas de CCR, las células Caco-2 y las células HCT116. Además, este efecto inducido por la hormona está modulado por las cascadas de señalización PKC, Src, Akt, ERK MAPK y  $\beta$ -catenina. Se observó que en las células tumorales intestinales la hormona mediante ERK MAPK desencadena el aumento de la expresión y/o activación por fosforilación de CREB/ATF-1, c-myc y ciclina D1, que son moléculas relevantes en la proliferación celular.

Acorde con lo observado *in vitro*, los experimentos desarrollados en el modelo murino revelan que la administración continua de la hormona en forma intra-tumoral modula la expresión de los marcadores claves en la progresión del CCR ERK, ciclina D1 y CREB/ATF-1.

Tanto las células tumorales intestinales normales como aquellas que sobre-expresan PTHrP responden a la acción de las hormonas calciotrópicas PTH y calcitriol, al menos a nivel transcripcional, disminuyendo la expresión de PTHrP.

PTHrP no sólo favorece la activación de vías mitogénicas y la proliferación de las células Caco-2 y HCT116, sino que también es capaz de disminuir la sensibilidad de estas células al Irinotecán (que es una droga comúnmente utilizada para la quimioterapia del CCR) mediante las vías de ERK MAPK y  $\beta$ -catenina.

Este trabajo aporta información original respecto al rol del análogo tumoral de PTH en células tumorales intestinales y los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta hormonal de estas células tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, profundiza el conocimiento respecto de los mecanismos moleculares modulados por las hormonas calciotrópicas PTH y calcitriol en células tumorales intestinales.

Un aporte de este Trabajo de Tesis es que al elucidar las vías de señalización que regulan los procesos inducidos por PTHrP y que favorecen la proliferación y/o quimiorresistencia, se podrían generar estrategias terapéuticas alternativas en el tratamiento del CCR cuya finalidad es inhibir la expresión de PTHrP o su mecanismo de acción en estas células tumorales.

## Summary

Parathyroid hormone (PTH) is an important mediator of bone remodeling and acts together with calcitriol ( $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{vitamin D}_3$ ), as an essential regulator of calcium and phosphorus homeostasis. The parathyroid hormone related peptide (PTHrP) is a poly hormone that has an important role in the development of the fetus and in the homeostasis of adult tissues acting mainly through paracrine pathways. It can be expressed and secreted by several tumors and is responsible for malignant humoral hypercalcemia, which is a sign of poor prognosis in malignant neoplasms. When this Thesis Work started, there was little information about the role of PTHrP acting as a paracrine factor on cells derived from colorectal cancer (CRC). In the present work it is demonstrated that PTHrP is able to induce an increase in the cellular proliferation of two cell lines derived from CRC, Caco-2 cells and HCT116 cells. In addition, this effect is modulated by PKC, Src, Akt, ERK MAPK and  $\beta$ -catenin. It was observed that in the intestinal tumor cells, the hormone triggers the increase of the expression and/or activation by phosphorylation of CREB/ATF-1, c-myc and cyclin D1, which are relevant molecules in the cell proliferation, through ERK MAPK.

In agreement with the observed *in vitro*, the experiments developed in the murine model revealed that the continuous administration of the hormone in an intra-tumoral manner modulates the expression of ERK, cyclin D1 and CREB / ATF-1, which are key markers in the progression of CRC.

Both, normal intestinal tumor cells and those that over-express PTHrP respond to the action of the calcitropic hormones PTH and calcitriol, at least at the transcriptional level, by decreasing the expression of PTHrP.

PTHrP not only activates mitogenic pathways and induces the proliferation of Caco-2 and HCT116 cells, but it is also capable of decreasing the sensitivity of these cells to Irinotecan (which is a drug commonly used for CRC chemotherapy) through ERK MAPK and  $\beta$ -catenin pathways.

This work provides original information about the role of the tumor analog of PTH in intestinal tumor cells and the molecular mechanisms involved in the hormonal response of these cells, both *in vitro* and *in vivo*. In addition, this work expands the knowledge regarding the molecular mechanisms modulated by the calcitropic hormones PTH and calcitriol in intestinal tumor cells.

The contribution of this Thesis work is that by elucidating the signaling pathways that regulate the processes induced by PTHrP and that contribute to the proliferation and/or chemoresistance, alternative therapeutic strategies could be generated in the treatment of CRC whose purpose is to inhibit the expression of PTHrP or its mechanism of action in these tumor cells.

**Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurado**

# ÍNDICE

<b>1. Antecedentes</b> .....	<b>1</b>
1.1. El calcitriol, la hormona paratiroidea (PTH) y su análogo tumoral (PTHrP): generalidades y mecanismos de acción en tejidos “target”.....	1
1.2. Rol de PTHrP en el cáncer.....	4
1.3. El cáncer colorrectal (CCR). Bases moleculares de esta enfermedad.....	5
1.4. Vías de señalización involucradas en la patogénesis y progresión del CCR.....	5
1.4.1. La vía de señalización de las MAP quinasas.....	5
1.4.2. La vía de señalización PI3K/Akt.....	7
1.4.3. La tirosina quinasa Src.....	10
1.4.4. La familia de proteínas quinasas C (PKC).....	12
1.4.5. La vía de señalización de $\beta$ -Catenina.....	14
1.5. Terapéutica en el CCR y quimiorresistencia.....	16
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>17</b>
<b>3. Hipótesis</b> .....	<b>19</b>
<b>4. Materiales y Métodos</b> .....	<b>20</b>
4.1 Modelos experimentales.....	20
4.1.1 Líneas celulares intestinales Caco-2 y HCT116.....	20
4.1.2. Línea celular intestinal Caco-2 con sobreexpresión de PTHrP.....	21
4.1.3 Modelo murino.....	22
4.2. Obtención de lisado celular.....	22
4.3. Cuantificación de proteínas.....	23

4.4. Fraccionamiento subcelular .....	23
4.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) .....	23
4.6. Electrotransferencia e Inmunoblotting.....	24
4.7. Remoción de anticuerpos de las membranas .....	24
4.8. Evaluación de los niveles proteicos de PTHrP en un medio libre de proteínas .....	25
4.9. Inmunocitoquímica .....	25
4.10. Ensayos de viabilidad celular.....	26
4.10.1. CellTiter-Blue® Assay.....	26
4.10.2. Tinción con cristal violeta.....	26
4.10.3. Ensayo de exclusión del colorante azul de Tripano .....	26
4.11. RT-PCR Cuantitativa en Tiempo Real .....	27
4.12. Inmunohistoquímica.....	28
4.13. Evaluación de las tinciones inmunohistoquímicas por Índice de expresión.....	28
4.14. Análisis estadístico .....	28
<b>5. Resultados .....</b>	<b>29</b>

**CAPÍTULO I: Efectos de PTHrP en la proliferación celular y en la modulación de vías mitogénicas *in vitro* e *in vivo***..... 30

**Sección I: Modulación por PTHrP de las vías de señalización de PI3K/Akt y MAPKs**..... 31

1.1. PTHrP (1-34) exógeno estimula la proliferación en células Caco-2 .....	31
1.2. PTHrP induce la fosforilación/activación de MAPKs en las células Caco-2.....	33
1.3. PTHrP estimula la fosforilación/activación de la quinasa Akt a través de la vía de señalización de PI3K en células Caco-2.....	35
1.4. PTHrP induce la localización nuclear de ERK, $\alpha$ 38 MAPK y Akt.....	37
1.5. En las células HCT116, PTHrP estimula la fosforilación/activación de Akt y ERK e induce un aumento en la proliferación celular.....	39

1.6 Vías de señalización involucradas en la activación de ERK 1/2 MAPK inducida por PTHrP en las células Caco-2 y en las células HCT116 .....	42
1.6.1 PTHrP induce la fosforilación y la activación de la quinasa c-Src en las células Caco-2 y en las células HCT116.....	42
1.6.2 Rol de PTHrP en los cambios de expresión de la isoenzima $\alpha$ de la proteína quinasa C en las células Caco-2 y en las células HCT116 .....	43
1.6.3. Las vías de señalización PKC, Src y Akt modulan la fosforilación y la activación de ERK 1/2 inducida por PTHrP en células tumorales intestinales .....	44
1.7. PTHrP estimula la proliferación de células Caco-2 y de las células HCT116 a través de la vía de señalización de ERK 1/2 MAPKs.....	47
<u>Sección II:</u> Modulación por PTHrP de la vía de señalización de $\beta$ -catenina.....	48
1. PTHrP promueve la fosforilación de $\beta$ -catenina en residuos de serina 552 y de serina 675. ....	48
2. PTHrP fosforila a $\beta$ -catenina en residuos de serina 552 y de serina 675 a través de las vías Akt y MAPKs. ....	49
3. PTHrP favorece la ubicación nuclear de $\beta$ -catenina .....	51
4. PTHrP aumenta la proliferación celular a través del estímulo de la actividad trascricional en respuesta a $\beta$ -catenina .....	53
<u>Sección III:</u> Modulación por PTHrP de eventos moleculares relevantes para la progresión del CCR .....	54
1. PTHrP induce la fosforilación/activación de los factores de transcripción CREB / ATF-1.....	54
2. Participación de las MAP quinasas en la fosforilación de CREB / ATF-1 dependiente de PTHrP. ....	56
3. PTHrP aumenta la expresión proteica de c-myc y ciclina D1 en las células Caco-2 .....	58
4. Los cambios de expresión proteica de c-myc y ciclina D1 inducidos por PTHrP dependen de la vía de señalización ERK 1/2 en células tumorales intestinales. ....	59
<u>Sección IV:</u> Efectos de PTHrP <i>in vivo</i> .....	60
<u>CAPÍTULO II: Modulación de la expresión de PTHrP por las hormonas calciotrópicas PTH y calcitriol</u>	

.....	63
1. Efectos de PTH en el control de la expresión de PTHrP.....	64
1.1. PTH disminuye el número de células Caco-2 vivas .....	64
1.2. PTH modula los niveles de ARNm de PTHrP en células Caco-2 normales.....	65
1.3. PTH modula los niveles de ARNm de PTHrP en células Caco-2 que sobre-expresan PTHrP. ....	66
1.4. El tratamiento con PTH no afecta el número de células Caco-2 vivas que sobre-expresan PTHrP. .....	67
2. Efectos del calcitriol en el control de la expresión de PTHrP. ....	69
2.1. Calcitriol disminuye el número de células Caco-2 vivas.....	69
2.2. El calcitriol modula los niveles de ARNm de PTHrP en células Caco-2 normales.....	70
2.3. 1,25 (OH) <sub>2</sub> Vit D3 modula los niveles de ARNm de PTHrP en células Caco-2 que sobre-expresan PTHrP. ....	71
2.4. El tratamiento con calcitriol disminuye el número de células Caco-2 vivas que sobre-expresan PTHrP. .....	72
<u>CAPÍTULO III: Rol de PTHrP en la quimiorresistencia de células de CCR</u> .....	73
1. PTHrP exógeno disminuye la sensibilidad de células tumorales intestinales al agente quimioterapéutico Irinotecan .....	74
2. Los efectos de CPT-11 sobre los niveles de factores pro-apoptóticos y anti-proliferativos necesarios para la respuesta citotóxica en células tumorales intestinales son contrarrestados por PTHrP. ....	75
3. Las vías de señalización de ERK y de $\beta$ -catenina participan en la quimiorresistencia a CPT-11 inducida por PTHrP. ....	78
<b>6. Discusión</b> .....	<b>80</b>
<b>7. Conclusiones</b> .....	<b>89</b>
<b>8. Publicaciones originadas de esta Tesis</b> .....	<b>91</b>
<b>9. Bibliografía</b> .....	<b>95</b>

# 1. ANTECEDENTES

## **1.1 El calcitriol, la hormona paratiroidea (PTH) y su análogo tumoral (PTHrP): generalidades y mecanismos de acción en tejidos “target”.**

El calcitriol, también conocido como 1,25-dihidroxitamina D3 ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ), es una hormona esteroide que regula la calcemia y la fosfatemia en animales superiores, y se ha visto que induce múltiples respuestas celulares en diferentes tejidos adultos, entre ellas la proliferación, apoptosis, diferenciación, inflamación, invasión, angiogénesis y metástasis, y, por lo tanto, tiene el potencial de afectar el desarrollo y crecimiento del cáncer. Las acciones biológicas de calcitriol están mediadas por el receptor VDR, principalmente a través de respuestas genómicas, y en menor medida, no genómicas (Feldman et al., 2014).

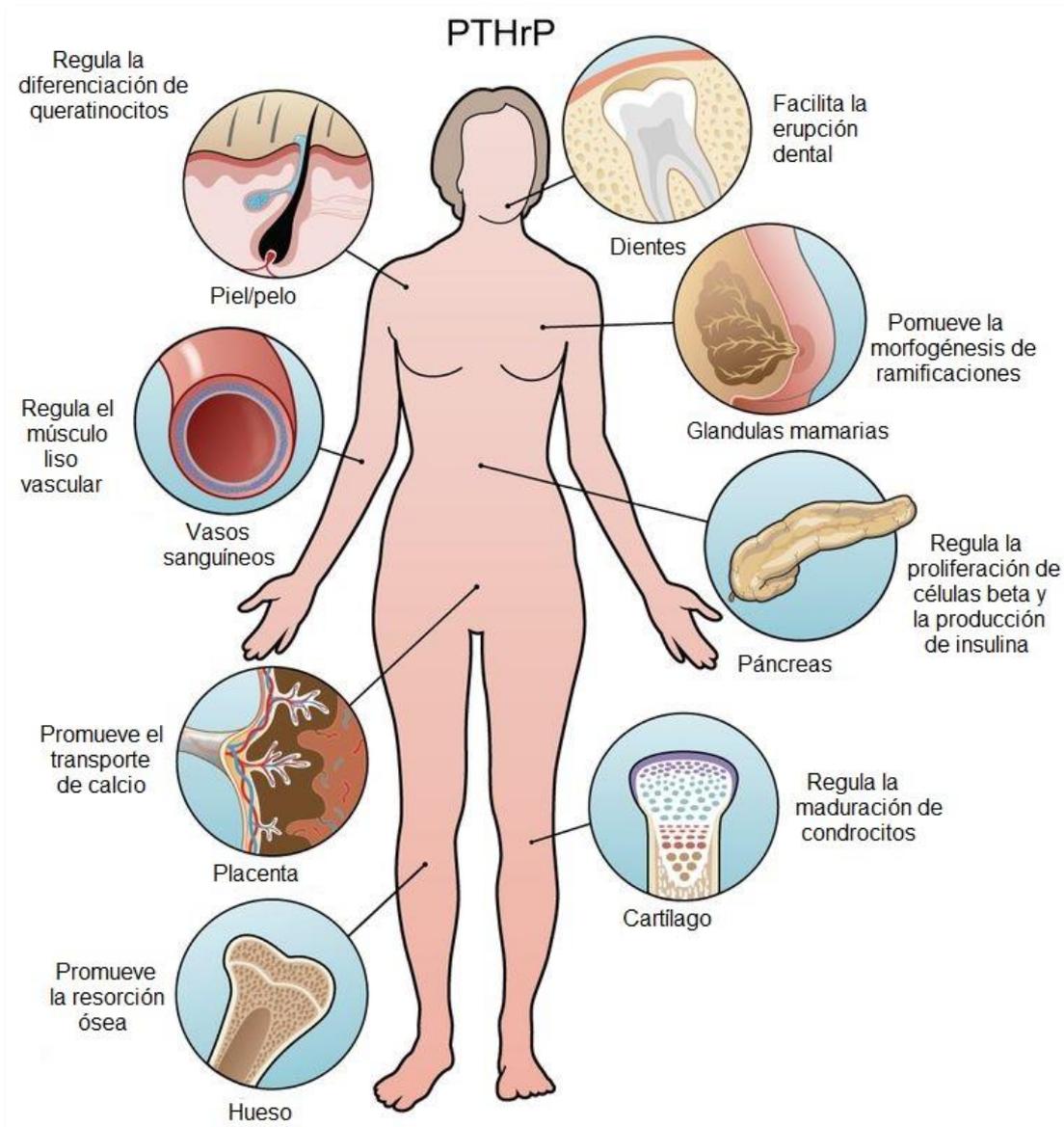
La hormona paratiroidea (PTH) es una hormona peptídica conformado por 84 aminoácidos de longitud cuya secreción por las glándulas paratiroides está estrechamente controlada por la concentración sérica de calcio. Está involucrada en la homeostasis sistémica del calcio, siendo el hueso y riñón los principales órganos diana. PTH interacciona con receptores de membrana de condrocitos, osteoblastos y osteoclastos de tejido óseo y células tubulares de riñón, las cuales responden comúnmente a PTH con una acumulación intracelular de adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico (AMPC) (Esbrit and Alcaraz, 2013). Sin embargo, PTH también activa la adenilato ciclasa en otras células diana, denominadas células diana no clásicas para PTH. Ejemplos son las células sanguíneas (eritrocitos y linfocitos), las células del hígado, del músculo liso, las células del marcapasos del corazón, del músculo cardíaco y las células intestinales (Cianferotti, 2015). En el laboratorio donde se desarrolló este Trabajo de Tesis se observó, por primera vez, la localización y expresión del receptor de PTH tipo 1 (RPTH1) en la línea celular Caco-2 derivada de adenocarcinoma de colon humano (Calvo et al., 2009). El receptor se localiza principalmente en la membrana plasmática y el núcleo de estas células. En las células Caco-2 se demostró que PTH, en ausencia de suero, disminuye el número de células viables, causa cambios morfológicos típicos de células apoptóticas (Calvo et al., 2009), la activación de varios factores pro-apoptóticos (Calvo et al., 2008) y la inactivación de la quinasa Akt (Calvo et al., 2010). Se observó que 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

## 1. Antecedentes

quinasa dependiente de ciclina Cdk6. Distintos inhibidores de PKC revierten la respuesta a PTH en las células Caco-2, sugiriendo que PTH arresta la fase G0/G1 en estas células intestinales e induce cambios en la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular a través de la vía de señalización de PKC (Calvo et al., 2011). Estos resultados indican que PTH no sólo tiene efectos pro-apoptóticos, sino que además tiene un rol anti-proliferativo en las células Caco-2.

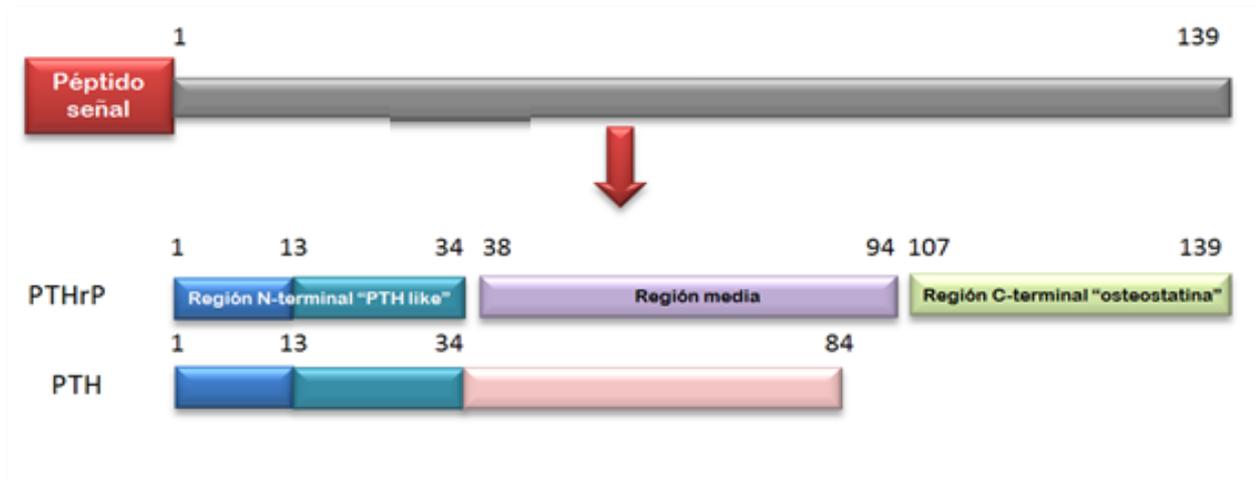
El péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) es una poli hormona que puede ser secretada por varios tumores y es responsable de la hipercalcemia humoral maligna, siendo éste un signo de mal pronóstico en las neoplasias malignas (Kir et al., 2014). Sin embargo, ha sido ampliamente estudiado que esta hormona tiene un papel importante en el desarrollo del feto y en la homeostasis de tejidos adultos (Kovacs, 2015). Mientras que PTH actúa como una hormona real y muestra acciones endocrinas, PTHrP actúa principalmente como factor parácrino/autócrino (**Figura 1**), regulando la proliferación celular y funciones específicas, tanto en el desarrollo como en la fisiopatología y puede desencadenar una respuesta proliferativa anormal en enfermedades como el cáncer (Cianferotti, 2015). A diferencia del gen de PTH el cual se encuentra en el cromosoma 11, el gen de PTHrP se encuentra en el cromosoma 12 y se extiende por más de 15 kb incluyendo nueve exones y tres promotores, que experimentan empalme alternativo dando lugar a tres isoformas de ARNm que codifican para 139, 141 y 173 aminoácidos (Soubrier and Massfelder, 2006). Las tres isoformas de PTHrP experimentan un amplio proceso postraducciona l que genera varias formas secretadas que parecen actuar a través de uno o más receptores distintos de la superficie celular (Wysolmerski, 2012). La estructura de PTHrP está constituida por un dominio N-terminal (1-34), una región media (38-94) correspondiente a una secuencia de localización nuclear y un dominio C-terminal (107-139) que posee la región denominada osteostatina asociada a la inhibición de la osteólisis (Soki et al., 2012) (**Figura 2**). Este último dominio funcional, no posee homología estructural con su homólogo en PTH, por lo que esta función es única para PTHrP (Schlüter, 1999). En cambio, la región N-terminal de PTHrP (1-34), es similar a la región N-terminal de PTH y ambos se unen al receptor RPTH1, el cual posee siete dominios de membrana y se encuentra acoplado a proteínas G heterotriméricas, mientras que las regiones media y C-terminal son funcionalmente activas a través de receptores aun no caracterizados (Wysolmerski, 2012).

## 1. Antecedentes



**Figura 1: Acción paracrina de PTHrP.** PTHrP tiene numerosas acciones paracrinas en la homeostasis fisiológica, incluidas las funciones en queratinocitos / folículos pilosos, cartílago, músculo liso vascular, hueso, desarrollo de la glándula mamaria, erupción de los dientes, el páncreas y otros (McCauley and Martin, 2012).

## 1. Antecedentes



**Figura 2. Estructura proteica de la isoforma de 139 aminoácidos de PTHrP.** Este péptido sufre un complejo proceso postraduccional, obteniéndose varias formas secretadas. La región N-terminal presenta alta homología con PTH.

### 1.2 Rol de PTHrP en el cáncer

Las investigaciones de la última década indican que PTHrP es un factor bioactivo en la iniciación, el crecimiento y la invasión de varios carcinomas (Soki et al., 2012), estimulando la adhesión, migración, proliferación y/o supervivencia, tanto *in vitro* como *in vivo* (Soubrier and Massfelder, 2006, Li et al., 2011). Aproximadamente el 80% de los pacientes con hipercalcemia y tumores sólidos tienen concentraciones plasmáticas detectables o aumentadas de PTHrP. Esta condición, denominada hipercalcemia humoral maligna (HHM), es debida al aumento de la secreción de PTHrP por los tumores. Hasta el 30% de los pacientes con cáncer desarrollan HHM durante el curso de su enfermedad. Los carcinomas de células escamosas representan el 50% de los casos de HHM. Los casos restantes de HHM se han observado en carcinoma renal cortical, neoplasias malignas hematológicas y adenocarcinoma mamario, esofágico y colorrectal (CCR). En el caso del CCR, se encontró que PTHrP se expresa en más del 90% de los pacientes con cáncer (Soki et al., 2012). Aunque el control de la hipercalcemia es generalmente exitoso, el desarrollo de esta complicación se asocia con un mal pronóstico. Esto indica que además de su efecto en la regulación de la calcemia, PTHrP tiene un papel multifuncional en el cáncer. Tales funciones propuestas incluyen (I) inducción de la progresión de la metástasis ósea osteolítica, (II) regulación del crecimiento de células cancerosas, (III) factor de supervivencia celular, (IV) interferencia en las vías de señalización de la apoptosis (Gagiannis et al., 2009).

### **1.3 El cáncer colorrectal (CCR). Bases moleculares de esta enfermedad.**

El CCR es el segundo tipo de cáncer más común en las mujeres y el tercero en los hombres en todo el mundo según datos proporcionados en el 2016 por el Instituto Nacional del Cáncer. Además de la edad y la raza, muchos de los factores de riesgo conocidos para el CCR derivan de los comportamientos tradicionalmente asociados con países de altos ingresos, como un estilo de vida sedentario, dieta occidental y el tabaquismo. Según datos proporcionados por la Sociedad Americana de Cáncer en el año 2017, la prevalencia de dichos factores se refleja en la variación de la incidencia del CCR en el mundo, que es más alta en Europa y América del Norte y la más baja en África. Durante el desarrollo de los adenocarcinomas colorrectales, las células epiteliales del tracto gastrointestinal adquieren mutaciones secuenciales genéticas y epigenéticas en oncogenes específicos y/o genes supresores de tumores confiriéndoles una ventaja selectiva sobre la proliferación y la auto renovación, es decir, el epitelio normal se transforma en mucosa hiperproliferativa, causando la aparición, progresión y metástasis del CCR (De Rosa et al., 2015).

La carcinogénesis del CCR es un proceso de múltiples etapas, caracterizado por una gran inestabilidad genómica que se produce por diferentes vías; entre las más importantes se encuentran: la de inestabilidad cromosómica (CIN), la de inestabilidad microsatelital (MSI) y la de metilación (Tariq and Ghias, 2016).

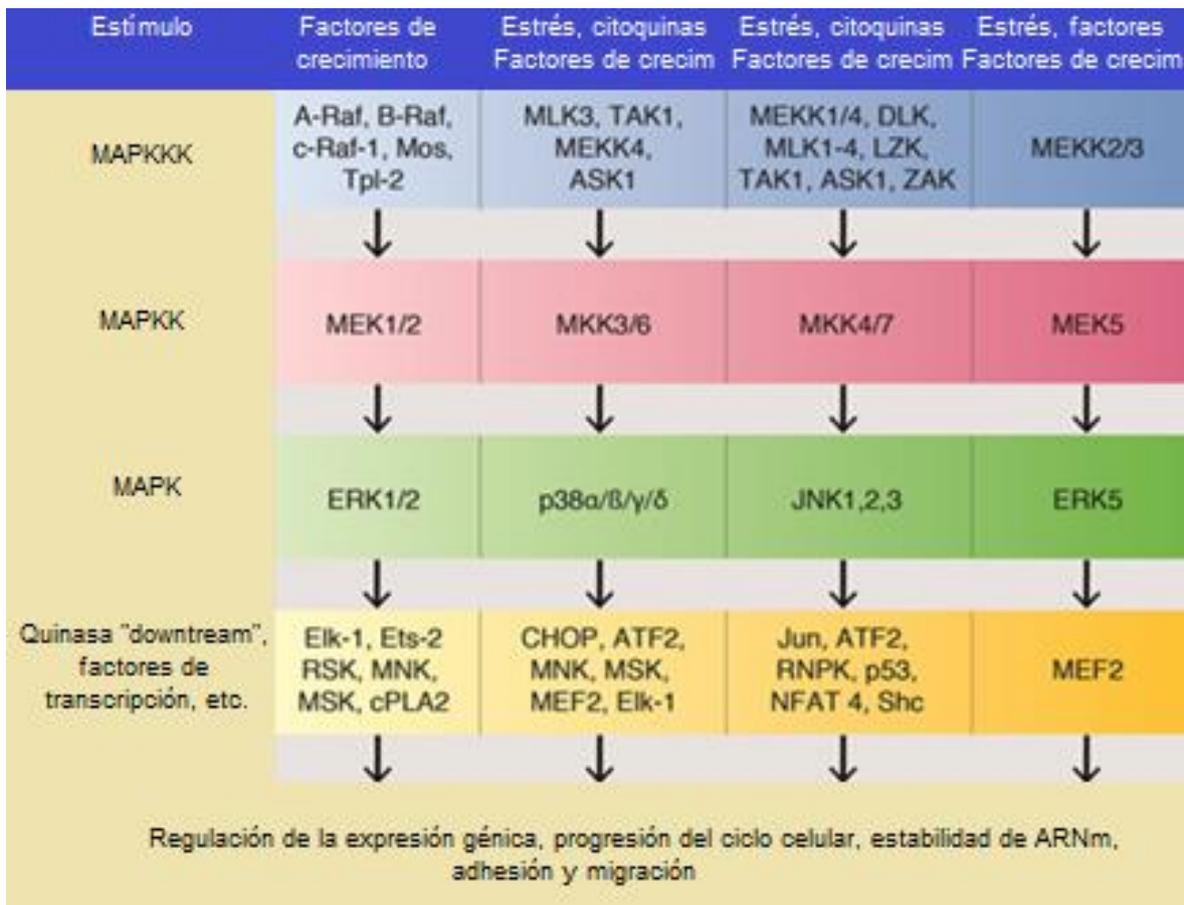
### **1.4 Vías de señalización involucradas en la patogénesis y progresión del CCR.**

#### **1.4.1 La vía de señalización de las MAP quinasas**

Hasta el presente, cuatro cascadas MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) han sido al menos identificadas, estas incluyen ERK1/2 (las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2), JNK (quinasa c-Jun N-terminal), p38 y ERK5/ BMK1. Estas quinasas con actividad sobre residuos serina y treonina se activan por fosforilación en respuesta a una amplia variedad de estímulos extracelulares que interactúan con receptores que poseen actividad tirosina quinasa intrínseca, o con receptores que pueden ser fosforilados en tirosina o simplemente por activación de tirosina quinasas citosólicas como Src. Todas las MAPKs se activan mediante un mecanismo de fosforilación dual único, sobre un motivo Thr-X-Tyr, situado en el bucle de fosforilación (Cheruku et al., 2015). Las señales (o estímulos) son transmitidos a través de una serie de proteínas quinasas citosólicas que están organizadas en tres niveles: MAP3K, MAPKK y MAPK (**Figura 3**). Cada familia participa en la regulación del metabolismo intracelular y expresión de genes involucrados en diversas respuestas celulares incluyendo crecimiento y desarrollo, enfermedad, apoptosis y respuesta celular a estrés (Keshet and Seger, 2010). Usualmente, las ERK1/2 juegan un rol en la proliferación y diferenciación, las JNK y p38 son activadas por el estrés celular por lo que se denominan proteínas quinasas activadas por estrés, y la ERK5 parece responder igualmente a ciertos tipos de estrés, así como a señales mitogénicas. Sin embargo,

## 1. Antecedentes

dependiendo de las líneas celulares y la estimulación, las distintas cascadas pueden regular funciones no canónicas, es decir, fuera de lo normal, e incluso opuestas; así, en raras condiciones, ERK1/2 puede participar en la respuesta al estrés y la apoptosis, mientras que JNK puede mediar la proliferación. La mala regulación de las cascadas, a menudo, conduce a enfermedades tales como el cáncer, la diabetes y la respuesta inmune inflamatoria (Keshet and Seger, 2010). Más aun, la activación de la señalización ERK 1/2 es muy común en el CCR (Cheruku et al., 2015) . Se ha informado de que pequeñas moléculas inhibitoras dirigidas contra la vía ERK han demostrado tener efectos antitumorales sobre el CCR (Peng et al., 2013).

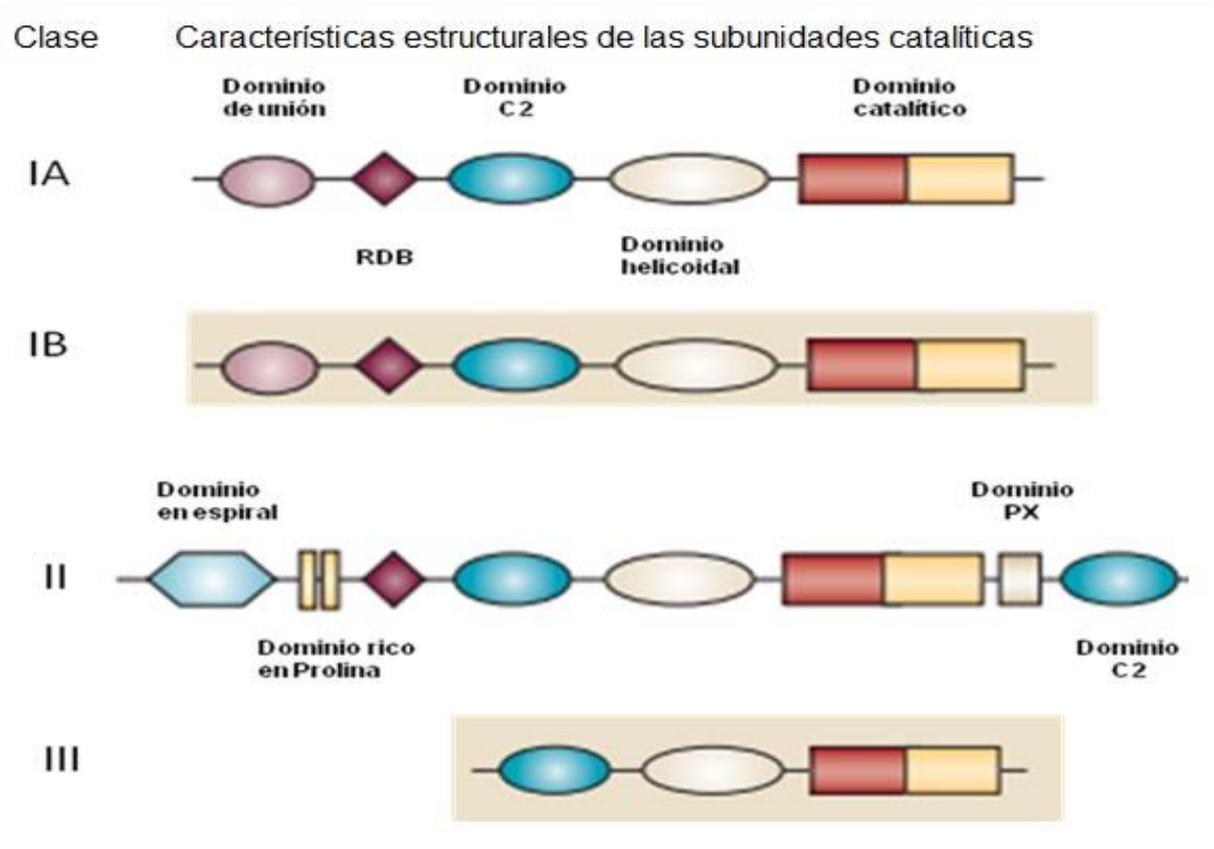


**Figura 3: Componentes de la vía de señalización de la familia MAPK.** La activación de estas vías se produce por múltiples factores. La respuesta celular puede ser diferente dependiendo del estímulo y del tipo celular.

### 1.4.2 La vía de señalización PI3K/AKT

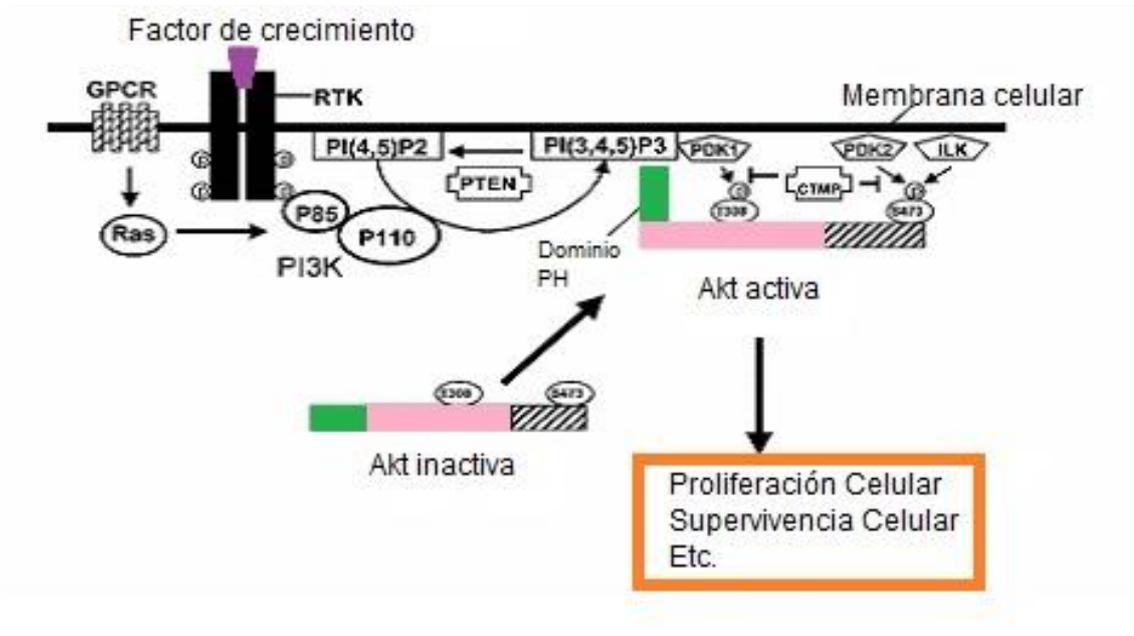
Fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) pertenece a una familia de quinasas de lípidos que se activa por numerosos estímulos celulares tales como factores de crecimiento y receptores de hormonas, regulando así el crecimiento celular, la supervivencia, la movilidad y las respuestas a los cambios en las condiciones nutricionales. Como muestra la **Figura 4**, esta quinasa puede ser dividida en tres clases (I, II y III) en base a su selectividad por los sustratos, su estructura y su modo de regulación (Thorpe et al., 2014, Hawkins and Stephens, 2015). La clase I se divide en: a) clase IA, que comprende heterodímeros formados por una subunidad regulatoria (p85 $\alpha$ , p85 $\beta$ , p55 $\alpha$ , p55 $\gamma$  o p50 $\alpha$ ) y una subunidad catalítica de 110KDa (p110 $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\delta$ ); y b) clase IB, está compuesta por heterodímeros con una subunidad regulatoria (p101 o p87) y una subunidad catalítica (p110 $\gamma$ ) (Backer, 2010). Numerosos estudios indican que la clase IA PI3K está implicada en el cáncer humano (Yuan and Cantley, 2008); se sabe que esta vía es una de las más desreguladas en esta enfermedad que no sólo juega un rol clave en el crecimiento tumoral, sino que también es un potencial objetivo de los tratamientos de cáncer (Osaki et al., 2004). Como se muestra en la **Figura 5**, la clase IA PI3K es activada por receptores con actividad tirosina quinasa (RTK) o tirosinas quinasa no receptoras tales como c-Src mientras que la clase IB es activada por receptores acoplados a proteína G (GPCR) (Fruman and Rommel, 2014). Las interacciones de la subunidad regulatoria con varias proteínas afectan la localización y activación de la subunidad catalítica. Además, la interacción directa de la subunidad catalítica con Ras puede estimular la actividad de la clase I de PI3K (Castellano and Downward, 2011). Una vez activada, esta quinasa cataliza la adición de un grupo fosfato a la posición 3'-OH del anillo de inositol de fosfatidilinositoles (Fruman and Rommel, 2014). El resultante fosfatidilinositol 3'-fosforilado sirve como segundo mensajero el cual media el reclutamiento a la membrana plasmática y la activación de moléculas efectoras que poseen un dominio de homología de plekstrina (PH), entre las que se encuentra la quinasa Akt (Vanhaesebroeck et al., 2012).

1. Antecedentes



**Figura 4: PI3Ks constituye una familia de enzimas que está dividida en tres clases.** La subunidad catalítica de las enzimas clase I (p110 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ ) contiene un dominio de unión, un dominio de unión a RAS (RBD), un dominio C2 (proteína quinasa-C homóloga-2), un dominio helicoidal y un dominio catalítico. Las enzimas de clase II están compuestas por un dominio PI3K-C2 $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; éstas carecen de un sitio de unión del adaptador, pero poseen un dominio fox-carboxi-terminal (PX) y un dominio C2 que podrían mediar la unión a fosfoinosítidos y otros lípidos de membrana que han sido fosforilados en la porción D3. La clase III comprende subunidades de PI3K y del adaptador de p150 análogas a la de levaduras, Vps34p; y sólo aceptan fosfoinosítidos como sustrato (Thorpe et al., 2014).

## 1. Antecedentes



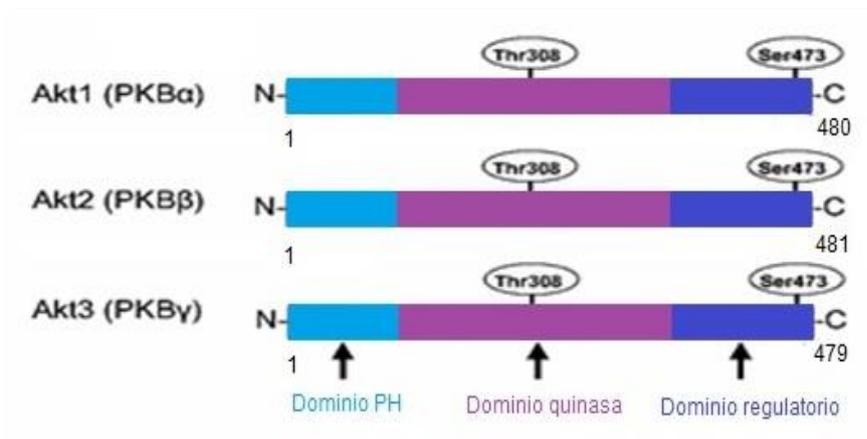
**Figura 5. Modelo para la regulación de la vía de señalización PI3K/Akt.** La unión de factores de crecimiento a los receptores tirosina quinasa (RTK) o a receptores acoplados a proteína G (GPCR) estimulan la fosforilación de PI3K compuesto de una subunidad regulatoria y una subunidad catalítica p110. PI3K convierte el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI(4,5)P2) en PI(3,4,5)P3, mientras que PTEN reverte esta acción. Akt es trasladada a la membrana celular e interactúa con PI(3,4,5)P3 mediante el dominio PH, siendo fosforilada en dos residuos (Thr308 y Ser473) por las quinasas dependientes de fosfatidilinositol PDK1 y PDK2 y la quinasa unida a integrina (ILK). La proteína moduladora de la región carboxilo terminal (CTMP) inhibe dicha fosforilación. Una vez activa, Akt controla procesos celulares fundamentales como el ciclo celular y la supervivencia (Osaki et al., 2004).

Las PI3K clase II (PI3K-C2 $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) son monómeros caracterizados por un dominio C-terminal C2 que parece no unir Ca<sup>2+</sup>. Estas enzimas fosforilan preferentemente fosfatidilinositol y fosfatidilinositol-4-fosfato; y dado que no poseen adaptadores, no se conocen la manera en que se controlan las PI3K clase II. La clase III PI3K fosforila fosfatidilinositol (PI) para formar fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) en ubicaciones intracelulares específicas, como endosomas y estructuras autofagocíticas tempranas, y regula el destino y la función de estas estructuras mediante la unión a distintos dominios efectores. Solo hay una subunidad catalítica de PI3K de clase III, que se une a una proteína quinasa putativa (p150 o Vps15), la cual participa en su regulación. Los detalles moleculares de cómo está regulada la actividad de PI3K de Clase III todavía son poco conocidos (Hawkins and Stephens, 2015). Akt, también llamada proteína quinasa B (PKB) o proteína relacionada con la quinasa A o C (RAC), es una quinasa de 57 KDa que fosforila residuos de serina y de treonina. Los genomas de mamíferos contienen tres genes de Akt, que codifican las isoformas Akt1 (PKB $\alpha$ ), Akt2 (PKB $\beta$ ) y Akt3 (PKB $\gamma$ ). Akt2 y Akt3 tienen un 81% y un 83% de homología en la secuencia de aminoácidos con Akt1, respectivamente. Como muestra la **Figura 6**, cada gen codifica una proteína que contiene un dominio PH en el extremo N-terminal, un dominio quinasa central que incluye el residuo de treonina 308 (Thr309 en Akt3), y un dominio regulador C-terminal que

## 1. Antecedentes

incluye el residuo de serina 473 (Ser474 en Akt2 y Ser472 en Akt3). Como se aprecia en la **Figura 5**, la unión de los lípidos fosforilados (resultantes de la activación de PI3K) al dominio PH de Akt provoca su translocación del citoplasma a la membrana plasmática y altera su conformación para permitir la fosforilación del residuo de treonina 308 por PDK-1 (quinasa dependiente de fosfoinosítido-1). La fosforilación del residuo de serina 473 es controversial, ya que puede ser mediada por PDK-1, PDK-2 (quinasa dependiente de fosfoinosítido-2), ILK (quinasa ligada a integrina) o por autofosforilación. Se requiere de la fosforilación de ambos residuos para la activación completa de Akt (Gao et al., 2014).

La vía de señalización de PI3K/Akt está asociada con el CCR humano participando en la transformación de la mucosa gástrica o del colon a un fenotipo menos diferenciado y más maligno. Se cree que los efectos de PI3K sobre el crecimiento y progresión del tumor están mediados principalmente por Akt (Pandurangan, 2013). Akt se encuentra sobre-expresada en varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de colon, de páncreas, de ovario, y de mama. Además, la sobre-estimulación de la fosforilación de Akt y consecuente sobre-activación de esta enzima en los carcinomas de colon humano se correlaciona con el aumento de la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis, así como diferentes parámetros clínico-patológicos tales como grado invasivo, infiltración de vasos, metástasis de ganglios linfáticos y estadio tumoral (Khaleghpour, 2004).



**Figura 6. Estructura de los dominios de las tres isoformas humanas de Akt/PKB.** Cada isoforma de Akt consiste de tres dominios funcionales: un dominio N-terminal, un dominio quinasa central que incluye Thr308 (Thr309 en Akt3), y un dominio regulador C-terminal que incluye Ser473 (Ser474 en Akt2 y Ser472 en Akt3). El número de residuos de aminoácidos se muestra debajo de cada cuadro (Osaki et al., 2004).

### 1.4.3 La tirosina quinasa Src

## 1. Antecedentes

Se han identificado al menos once tirosina quinasas no receptoras pertenecientes a la familia Src en mamíferos: Src, Fyn, Yes, Blk, Yrk, Frk (Rak), Lck, Hck, Lyn, Frg y Srm. Los miembros de esta familia son estructuralmente similares, pero difieren en sus patrones de localización y expresión. Src, Fyn y Yes están ubicuamente expresadas mientras que varios de los otros miembros de esta familia se encuentran predominantemente en ciertos tipos de células (Sen and Johnson, 2011). La relación de las proteínas Src con los distintos sistemas de señalización ha generado un enorme interés en el entendimiento de mecanismos por los cuales estas enzimas son reguladas y cómo participan en las cascadas de señalización intracelular (Boggon and Eck, 2004, Parsons and Parsons, 2004). Las tirosina quinasas de la familia Src poseen una masa molecular entre 52-66 KDa y están compuestas por varios dominios presentes en otras moléculas de señalización. Se ha propuesto un modelo que describe el funcionamiento y los diferentes dominios de la proteína Src basado en la estructura cristalina de Src humana (Boggon and Eck, 2004). Como se observa en la **Figura 7**, estas quinasas contienen un dominio SH4 de localización a membrana en la región N-terminal, un grupo de aminoácidos comúnmente llamado dominio único, un dominio SH3, un dominio SH2, una unión que conecta el dominio SH2 con el dominio quinasa y una extremidad o cola conservada en la región C-terminal (Sen and Johnson, 2011). Este dominio carboxilo-terminal contiene el residuo tirosina Y527 (siendo para humanos el residuo Y530) el cual es clave en la regulación de la actividad quinasa. En la conformación inactiva de Src, el dominio quinasa se encuentra inhibido, bloqueado por un rulo que se forma al unirse el residuo Y527 fosforilado con el dominio SH2. Cuando un estímulo provoca la activación de Src, la desfosforilación del residuo Y527 permite separar la cola de la región C terminal del dominio SH2 y este evento provoca un cambio conformacional en el dominio catalítico, exponiendo su sitio activo. Estos cambios conformacionales permiten la exposición del residuo de tirosina Y416 (ubicada en el bucle catalítico) y su autofosforilación conduciendo a la total activación de Src, ya que la fosforilación de Y416 estabilizaría la conformación extendida característica de Src activa. La actividad de Src no sólo está controlada por un delicado balance de fosforilación y defosforilación sino que otros mecanismos participarían en la activación de esta enzima (Young et al., 2001, Okada, 2012). De esta manera, Src juega un rol integral en múltiples procesos celulares a través de la interacción estructural de SH2 y SH3 con la señalización proteica, incluyendo la invasión, migración, proliferación, angiogénesis y apoptosis (Yeatman, 2004, Sen and Johnson, 2011). La activación aberrante de Src se describe en múltiples tipos de cáncer y, en particular, en el cáncer gastrointestinal se observa un incremento en su activación (probablemente, como consecuencia de alteraciones genéticas y epigenéticas) que favorece el progreso y la quimiorresistencia de la enfermedad (Lieu and Kopetz, 2010). El 80% de los pacientes con CCR sobre-expresan Src en el tejido tumoral. La evidencia ha demostrado que la sobre-expresión de Src en el CCR acelera la metástasis y provoca resistencia a los fármacos quimioterapéuticos a través de múltiples vías de señalización. Por lo tanto, la inhibición de Src puede ser útil como blanco terapéutico para el tratamiento del CCR (Chen et al., 2014)

## 1. Antecedentes

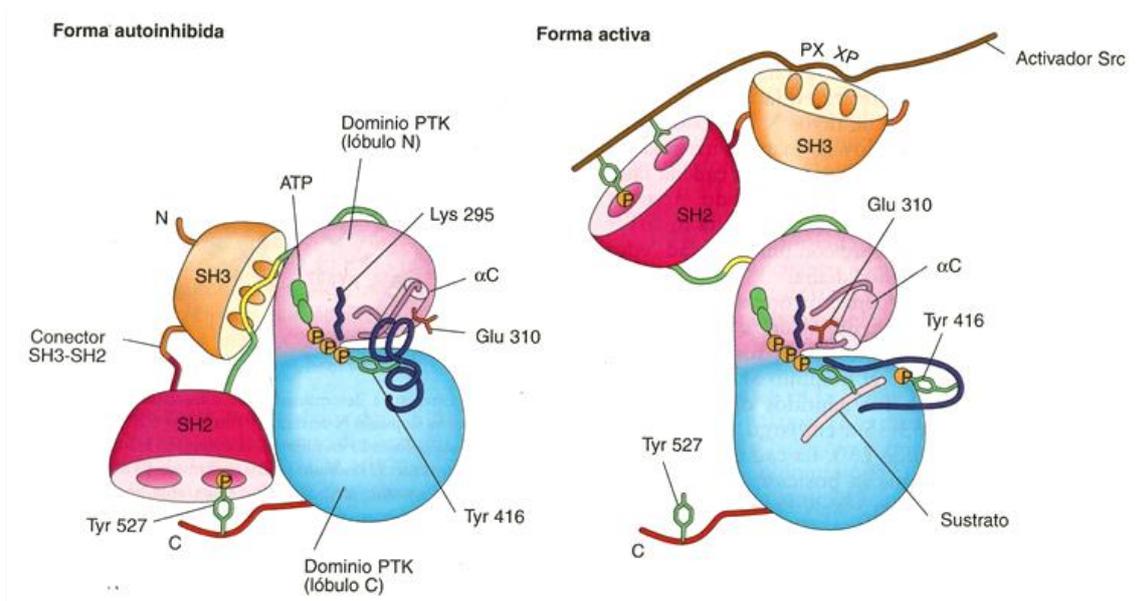
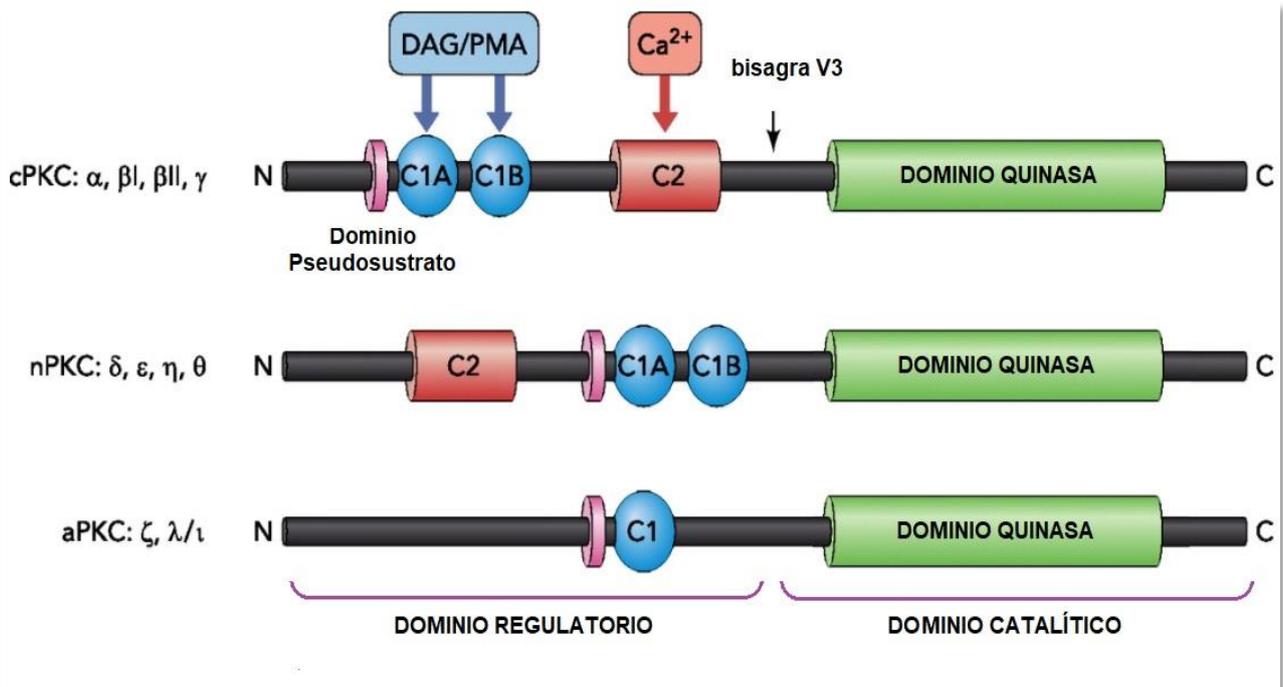


Figura 7. Esquema ilustrativo de la activación de Src, de Young et al., 2001.

### 1.4.4 La familia de proteínas quinasas C (PKC)

La proteína quinasa C (PKC) es una familia de quinasas que fosforilan residuos de serina y treonina, dependientes de fosfolípidos y que funcionan en numerosos tipos de células. Como se puede apreciar en la **Figura 8**, basándose en sus características estructurales y de activación, esta familia de proteínas puede clasificarse además en tres subfamilias: isoenzimas de PKC convencionales o clásicas (cPKC,  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ), isoenzimas de PKC nuevas o no clásicas (nPKCs,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ), e isoenzimas atípicas de PKC (aPKCs,  $\zeta$ ,  $\iota$ ,  $\lambda$ ) (Steinberg, 2012). Las isoenzimas de PKC están implicadas en múltiples vías de transducción de señales que responden a una variedad de estímulos externos, incluyendo hormonas, factores de crecimiento y otros ligandos de receptores de membrana. Por esta razón, las isoenzimas de PKC pueden actuar como dianas terapéuticas para varias enfermedades. En cáncer, las isoenzimas de PKC juegan un rol crítico en la proliferación celular, supervivencia, migración, invasión, apoptosis, angiogénesis y resistencia a drogas utilizadas en el tratamiento de esta enfermedad (Kang, 2014). En particular, la importancia de las PKC en el CCR ha sido demostrada y varios reportes indican que la carcinogénesis del CCR va acompañada de cambios en la expresión de las diferentes isoenzimas de PKC, incluyendo un aumento dramático en el nivel de expresión de PKC $\beta$ II y PKC $\epsilon$ , como también la pérdida de la funcionalidad de PKC $\delta$  (Luna-Ulloa et al., 2011). Con respecto a PKC $\alpha$ , se ha demostrado que esta isoenzima participa en el arresto del crecimiento y la supresión del cáncer en el epitelio intestinal (Kang, 2014).

1. Antecedentes



**Figura 8. Estructura de los dominios de las enzimas de la familia PKC.** Las isoformas de PKC comparten una estructura general similar que consiste en un dominio regulatorio NH<sub>2</sub>-terminal que se une a través de una bisagra a un dominio catalítico conservado COOH-terminal que se une al ATP y sus correspondientes sustratos. La porción regulatoria contiene un dominio de pseudo sustrato que mantiene la enzima en una conformación inactiva y controla la localización subcelular de la enzima. Las isoformas PKC convencionales contienen motivos C1A/C1B que unen diacilglicerol (DAG) o ésteres de forbol (como PMA) y un dominio C2 que se une a fosfolípidos aniónicos que son dependientes de calcio. Las PKC noveles se activan mediante cofactores de lípidos (DAG o PMA) sin un requerimiento de calcio. Las PKC atípicas contienen un dominio C1 atípico que se une a PIP3 y ceramida (pero no a DAG o PMA) y a un dominio de interacción proteína-proteína PB1 (Phox y Bem 1) que se une a los andamios que contienen PB. La activación de estas isoformas es atribuible a las interacciones proteína-proteína y a la fosforilación del bucle de activación por la quinasa-1 dependiente de fosfoinosítido (PDK-1). (Steinberg, 2012).

### 1.4.5. La vía de señalización de $\beta$ -Catenina

La señalización de Wnt representa una de las pocas cascadas moleculares clave que regulan el destino celular de los animales a lo largo de su vida. Durante el desarrollo embrionario, los niveles proteicos de  $\beta$ -catenina, regulados por Wnt, contribuyen críticamente al establecimiento del eje del cuerpo y la orquestación del desarrollo de los tejidos y órganos. En los órganos adultos, la señalización Wnt continúa desempeñando papeles indispensables en la homeostasis tisular, la renovación celular y la regeneración (Yang, 2012).

La proteína  $\beta$ -catenina (Armadillo en *Drosophila*), codificada por el gen CTNNB1, es el principal componente de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. El desequilibrio en las propiedades estructurales y de señalización de la  $\beta$ -catenina a menudo da como resultado una enfermedad y un crecimiento desregulado relacionado con el cáncer y la metástasis (Mantilla et al., 2015).

En hasta el 90% de los CCR la vía de señalización regulada por Wnt/ $\beta$ -catenina es defectuosa (Walther et al., 2009). La estabilidad de  $\beta$ -catenina en citosol es regulada por un complejo de degradación. La proteína supresora de tumores Axina funciona como el andamio de este complejo interactuando directamente con  $\beta$ -catenina, con el producto del gen adenomatous polyposis coli (APC), con la quinasa de caseína 1 (CK1) y con la quinasa de glucógeno-sintasa 3 (GSK3). Cuando el ligando Wnt no ocupa su receptor Frizzled y co-receptor LRP,  $\beta$ -catenina es fosforilada secuencialmente en Ser45 por CK1 y en Thr41/Ser37/Ser33 por GSK3. De esta manera,  $\beta$ -catenina, una vez fosforilada en esos sitios, y después del agregado de ubiquitina, es rápidamente degradada por el proteosoma. La ocupación del receptor por su ligando Wnt inhibe la fosforilación de  $\beta$ -catenina por CK1 y GSK3 lo que acarrea el desarmado del complejo de destrucción.  $\beta$ -catenina, ahora libre en el citosol, es importada hacia el núcleo donde estimula la transcripción de genes que regulan la proliferación, diferenciación y migración celular (**Figura 9**). Los defectos encontrados en la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina en la mayoría de los casos de CCR están caracterizados por mutaciones en APC, axina y/o  $\beta$ -catenina. Estas mutaciones evitan la degradación de  $\beta$ -catenina y simultáneamente estimulan su acumulación nuclear y la transcripción de los genes que esta proteína controla. Se identificaron otros sitios de fosforilación en  $\beta$ -catenina (tales como Ser552 y Ser675) que cuando están fosforilados estimulan la entrada de  $\beta$ -catenina al núcleo y su actividad transcripcional independientemente de la vía de señalización activada por Wnt (Verheyen and Gottardi, 2009, Paul et al., 2013). Varias quinasas tales como c-Src, Akt, PKA y las MAPKs fosforilan a  $\beta$ -catenina regulando su función como mediador en la transducción de señales extracelulares (Valenta et al., 2012).

1. Antecedentes

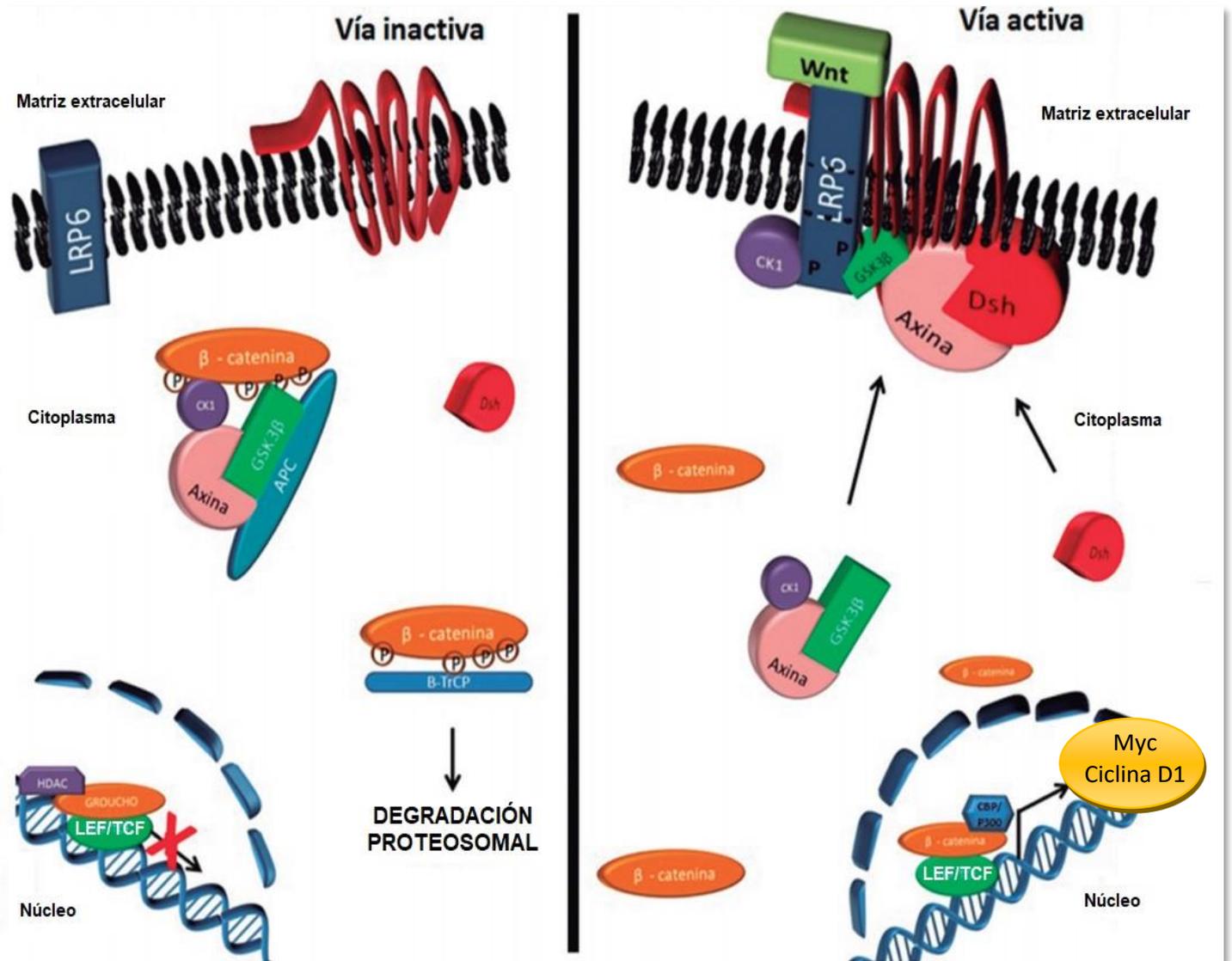


Figura 9. Representación esquemática de la vía de señalización Wnt/ β-catenina. (Mantilla et al. 2015).

### **1.5 Terapéutica en el CCR y quimiorresistencia**

Aunque el CCR puede curarse en etapas tempranas, los pacientes frecuentemente presentan metástasis en el momento de la aparición de los síntomas y el diagnóstico de la enfermedad, lo que conduce a una alta tasa de mortalidad (Li et al., 2014). Irinotecán (CPT-11) está aprobado en todo el mundo para el tratamiento del CCR metastásico, como quimioterapia de primera y segunda línea para el CCR avanzado o recurrente. La combinación de CPT-11 con otras drogas (por ejemplo FOLFIRI, que es una combinación de CPT-11 junto con leucovorin y 5-fluorouracilo o 5-FU), demostró incrementar significativamente la supervivencia de los pacientes que no han respondido a la terapia inicial basada únicamente en 5-FU (Li et al., 2014, Mocellin et al., 2017); sin embargo, más de la mitad de los casos responden mal a la terapia basada en CPT-11 (Li et al., 2014, Erdem et al., 2017). La resistencia a fármacos quimioterapéuticos es una causa frecuente de fracaso del tratamiento en pacientes con CCR. Se ha observado una correlación entre quimiorresistencia de células de CCR y alteración en la expresión de varios marcadores. PTHrP puede mediar la quimiorresistencia a diversos agentes terapéuticos en células de cáncer de próstata y de osteosarcoma (Gagiannis et al., 2009, Cui et al., 2016); sin embargo al momento de iniciar este trabajo de Tesis se desconocía si PTHrP confiere quimiorresistencia a células de CCR.

# 2.OBJETIVOS

## 2.1. Objetivo general

En este trabajo de Tesis se utilizaron las líneas celulares Caco-2 y HCT116 derivadas de adenocarcinoma y carcinoma de colon humano, respectivamente, y xenoinjertos murinos como modelos experimentales para estudiar los efectos del análogo tumoral de la hormona paratiroidea (PTHrP) en células intestinales tumorales evaluando los mecanismos moleculares que podrían estar involucrados en estos procesos. Además, se propuso evaluar si otras hormonas calciotrópicas ejercen sus efectos sobre estas células mediante la regulación de la expresión de PTHrP.

## 2.2. Objetivos específicos

PTHrP ejerce un papel regulador principalmente a través de la vía paracrina y/o autocrina. La acción del péptido se evaluó en cultivos de células intestinales tumorales y en xenoinjertos subcutáneos generados en ratones “nude” tratados con PTHrP exógeno.

### 1. En los ensayos *in vitro* se propuso:

- 1.1. Investigar el rol de PTHrP en la proliferación de las células intestinales tumorales.
- 1.2. Explorar si este análogo tumoral regula la activación de cascadas de señalización relacionadas con eventos de proliferación celular, tales como las vías de PI3K/Akt, las MAPKs y de  $\beta$ -catenina.
- 1.3. Analizar, de comprobarse que PTHrP induce la proliferación de las células intestinales tumorales y además activa vías mitogénicas, cuáles son los mecanismos moleculares que participan en estas respuestas celulares a PTHrP.

## 2. Objetivos

1.4. Estudiar si PTHrP regula la expresión de genes relevantes para la proliferación celular y los mecanismos moleculares involucrados en este proceso.

1.5- Evaluar si las hormonas calciotrópicas PTH y calcitriol ejercen su acción en las células Caco-2 normales y en las que sobre-expresan PTHrP a través del control de la expresión de PTHrP.

1.6- Estudiar si PTHrP confiere quimiorresistencia a células derivadas de CCR.

### 2. En los ensayos *in vivo* se propuso:

2.1- Explorar si la administración de PTHrP modula la expresión de marcadores relevantes en la progresión del CCR.

# 3. HIPÓTESIS

En las líneas intestinales tumorales se plantea que PTHrP es capaz de inducir la proliferación celular modulando distintas cascadas de señalización mitogénicas; se postula que la transducción de la información de PTHrP al núcleo desencadena la expresión de genes relevantes en la proliferación celular. En el modelo murino se plantea que la administración de la hormona modula la expresión de marcadores claves en la progresión del CCR. Se presume además que las hormonas calciotrópicas PTH y calcitriol ejercerían sus efectos en las células intestinales tumorales a través de mecanismos que modulan la expresión de PTHrP. Por último, se supone que el péptido actúa como un factor que confiere resistencia a agentes quimioterapéuticos actualmente empleados en el tratamiento del CCR.

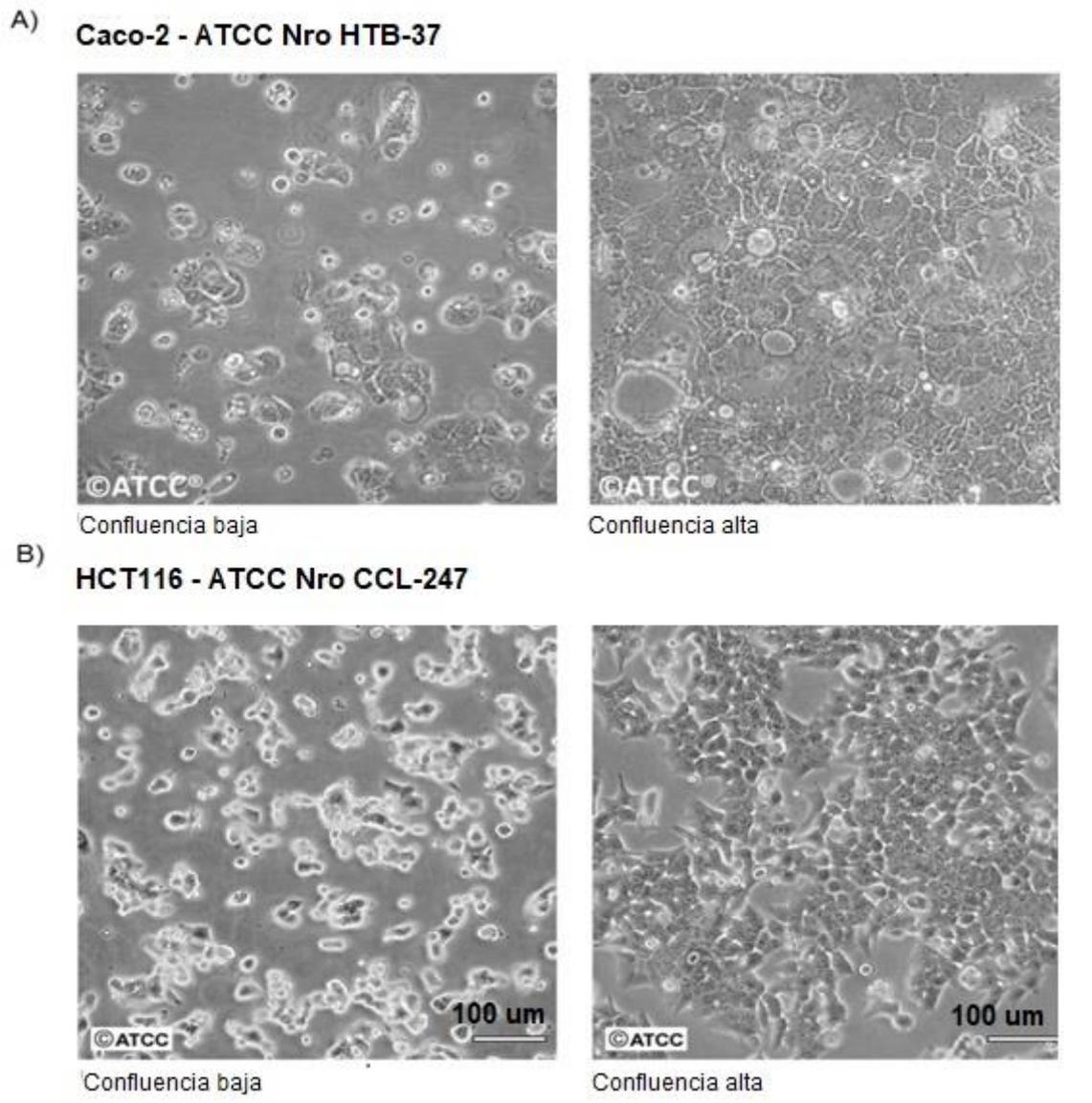
# 4. MATERIALES Y MÉTODOS

## 4.1 Modelos experimentales

### 4.1.1 Líneas celulares intestinales Caco-2 y HCT116

Para la mayoría de los estudios *in vitro* se emplearon como modelos experimentales las líneas celulares Caco-2 y HCT116 derivadas de adenocarcinoma y carcinoma de colon humano, respectivamente, adquiridas de la ATCC (American Type Culture Collection) (Manassas, Virginia) (**Figura 10**).

Las células se cultivaron a 37°C, bajo atmósfera de 5,5% de CO<sub>2</sub> en aire, en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor e irradiado, 1% de aminoácidos no esenciales, penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 mg/ml) y gentamicina (50 mg/ml). Una vez alcanzado el nivel de confluencia apropiado (70%), las células HCT116 y Caco-2 fueron deprivadas de SFB por 24 horas y luego fueron incubadas en DMEM con 2 ó 5 % SFB, respectivamente, en ausencia o en presencia de PTHrP (1-34) (10<sup>-8</sup> M) durante distintos tiempos. En los experimentos donde se utilizaron inhibidores de diferentes vías de señalización, las células fueron preincubadas con los mismos por 30 minutos y los controles fueron tratados con el vehículo correspondiente (dimetilsulfóxido <0,1%).



**Figura 10. Líneas celulares tumorales intestinales empleadas como modelos experimentales *in vitro*. A) Células Caco-2. B) Células HCT116**

#### 4.1.2. Línea celular intestinal Caco-2 con sobre-expresión de PTHrP

Para los estudios *in vitro* mencionados en el **Capítulo II** de Resultados se emplearon las células Caco-2 transfectadas (que sobre-expresan PTHrP). La transfección estable del cADN que codifica para PTHrP humano junto con el vector plasmídico o la transfección estable del vector vacío se realizó usando liposomas. Las células transfectadas se cultivaron en presencia de G418 como antibiótico de selección. La sobre-expresión de PTHrP y la expresión endógena en células no transfectadas o transfectadas con

el vector vacío fueron analizadas evaluando los niveles de ARNm de la hormona mediante la técnica de PCR en tiempo real (qRT-PCR). También se analizaron los niveles de expresión proteica mediante Western blot.

##### 4.1.3 Modelo murino

Para los ensayos *in vivo* se utilizaron ratones atímicos e inmunodeficientes ("nude mice") proporcionados por el Bioterio apto para este tipo de ratones de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). La crianza y el manejo de los animales se llevaron a cabo de acuerdo con las pautas institucionales de dicha Facultad. Los experimentos fueron realizados en el Bioterio de FCV-UNLP.

Los protocolos de los experimentos que involucran el uso de ratones "nude" fueron evaluados y avalados por el CICUAE (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación) de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y aprobados por el Consejo Departamental de Biología, Bioquímica y Farmacia de la UNS según resoluciones CDBByF 429/14 y CDBByF 296/1616 (con renovación de vigencia según resolución DBByF 074/17).

Con el fin de generar tumores en estos ratones se inyectaron por vía subcutánea  $1 \times 10^6$  células HCT116 en los flancos dorsales derechos de ratones machos LAE:NIH (S)-Fox 1<sup>nu</sup> de 6 semanas de edad. Nos referimos esta cepa de ratones como "nude". Cuatro días después de la inoculación, los animales fueron aleatorizados (ciegamente) en grupos de control y tratamiento (n = 6 / grupo). A los ratones se les administró diariamente PTHrP (40 µg / kg en 100 µl de PBS) o un volumen igual de solución de vehículo, como control, mediante inyección intratumoral (2 grupos en total, cada grupo representa una unidad experimental). Después de 20 días de tratamiento, los ratones se sacrificaron, se retiraron los tumores y se pesaron. El tamaño del tumor se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: volumen del tumor (mm<sup>3</sup>) = ancho del tumor (mm<sup>2</sup>) x longitud del tumor (mm) / 2 (Wang et al., 2002). No se observaron diferencias en el tamaño del tumor entre ambos grupos al final del experimento. Con el fin de realizar los ensayos inmunohistoquímicos, se fijó el tejido tumoral con solución de formaldehído neutro al 4%. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la guía de los Institutos Nacionales de Salud para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NIH 1996).

##### 4.2. Obtención de lisado celular

Luego de que las células Caco-2 y HCT116 fueron tratadas con el péptido el medio de cultivo fue removido, las cajas de cultivo se colocaron en hielo y se lavaron 2 veces con PBS frío conteniendo inhibidores de fosfatasa (NaF 25 mM y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM). Seguidamente las células fueron lisadas en un

#### 4. Materiales y Métodos

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 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM y los lisados fueron colectados en tubos eppendorfs, mantenidos en hielo por 10 minutos, agitados por 45 segundos y colocados nuevamente en hielo por 10 minutos. A continuación, los lisados fueron centrifugados a 14.000 x 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 Bradford (Bradford, 1976).

#### **4.3. Cuantificación de proteínas**

Las proteínas de los lisados celulares fueron cuantificadas por el método de Bradford. Para ello, se tomaron alícuotas de las muestras por duplicado; se agregó 2,5 ml de reactivo de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250 100 mg/L; etanol 4,75% y ácido fosfórico 8,5%), se incubó durante 5 minutos y las absorbancias se midieron a 595 nm empleando un espectrofotómetro Beckman DU530. Como estándar de concentración conocida se empleó 1 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA).

#### **4.4. Fraccionamiento subcelular**

La obtención de las distintas fracciones subcelulares fue realizada por centrifugación diferencial usando una centrífuga SIGMA 3K 30. El medio de cultivo fue removido y las células fueron lavadas 2 veces con PBS frío y colectadas en buffer TES frío (Tris-HCl 50 mM (pH: 7,4), EDTA 1 mM, sacarosa 250 mM conteniendo inhibidores de proteasas) para ser homogeneizadas en frío usando un homogenizador manual de vidrio (30 golpes). A continuación, el homogenado fue centrifugado a 1.200 x g durante 20 minutos a 4°C y el precipitado (fracción enriquecida en núcleos) fue lavado 2 veces con el buffer TES frío. El sobrenadante correspondió a la fracción post-nuclear. Las distintas fracciones fueron resuspendidas en buffer TES frío y se evaluó la pureza de las mismas analizando marcadores específicos asociados a determinados componentes subcelulares. Las proteínas de cada fracción fueron cuantificadas por el método colorimétrico de Bradford y fueron resueltas por SDS-PAGE sembrando cantidades equivalentes.

#### **4.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)**

Las proteínas de los lisados celulares o de las distintas fracciones subcelulares se desnaturalizaron en buffer muestra de electroforesis 6X (Tris-HCl 0,375 M pH: 6,8; dodecilsulfato de sodio (SDS) 12%; glicerol 60%; 2-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 proteína /calle) y separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) discontinuos (gel de "stacking": 4% acrilamida, gel de separación: 10% acrilamida) según la técnica de Laemmli (Laemmli, 1970). En paralelo se sembraron marcadores coloreados de peso molecular conocido. La electroforesis se realizó a voltaje constante (100 voltios) utilizando como buffer de corrida Tris 25 mM pH: 8,8; glicina 195 mM; SDS 0,1%.

#### **4.6. Electrotransferencia e Inmunoblotting**

A continuación, las proteínas separadas por SDS-PAGE según su peso molecular fueron electrotransferidas a membranas de polivinilideno bifluoruro (PVDF) (immobilon-P, 0,45 µm). Las membranas se hidrataron en metanol puro durante 50 segundos y se equilibraron en buffer de transferencia Towbin (Tris 0,25 M pH: 8,3; glicina 0,192 M; 20% metanol) durante 5 minutos al igual que los geles. La transferencia se realizó en una cámara semi seca aplicando 125 mA por gel durante 1 ó 2 horas y embebiendo la membrana y el gel en buffer de transferencia (Towbin et al., 1979). Posteriormente los geles se tiñeron con el colorante Coomassie Brilliant Blue R-250 para constatar la eficiencia de la transferencia, según se detalla más adelante.

Los sitios de ligado inespecíficos de las membranas fueron bloqueados usando el buffer TBS-T 0,1% (Tris 50 mM pH: 7,4; NaCl 200 mM; 0,1% Tween-20) conteniendo 5% de leche descremada y deshidratada durante 1 a 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, las membranas se incubaron con la dilución apropiada de anticuerpo primario (específico para la detección de la proteína de interés y preparado en TBS-T 0,1% conteniendo 1-5% de leche ó BSA) durante toda la noche a 4°C. Luego las membranas fueron lavadas con TBS-T 0,1% para eliminar el exceso de anticuerpo primario, y luego fueron incubadas con la dilución apropiada de anticuerpo secundario (anti globulina de la especie animal correspondiente al anticuerpo primario usado) conjugado a peroxidasa (preparado en TBST 0,1% conteniendo 1-5% de leche descremada) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas con TBS-T 0,1% para eliminar el exceso de anticuerpo secundario y finalmente fueron incubadas con un kit comercial de electroquimioluminiscencia (ECL) y expuestas a placas radiográficas Kodak BioMax Light film para visualizar las proteínas de interés. Las bandas obtenidas fueron digitalizadas densitométricamente utilizando el densitómetro GS-700 Imaging Densitomer y se cuantificaron usando el programa Molecular Analyst. Los datos fueron volcados a planillas de Excel para la construcción de los gráficos correspondientes.

#### **4.7. Remoción de anticuerpos de las membranas**

Para remover el anticuerpo primario y secundario de las membranas y poder exponerlas a anticuerpos diferentes (“stripping”), las membranas se sumergieron en buffer stripping (Tris-HCl 62,5 mM pH: 6,8; SDS 2% y  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mM) a 55°C durante 30 minutos con agitación y luego se lavaron con TBS-T 1% por 10 minutos. Posteriormente se realizó el bloqueo continuando con el protocolo explicado anteriormente.

#### **4.8. Evaluación de los niveles proteicos de PTHrP en un medio libre de proteínas**

Para determinar la liberación de PTHrP producida endógenamente al medio en el que se cultivaron las células Caco-2, las células se lavaron dos veces con tampón PBS y luego se incubaron durante 24 h con un medio libre de proteínas. Al final del período de incubación se recogió el sobrenadante, se añadieron 100  $\mu$ l de desoxicolato (5 mM) y la muestra se colocó sobre hielo durante 15 minutos. A continuación, se añadió ácido tricloroacético (100%) durante otros 30 min y la muestra se colocó de nuevo sobre hielo. Finalmente, la proteína se sedimentó por centrifugación, se resolvió en 35  $\mu$ l de tampón Laemmli y 10  $\mu$ l de Tris / HCl (pH 9,5) y se calentó durante 5 minutos a 95 ° C. La muestra se sometió a SDS-PAGE y luego se inmunotransfirió para posteriormente evaluar la expresión del péptido empleando con un anticuerpo contra PTHrP.

#### **4.9. Inmunocitoquímica**

Las células sembradas sobre cubreobjetos y tratadas con el péptido fueron fijadas y permeabilizadas con metanol frío a -20°C durante 15 minutos. Luego de varios lavados con PBS, 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 o ausencia (control negativo) del anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4°C. Después de 3 lavados con PBS, las preparaciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 488 (dilución 1:200) durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Se efectuaron 3 nuevos lavados con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. Finalmente, los preparados se montaron con una solución de glicerol 95% en PBS y las imágenes de fluorescencia se obtuvieron usando un microscopio de fluorescencia NIKON TE2000S. Los anticuerpos primarios y secundarios fueron preparados en PBS conteniendo 5% de BSA.

Durante los últimos 30 minutos de incubación con el anticuerpo secundario las células fueron teñidas en forma paralela con el colorante específico nuclear DAPI (dilución 1:300) para ubicar la localización nuclear.

#### **4.10. Ensayos de viabilidad celular**

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

##### **4.10.1. CellTiter-Blue® Assay**

Se empleó el kit comercial CellTiter-blue® Assay (Promega). Este método colorimétrico se basa en que las células viables, metabólicamente activas, retienen la habilidad de reducir resazurina a resorufina. La máxima absorción de resazurina (azul) es a 605 nm y la de resorufina (rosa) es a 573 nm. Además, la resorufina es un producto fluorescente siendo su longitud de onda de excitación de 530nm y su longitud de onda de emisión de 590nm. Las células fueron sembradas en multiplacas de 96 pocillos por cuadruplicado. Luego del tratamiento con el péptido, las células fueron incubadas con 10 µl de reactivo en 100 µl de DMEM durante 1 hora a 37°C, después fueron lisadas en 3% de SDS, el medio fue recolectado y la absorbancia correspondiente al reactivo resazurina, se leyó a 605 nm y la fluorescencia emitida por la resorufina se leyó a 590 nm empleando un lector de placas. Se realizó en forma paralela un blanco de reactivos en un pocillo libre de células. Los resultados fueron expresados como el porcentaje del valor promedio respecto al valor basal control.

##### **4.10.2. Tinción con cristal violeta**

Luego del tratamiento con el péptido, el medio de incubación fue removido y las células fueron fijadas con metanol durante 15 minutos a -20°C. Después de varios lavados con PBS, se tiñeron con cristal violeta 0,1%, un colorante básico que tiñe núcleos, durante 30 minutos 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.

##### **4.10.3. Ensayo de exclusión del colorante azul de Tripano**

Luego del tratamiento hormonal, las células se lavaron con buffer PBS, se tripsinizaron, se incubaron con el colorante azul de tripano 0,4% y se contaron en una cámara Neubauer mediante su observación en un microscopio. Se contaron las células por campo y se determinó el número de células que excluían el colorante (células viables) en cada condición.

#### 4.11. RT-PCR Cuantitativa en Tiempo Real

Con el fin de evaluar los niveles de ARNm de los genes de interés, el ARN total fue aislado, a partir de los cultivos sometidos a los distintos tratamientos, empleando el kit comercial “High Pure RNA Isolation kit” de Roche y siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad y calidad del ARN aislado se determinó espectrofotométricamente. Esta determinación se basa en la medida de la densidad óptica teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg/ml de ARN.

- Cantidad de ARN µg/ml = 40 x DO 260nm x factor de dilución.

Se chequeó la ausencia de contaminación por proteínas y/o compuestos fenólicos, considerando que la relación entre las absorbancias a 260 nm/280 nm estaba comprendida entre 1,8 - 2,0. Las muestras de ARN fueron guardadas a -80 °C hasta su utilización. Del ARN obtenido se sintetizó el ADN complementario (ADNc) a partir de 1 µg del ARN previamente purificado utilizando el kit comercial “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” de Applied Biosystems, provisto de “random primers” como cebadores, y de la enzima “MultiScribe™ Reverse Transcriptase”. La retrotranscripción se realizó en un termociclador Eppendorf Mastercycler® Personal. La concentración de ADNc, que debe ser similar en todas las muestras, se determinó por espectrofotometría, empleando un programa para la medición de ADN de hebra simple: “single-stranded DNA”. Éste basa su determinación en la medida de la densidad óptica teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 33 µg/ml de ADNc:

- Cantidad de ADN hebra simple µg/ml: 33 X DO260nm X factor de dilución

El ADNc obtenido, correspondiente a cada condición, se almacenó a -20° C hasta su utilización.

Finalmente, la reacción de PCR se llevó a cabo en un sistema de PCR en tiempo real (Applied Biosystems, modelo 7500). Las reacciones de PCR se prepararon utilizando “SYBR Green master Mix” (Applied Biosystems). El ADNc de GAPDH se amplificó en paralelo para todos los genes para proporcionar un control endógeno apropiado. Para cada experimento, una reacción donde se añadió agua como muestra, sirvió como control negativo. El número de ciclos (CT) promedio para cada gen se calculó a partir de tres mediciones. El  $\Delta$ CT se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

- $\Delta$ CT = CT<sub>gen de interés</sub> - CT<sub>gen de GAPDH</sub>

Los niveles de ARNm se calcularon de acuerdo a la siguiente fórmula:

- Niveles de ARNm =  $2^{-\Delta$ CT

#### 4.12. Inmunohistoquímica

Los tumores de los ratones "nude" fueron embebidos en parafina y las secciones de los mismos fueron desparafinadas, rehidratadas y pretratadas para recuperación de antígenos mediada por calor (usando una olla a presión) con tampón de citrato de sodio (10 mM, pH 6) durante 15 minutos. Después de la etapa de recuperación de antígeno, las secciones de tejido se lavaron y se bloquearon en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, y se añadieron los anticuerpos primarios para su incubación en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. La tinción inmunohistoquímica se llevó a cabo manualmente usando el kit comercial "ABCAM Detection IHC Kit" (ABCAM, Cambridge, MA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones de las secciones fueron controladas bajo microscopio y finalmente detenidas con agua destilada. Luego las muestras se contrastaron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron. La tinción se visualizó usando un microscopio óptico de campo claro.

#### 4.13. Evaluación de las tinciones inmunohistoquímicas por índice de expresión

Los niveles de expresión proteica de diversos marcadores moleculares se clasificaron semi-cuantitativamente basándose en las puntuaciones combinadas del porcentaje de células tumorales positivamente teñidas junto con la intensidad de tinción. Un tumor se puntuó como '0' si menos del 5% de las células tumorales se tiñeron positivas, '1' si 5-50% se tiñeron positivas, '2' si más de 50 a 90% de las células se tiñeron positivas y '3' si el 90-100% de las células se tiñeron positivas. La intensidad de tinción se puntuó como "0" si no se producía tinción de las células o si sólo había una tinción débil, "1" si había tinción moderada y "2" en casos de tinción fuerte. La puntuación final de todas las proteínas se definió como "expresión baja de la proteína" si la suma de la puntuación de la positividad y la intensidad de tinción fue de 0-1, "expresión media de la proteína" si la suma fue de 2-3 y "expresión alta de la proteína" si la suma era de 4-5 (Allen, 2006). En cada caso, se evaluaron al menos tres áreas tumorales diferentes y se tomó la media de los resultados como la puntuación final de expresión. El procedimiento de puntuación fue realizado dos veces por dos patólogos independientes que no tenían conocimiento de los datos. La tasa de concordancia entre los dos patólogos fue mayor a 95%.

#### 4.14. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de tres experimentos independientes *in vitro* realizados por triplicado se presentaron como media  $\pm$  DE. Se utilizó la prueba t de Student (de dos colas, igualdad de varianza) para determinar las diferencias significativas entre dos grupos de datos. Se consideraron como estadísticamente significativa valores de P <0,05 y <0,01, que fueron indicados con asteriscos (\* y \*\*, respectivamente).

# 5. RESULTADOS

# CAPÍTULO I:

Efectos de PTHrP en la  
proliferación celular y en la  
modulación de vías  
mitogénicas *in vitro* e *in vivo*

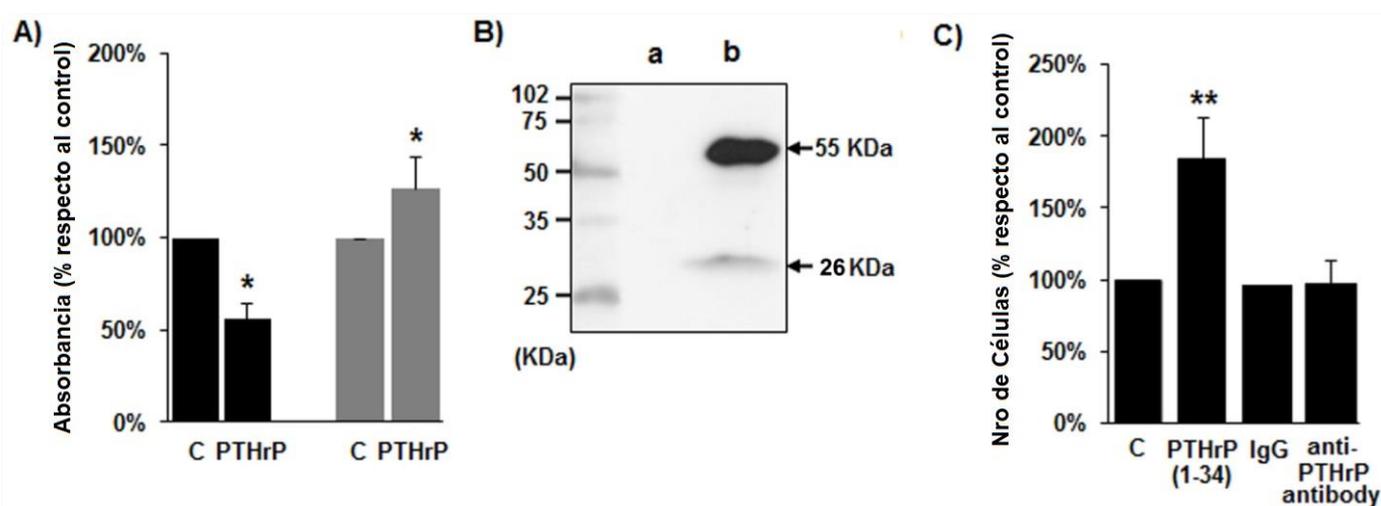
# Sección I: Modulación por PTHrP de las vías de señalización de PI3K/Akt y MAPKs

## 1.1. PTHrP (1-34) exógeno estimula la proliferación en células Caco-2

Es sabido que PTHrP y su receptor (RPTH1) están expresados en el epitelio de las vellosidades intestinales (Watson et al., 2000), sugiriendo que PTHrP ejercería en intestino un papel regulador a través de una vía autocrina y/o parácrina. Con respecto a la acción autocrina, varias evidencias revelaron que la hormona endógenamente sobre-expresada incrementaba la proliferación celular en la línea intestinal tumoral humana LoVo (Shen and Falzon, 2005, Shen et al., 2007, Bhatia et al., 2009, Mula et al., 2010). Una búsqueda de la bibliografía científica que se realizó al momento de comenzar con este Trabajo de Tesis indicaba que hasta esa fecha no había ningún trabajo de investigación evaluando la acción parácrina de la hormona en células intestinales y en células tumorales intestinales. Por otro lado, las investigaciones previamente realizadas en el laboratorio donde se desarrolló este Trabajo de Tesis revelaban que a diferencia de PTH, PTHrP (1-34) ( $10^{-8}$  M) no inducía apoptosis en las células Caco-2; más aún, se había observado un papel protector del péptido frente a la apoptosis inducida por estrés oxidativo en estas células tumorales (Lezcano et al., 2013).

A partir de estos antecedentes, en primer lugar, se decidió investigar los efectos de PTHrP (1-34) ( $10^{-8}$  M) sobre la proliferación de las células Caco-2. Con este fin, las células tratadas con el péptido durante 4-6 días se incubaron con resazurina y, tras el tratamiento, la capacidad metabólica de estas células intestinales se midió como un indicador de viabilidad celular. Se encontró que PTHrP aumentó la biorreducción de resazurina de una manera dependiente del tiempo con la máxima respuesta lograda a los 5 días. Como se muestra en la **Figura 11A**, en células Caco-2 tratadas con PTHrP durante 5 días la cantidad del sustrato resazurina fue 44% por debajo del control (barras negras). También se estimó el número de células en el cultivo tratado con PTHrP usando cristal violeta, un colorante básico que tiñe los núcleos celulares y se observó que el tratamiento con PTHrP durante 5 días aumentó la absorbancia en un 27% con respecto a las células no tratadas. Como PTHrP se expresa en tejido de mucosa colorrectal normal, pólipos y carcinoma colorrectal (Malakouti et al., 1996) y como se observó que su expresión se correlaciona positivamente con la progresión del cáncer de colon, siendo el nivel de expresión mayor en los adenocarcinomas menos diferenciados que en aquellos con mayor grado de diferenciación (Nishihara et al., 1999, Nishihara et al., 2007), entonces se evaluó si PTHrP producido endógenamente y secretado al medio también aumenta la proliferación de las células tumorales Caco-2. Para tal fin primero se examinó

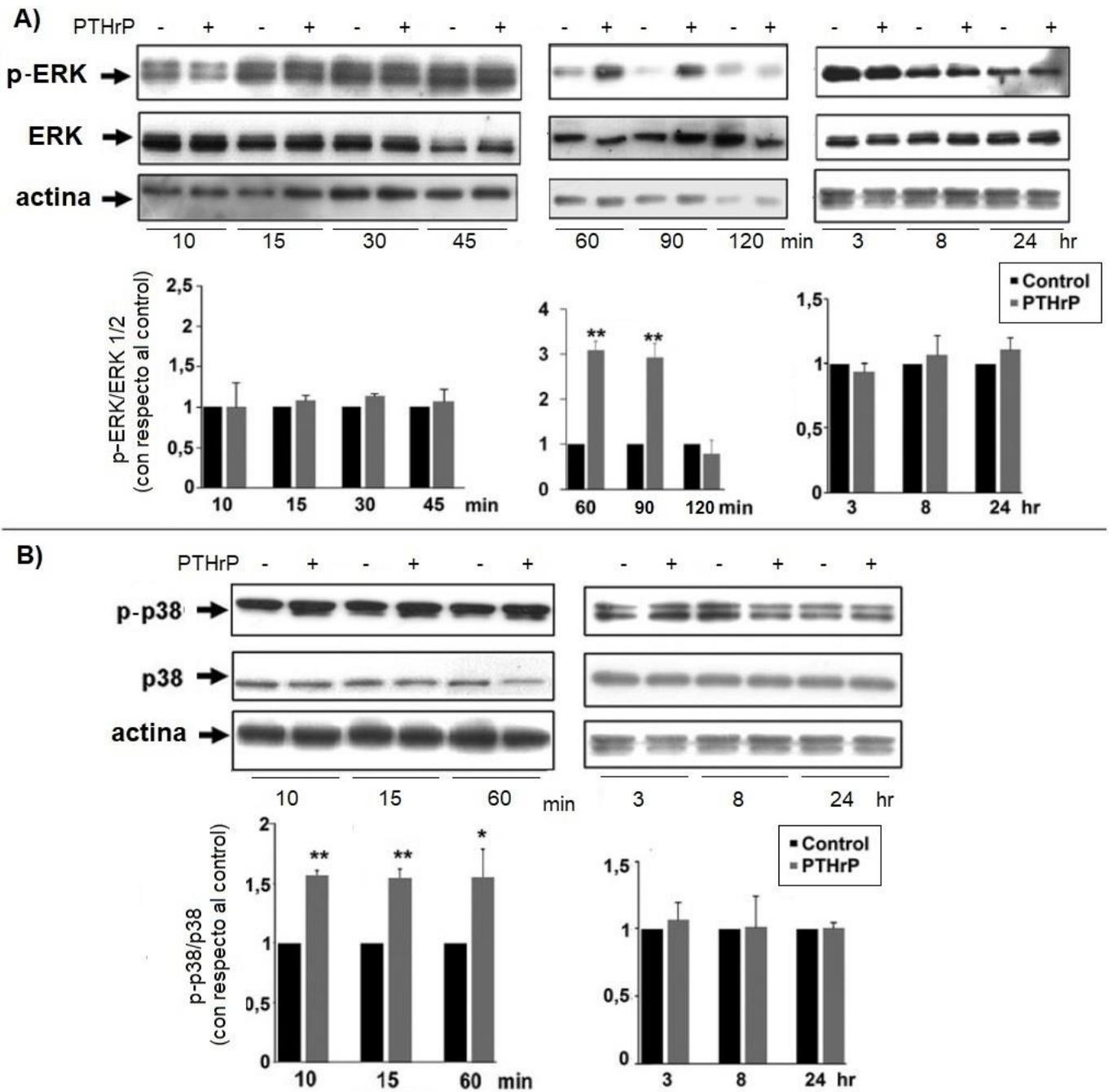
los niveles proteicos de PTHrP en estas células y en el medio en el que las células fueron cultivadas. Como se muestra en la **Figura 11B**, el análisis por Western blot empleando un anticuerpo anti-PTHrP monoclonal reveló la presencia de una proteína de 27 KDa, el tamaño esperado para la hormona PTHrP de longitud completa (Rizk-Rabin et al., 2008) en el medio en el que las células fueron cultivadas. Se observó también otra banda de 55 kDa (que corresponde a una proteína no específica, pero con inmunorreactividad contra el anticuerpo anti-PTHrP). Sin embargo, la expresión proteica de PTHrP de 26 kDa no se observó en el lisado de las células Caco-2, lo que sugiere que estas células tumorales intestinales sintetizan PTHrP que es totalmente secretada al medio. Basado en este hallazgo, se eligió exponer a las células Caco-2 durante 5 días a un anticuerpo contra PTHrP de longitud completa (0,1 µg / ml) o PTHrP (1-34) para investigar la influencia de PTHrP endógena sobre la proliferación celular. Se estimó el número de células vivas mediante el ensayo de exclusión del colorante azul de tripano que el tratamiento con PTHrP (1-34) aumentó el número de células a los 5 días (83% respecto a las células de control) (**Figura 11C**). Sin embargo, la exposición al anticuerpo no disminuyó el número de células, lo que sugiere que PTHrP endógena no es necesaria para estimular el crecimiento celular.



**Figura 11. PTHrP exógeno (1-34) estimula la proliferación de células Caco-2.** (A) Las células Caco-2 se expusieron a PTHrP (1-34)  $10^{-8}$ M (5 días). El número de células viables se determinó mediante el reactivo Resazurina y tinción con cristal violeta como se describe en materiales y métodos. Los resultados se expresaron como porcentaje con respecto al control de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $P < 0,05$  con respecto al control correspondiente. (B) Niveles de expresión proteicos de PTHrP. Se obtuvieron proteínas del lisado de células Caco-2 (a, calle izquierda) y del medio en el que las células se incubaron (b, calle derecha) como se describe en la metodología y luego se analizaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS - PAGE) seguido por inmunotransferencia usando un anticuerpo monoclonal contra PTHrP de longitud completa. Se muestra un inmunoblot representativo de dos experimentos independientes. (C) No se requiere de PTHrP endógeno para estimular el crecimiento celular. Luego de la exposición de las células Caco-2 por 5 días a un anticuerpo que neutraliza PTHrP de longitud completa (0,1 mg/ml) o a PTHrP (1-34), se realizaron recuentos celulares en una cámara Neubauer empleando la técnica de exclusión de colorante azul de tripano. IgG se refiere a IgG no específica, 0,5 ml / ml. Los efectos de cada tratamiento se han comparado con el control (células no tratadas). El control se ha establecido en 100%. Los datos mostrados son el promedio del número de células de tres experimentos independientes. \*\*  $P < 0,01$  con respecto al control correspondiente.

## 1.2. PTHrP induce la fosforilación/activación de las MAPKs en las células Caco-2.

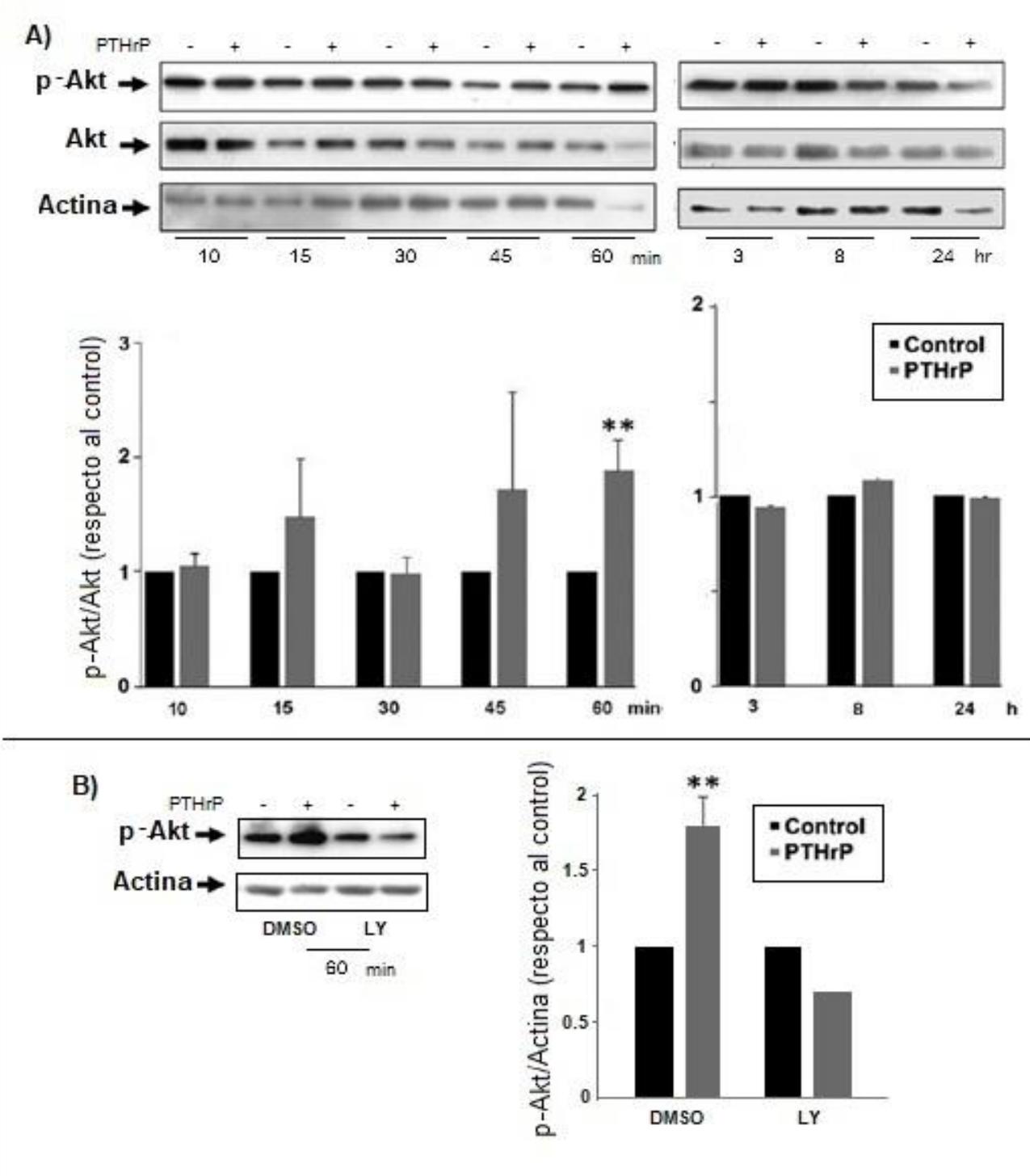
La actividad MAPK es esencial para muchas funciones celulares y estas quinasas median la proliferación de las células Caco-2 inducida por suero (Buzzi et al., 2009). Basado en los efectos proliferativos de PTHrP exógeno seguidamente se investigaron los cambios en la fosforilación de ERK1/2 y p38 MAPKs, que son las dos subfamilias de MAPKs que generalmente participan en respuestas celulares asociadas a proliferación, con el objetivo de dilucidar si PTHrP es capaz de activar estas cascadas de MAP quinasas en las células Caco-2. Para ello, se expusieron estas células por diferentes tiempos a PTHrP, las proteínas de los lisados celulares fueron separadas mediante SDS-PAGE y luego se inmunotransferieron e incubaron con un anticuerpo que reconoce específicamente la forma activa de las MAPK como se detalla en Materiales y Métodos. Como se muestra en la **Figura 12A** (panel central), el tratamiento con PTHrP durante 60-90 minutos incrementó notablemente la fosforilación de ERK 1/2. El efecto de PTHrP fue dependiente del tiempo y disminuyó a las 3 horas de estimulación con el péptido (**Figura 12A**, panel derecho). Los niveles proteicos de ERK 1/2 total no fueron diferentes en ausencia o presencia de PTHrP demostrando un verdadero aumento en su estado de fosforilación/activación (**Figura 12A**). El análisis por Western blot con un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de la isoforma  $\alpha$  de p38 MAPK reveló que PTHrP indujo rápidamente un aumento de la fosforilación de esta quinasa. El efecto fue significativo para el intervalo de exposición entre 10 y 60 minutos (**Figura 12B** panel izquierdo). No se observaron efectos cuando las células Caco-2 fueron expuestas a PTHrP durante períodos más largos (3-24 horas, **Figura 12B**, panel derecho). El análogo tumoral de PTH no modificó la expresión proteica de  $\alpha$ p38 MAPK (**Figura 12B**, paneles izquierdo y derecho) y este resultado excluyó la posibilidad de que un aumento en la expresión proteica de  $\alpha$ p38 tras el tratamiento pudiera contribuir a cambios en la fosforilación de  $\alpha$ p38.



**FIGURA 12. (A) Fosforilación inducida por PTHrP de ERK 1/2 en células Caco-2.** Las células Caco-2 se trataron con PTHrP (1-34)  $10^{-8}$  M por diferentes intervalos de tiempo (10-120 min y 3-24 horas). Las proteínas totales de los lisados celulares se extrajeron y separaron mediante Western blot. Se emplearon anticuerpos anti-MAPKs específicos. Las membranas se re-incubaron con anticuerpo anti- $\beta$ -actina para asegurar la equivalencia de contenido de proteína entre las diferentes condiciones experimentales. Se muestra un inmunoblot representativo y la cuantificación por densitometría de tres experimentos independientes; se muestran el promedio  $\pm$  S.D. \*\* P <0,01 con respecto al control. **(B) Fosforilación inducida por PTHrP de p38 MAPK en células Caco-2.** Las células Caco-2 se trataron con PTHrP (1-34)  $10^{-8}$  M por diferentes intervalos de tiempo (10-60 min y 3-24 horas). Las proteínas totales de los lisados celulares se extrajeron y separaron mediante Western blot. Las membranas se re-incubaron con anticuerpo anti- $\beta$ -actina para asegurar la equivalencia de contenido de proteína entre las diferentes condiciones experimentales. Se muestra un inmunoblot representativo y la cuantificación por densitometría de tres experimentos independientes; se muestran el promedio  $\pm$  S.D.\* P <0,05, \*\* P <0,01 con respecto al control.

### 1.3. PTHrP estimula la fosforilación/activación de la quinasa Akt a través de la vía de señalización de PI3K en células Caco-2.

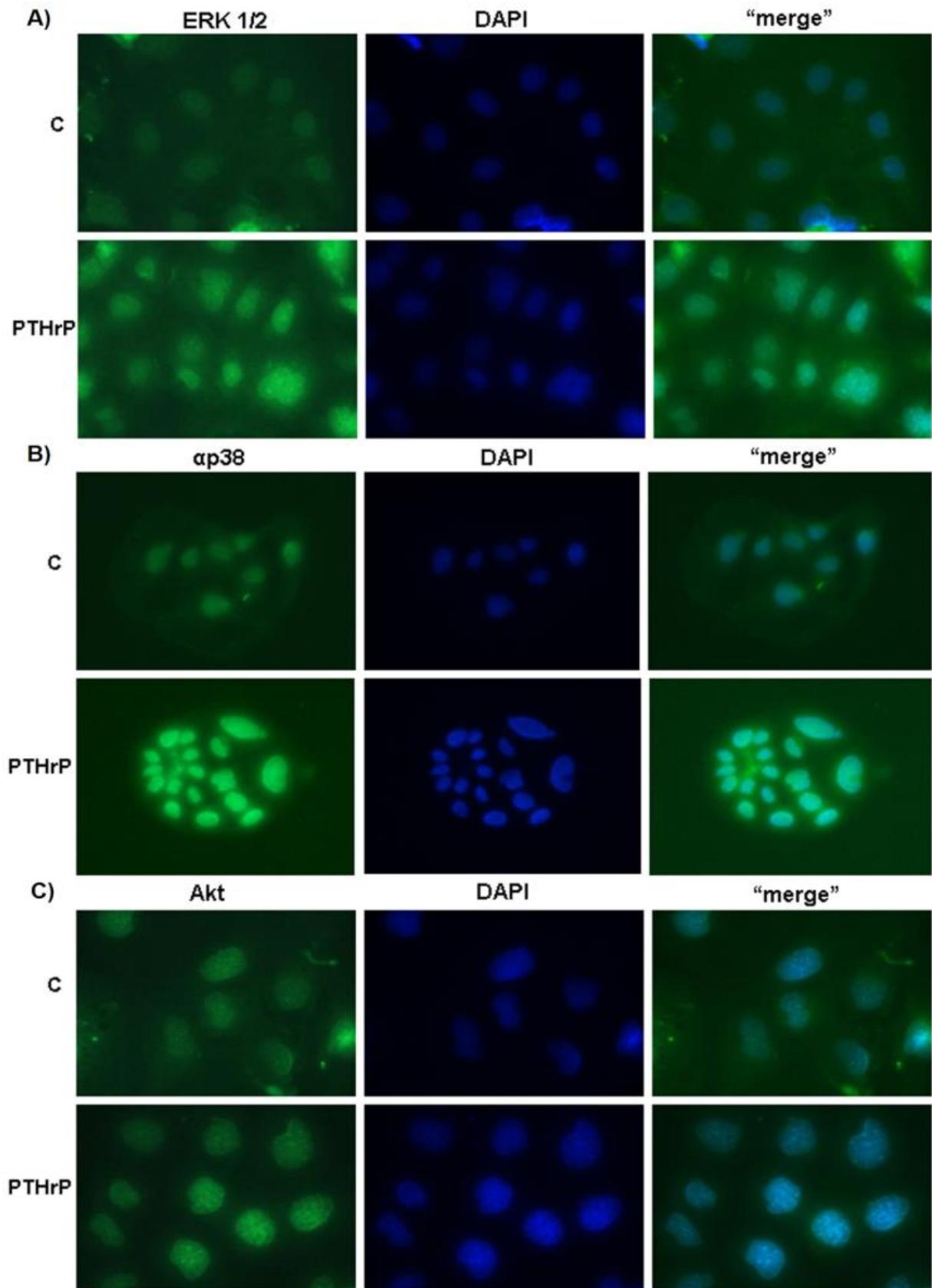
Dado que existen varios estudios que sugieren que la vía PI3K-Akt es vital para el crecimiento de las células de cáncer de colon (Pandurangan, 2013), entonces se investigó si PTHrP exógeno activa a Akt en las células Caco-2. Después del tratamiento con el análogo tumoral de PTH por diferentes tiempos, se determinó la fosforilación de Akt por análisis de Western blot utilizando un anticuerpo específico contra el residuo fosfo-Ser-473 de Akt. La **Figura 13A** (panel izquierdo) muestra que la fosforilación de Akt aumentó significativamente luego de 1 hora de exposición a PTHrP y volvió a niveles casi basales luego de 3-24 horas (**Figura 13A**, panel derecho). Además, no hubo cambio en la expresión proteica de Akt en ninguno de los tiempos estudiados (**Figura 13A**, paneles izquierdo y derecho). A partir de este hallazgo, se investigó si la activación de Akt es exclusivamente a través de la quinasa PI3K. Para tal fin se pre-incubaron las células Caco-2 con un inhibidor específico de PI3K, LY294002 (50  $\mu$ M), y después se trataron las células durante 1 hora con PTHrP. El análisis por Western blot usando un anticuerpo contra el residuo fosforilado serina 473 de Akt reveló que el inhibidor de PI3K suprime totalmente la fosforilación de Akt inducido por el tratamiento hormonal (**Figura 13B**).



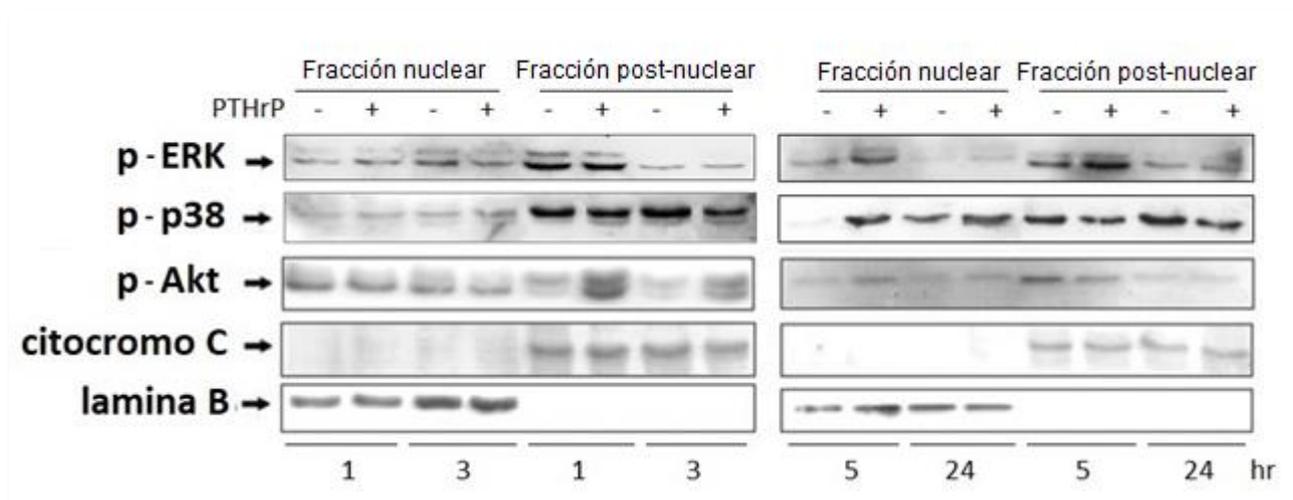
**Figura 13. (A) Fosforilación de Akt en células Caco-2 estimuladas con PTHrP.** Se trataron células Caco-2 con PTHrP (1-34)  $10^{-8}$  M durante los tiempos indicados. Las proteínas del lisado celular se separaron por SDS-PAGE, seguido de Western blot y luego se incubaron con el anticuerpo anti-fosfo-Ser 473 Akt como se describe en materiales y métodos. Akt total se midió en la misma membrana, luego de la remoción del anticuerpo y re-incubación con el anticuerpo anti-Akt. Para asegurar la equivalencia del contenido de proteína entre las diferentes condiciones experimentales todas las membranas se re-probaron con el anticuerpo anti- $\beta$ -actina. \*\*  $P < 0,01$  con respecto al control. **(B) PI3K media la activación de Akt inducida por PTHrP.** Las células se pre-incubaron por 30 min con LY294002 (50uM) y luego fueron tratadas con PTHrP por 60 minutos. Las condiciones de control se realizaron en ausencia o presencia de DMSO (vehículo del inhibidor). \*\*  $P < 0,01$  con respecto al control.

#### 1.4. PTHrP induce la localización nuclear de ERK, p38 MAPK y Akt.

Dado que las MAPK activas translocan desde el citoplasma al núcleo para controlar la proliferación celular (Cargnello and Roux, 2011), y también en un paso posterior a su activación la quinasa Akt puede translocar al núcleo donde se encuentran muchos de sus sustratos (Osaki et al., 2004), entonces se realizaron estudios de inmunocitoquímica y observación mediante microscopía de fluorescencia para examinar la localización de ERK1/2,  $\alpha$  p38 MAPK y Akt en las células Caco-2 expuestas a PTHrP. En las **Figuras 14 A, B y C** se muestra que tanto las MAPK como Akt se distribuyen en el citoplasma y el núcleo de las células Caco-2 en condiciones basales. Sin embargo, luego de la exposición a PTHrP por 24 horas, la fluorescencia nuclear fue más intensa que la observada en las células control, mientras que la inmunoreactividad de todas estas quinasas fue más difusa en el citoplasma, sugiriendo que la hormona induce la translocación de estas quinasas al núcleo. Para confirmar estos datos, las proteínas tanto citosólicas como nucleares aisladas por fraccionamiento subcelular de células tratadas en presencia o ausencia de PTHrP durante 1 a 24 horas fueron separadas por SDS-PAGE seguido por Immunoblotting usando los anticuerpos que reconocen a las formas fosforiladas/activas de ERK, p38 MAPK y Akt. Consistente con los resultados previamente observados, el análisis de los datos obtenidos por la técnica de Western blot revelan que el tratamiento hormonal induce un aumento de p-ERK tanto a nivel nuclear como citoplasmático luego de 5 horas, en cambio p-p38 aumentó en el núcleo y disminuyó en el citosol a todos los tiempos estudiados. Por último, los niveles proteicos de p-Akt se vieron incrementados en el núcleo luego de 5 horas de tratamiento con PTHrP (**Figura 15**).



**Figura 14. Localización subcelular de ERKs,  $\alpha$ p38 MAPK y Akt en células Caco-2 estimuladas con PTHrP.** Panel superior: Las células Caco-2 se estimularon con el análogo tumoral de PTH (1-34)  $10^{-8}$  M durante 1 a 6 horas, se incubaron con los anticuerpos (A) anti-ERK1/2, (B) anti-p38 MAPK y (C) anti-Akt. Las muestras se observaron por microscopía de fluorescencia. Se muestran fotografías representativas de dos experimentos independientes.



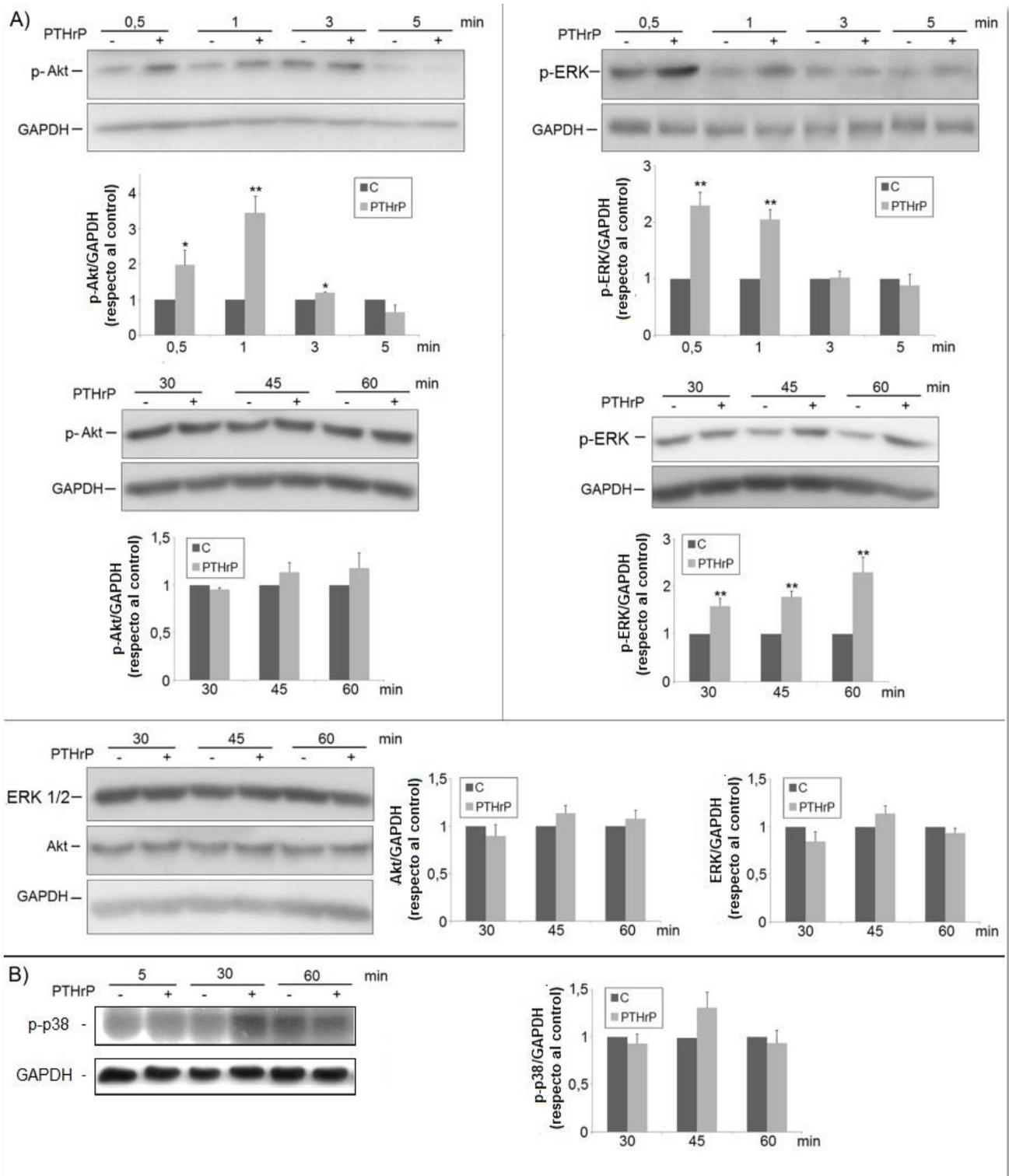
**Figura 15. Localización nuclear de p-ERK, p-p38 y p-Akt luego del tratamiento con PTHrP.** Las células Caco-2 fueron tratadas con PTHrP por 1 a 24 horas y luego se separaron las fracciones nucleares y citoplasmáticas de acuerdo a lo descrito en la sección Materiales y Métodos. Se muestra un inmunoblot representativo de 2 experimentos independientes. Para confirmar la pureza de las fracciones y la equivalencia de proteínas por calle se empleó un anticuerpo que reconoce a la proteína nuclear Lamina B y un anticuerpo contra la proteína citosólica citocromo C.

### 1.5. En las células HCT116, PTHrP estimula la fosforilación/activación de Akt y ERK e induce un aumento en la proliferación celular.

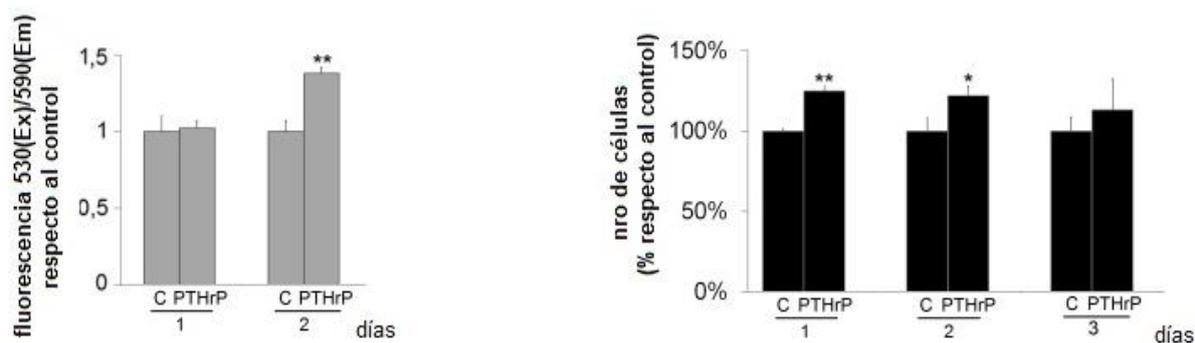
En base a los efectos de PTHrP que hasta ese momento se estaban observando en las células Caco-2 y teniendo en cuenta que PTHrP tiene efectos discordantes dependiendo del tipo y contexto celular (Maioli and Fortino, 2004), entonces se decidió continuar las investigaciones en las células Caco-2 y emplear simultáneamente la línea celular HCT116, que también es una línea tumoral intestinal humana pero de fenotipo diferente con el fin de comparar la respuesta de ambos tipos celulares a PTHrP.

Las células Caco-2 son derivadas de adenocarcinoma colorrectal mientras que las células HCT116 son derivadas de carcinoma colorrectal. En las células Caco-2 numerosas proteínas muestran un patrón de expresión similar respecto al epitelio intestinal humano normal; sin embargo, se ha descrito una mutación en el gen TP53 (Ahmed et al., 2013). La línea celular HCT116 muestra un fenotipo más agresivo respecto a la línea Caco-2 debido a mutaciones hiperactivadoras en genes KRAS y PIK3CA, mientras que el gen TP53 permanece en estado wt (Ahmed et al., 2013). Al igual que en las células Caco-2, en las células HCT116 se ha demostrado la presencia del RPTH1 (Calvo et al., 2014).

Como el tratamiento con PTHrP exógeno durante 15 minutos activa a p38 MAPK y durante 1 hora activa las enzimas Akt (a través de PI3K) y ERK 1/2 en las células Caco-2, entonces evaluamos si la hormona también cambia el estado de fosforilación de p38 MAPK, Akt y ERK1/2 en las células HCT116. Con este fin, las células HCT116 se expusieron a PTHrP por diferentes intervalos de tiempo, las proteínas de los lisados celulares se sometieron a SDS-PAGE y luego se inmunotransferieron e incubaron con un anticuerpo anti fosfo- $\alpha$ p38, anti-fosfo (Ser473) de Akt o con un anticuerpo que reconoce la forma activa de ERK 1/2 MAPK. **La Figura 16A** (panel izquierdo y superior) muestra que la fosforilación de Akt aumentó significativamente a 0,5-1 y 3 minutos de exposición a PTHrP y volvió a niveles casi basales después de 5 minutos. Además, no hubo cambios en la expresión proteica de Akt durante los tiempos examinados (**Figura 16A**, panel inferior). PTHrP aumentó marcadamente la fosforilación de ERK 1/2 de una manera dependiente del tiempo. La respuesta a PTHrP fue bifásica, con una fase temprana (0,5-1 minutos) y una segunda fase alcanzando su máximo a 1 hora (**Figura 16A**, panel superior y derecho) y retornando a valores basales después de 1 hora de tratamiento con la hormona. Los niveles proteicos de ERK 1/2 total no fueron diferentes en ausencia o presencia de PTHrP demostrando un verdadero aumento en su estado de fosforilación (**Figura 16A** panel inferior). En conjunto, estos resultados indican que PTHrP también induce la activación de las vías mitogénicas de Akt y ERK1/2 en las células HCT116. Sin embargo, no se observaron cambios en la fosforilación de p38 en esta línea celular debido al tratamiento con PTHrP, al menos a los tiempos estudiados (**Figura 16B**). Como la hormona induce la proliferación de las células Caco-2 el siguiente objetivo fue evaluar esta respuesta a la acción hormonal en células HCT116. Para este fin, las células tratadas con el péptido durante 1-2 días se incubaron con resazurina y tras el tratamiento se midió la capacidad metabólica de estas células intestinales como un indicador de viabilidad celular. Se consideró este tiempo de tratamiento hormonal debido a que el tiempo de duplicación de las células HCT116 es más corto que el observado en las células Caco-2 (21 horas y 36 horas, respectivamente, estos datos están disponibles en los protocolos proporcionados por la ATCC). Se encontró que PTHrP aumentó la biorreducción de resazurin a resorufina en forma dependiente del tiempo con la máxima respuesta lograda a los 2 días. Como se muestra en la **Figura 17**, en células HCT116 tratadas con PTHrP durante 2 días, la cantidad del producto resorufina fue del 38% por encima del control (barras grises). También se estimó el número de células que excluyeron el colorante azul de tripano (células viables) en cada condición y se observó que el tratamiento con PTHrP durante 1-2 días aumentó el número de células vivas respecto a las células no tratadas (**Figura 17**, barras negras).



**Figura 16.(A) Efectos de PTHrP sobre la fosforilación ERK 1/2 y de Akt.** Las células HCT116 se trataron en presencia o ausencia de PTHrP (1-34)  $10^{-8}$  M por diferentes intervalos de tiempo (0,5 a 5 minutos y 30 a 60 minutos) como se muestra en los paneles superior e inferior. El análisis por Western blot de las proteínas de los lisados celulares se llevó a cabo utilizando anticuerpos anti-fosfo (Ser473) Akt y anti-fosfo ERK 1/2, (paneles superiores izquierdo y derecho, respectivamente). ERK 1/2 y AKT total se midieron como se muestra en el panel inferior. **(B) p38 MAPK no es fosforilada por PTHrP en células HCT116, al menos a los tiempos estudiados.** Las células se trataron en presencia o ausencia de PTHrP (1-34)  $10^{-8}$  M por 5 a 60 minutos. El análisis por Western blot de las proteínas de los lisados celulares se llevó a cabo utilizando anticuerpos anti-fosfo- $\alpha$  p38. Las membranas se re-incubaron con el anticuerpo anti-GAPDH para asegurar la equivalencia de la carga de proteína. Se muestran blots representativos y la cuantificación por densitometría de tres experimentos independientes; Se indica el promedio  $\pm$  S.D. \* P <0,05, \*\* P <0,01.

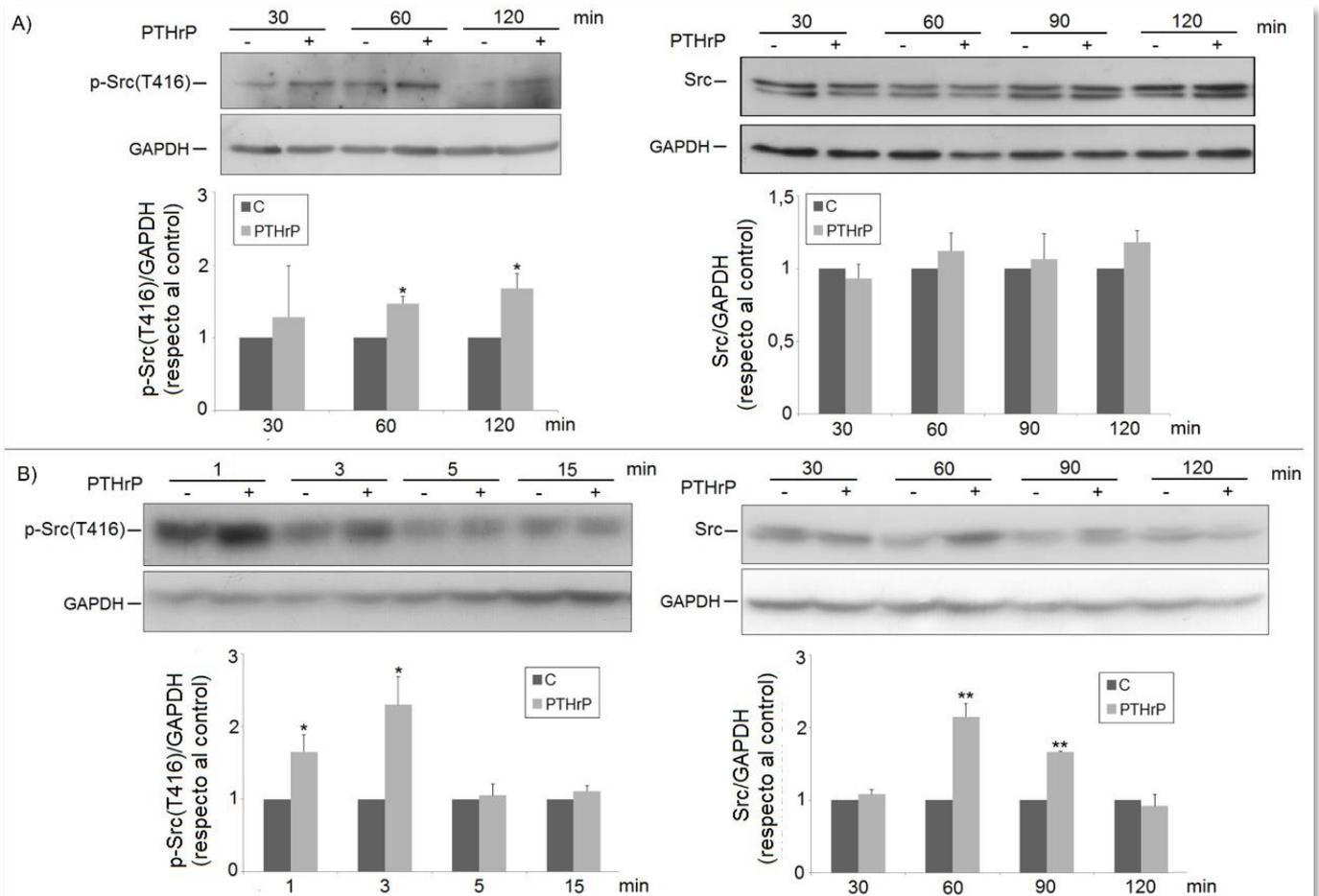


**Figura 17. PTHrP exógeno estimula la proliferación de las células HCT116.** El número de células viables se determinó mediante la incubación con Resazurina y el ensayo de exclusión de colorante azul de tripano como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresaron como porcentaje con respecto al control de tres mediciones independientes realizadas por triplicado \* P <0,05, \*\* P <0,01.

## 1.6 Vías de señalización involucradas en la activación de ERK 1/2 MAPK inducida por PTHrP en las células Caco-2 y en las células HCT116

### 1.6.1 PTHrP induce la fosforilación y la activación de la quinasa c-Src en las células Caco-2 y en las células HCT116.

El aumento de la actividad Src se ha reportado en muchos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de colon (Steege, 2016). Para evaluar si Src es parte del mecanismo de señalización de PTHrP en células tumorales intestinales, primero se estudió si la hormona afecta la activación de Src investigando su estado de fosforilación en el residuo de Tyr416 dado que en esta enzima, la autofosforilación en esta tirosina de su dominio quinasa altera su conformación y aumenta su actividad quinasa intrínseca (Chen et al., 2014). Las células Caco-2 y las células HCT116 se expusieron a PTHrP durante los tiempos indicados en la **Figura 18A** y la **Figura 18B** seguido del análisis por Western blot de las proteínas de los lisados celulares empleando el anticuerpo contra el residuo fosforilado de la tirosina 416 de Src. Como muestran los paneles izquierdos de las **Figuras 18A** y **18B**, PTHrP aumenta transitoriamente la fosforilación en Tyr416 de c-Src, con efectos máximos a los 60-120 minutos y a 1-3 minutos para las células Caco-2 y las células HCT116, respectivamente. El análisis de inmunoblots utilizando un anticuerpo anti-Src reveló que el tratamiento con la hormona durante 60 y 90 minutos induce cambios en la expresión de la proteína c-Src en células HCT116 (**Figura 18B**, panel derecho). Sin embargo, la expresión de la proteína c-Src no fue diferente en las células Caco-2 tratadas con PTHrP durante 30 a 120 minutos (**Figura 18A**, panel derecho).

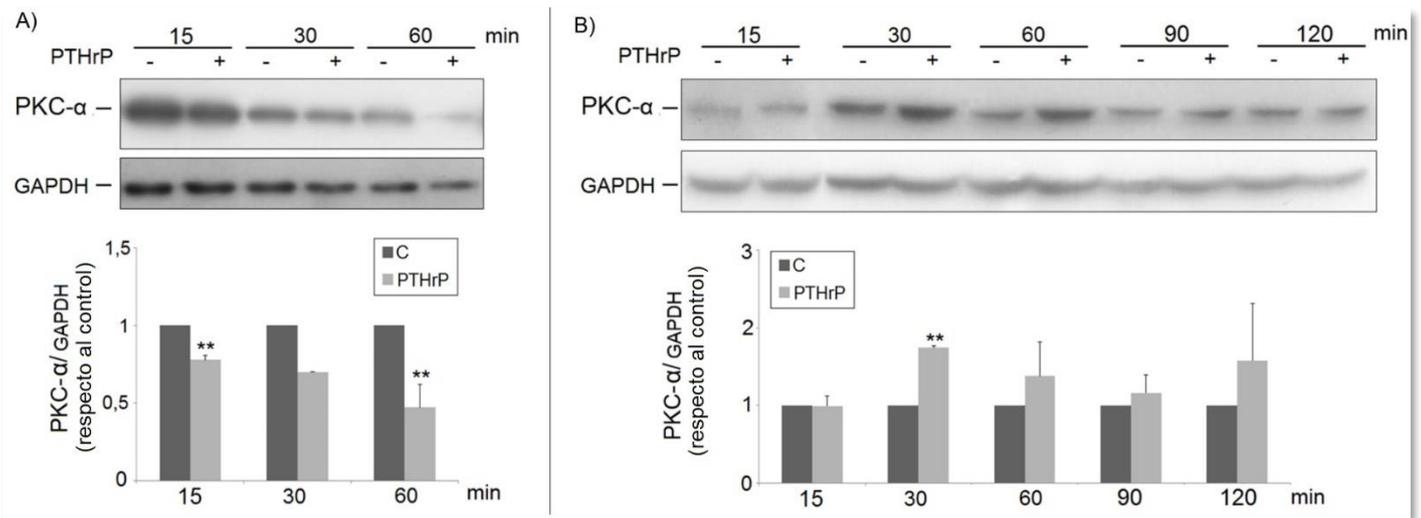


**Figura 18. PTHrP activa la quinasa Src en las líneas celulares tumorales intestinales.** Se cultivaron las células Caco-2 (A) y HCT116 (B) y se incubaron en ausencia o presencia de PTHrP (1-34)  $10^{-8}$  M durante 30 a 120 minutos o 1 a 120 minutos, respectivamente. El análisis por la técnica de Western blot de lisados celulares se llevó a cabo utilizando anticuerpos anti-fosfo (Tyr416) Src y anti-Src. Las membranas se re-incubaron con anticuerpo anti-GAPDH para asegurar la equivalencia de la carga de proteína. Se muestran inmunoblots representativos y la cuantificación por densitometría de tres experimentos independientes; se indica el promedio  $\pm$  S.D. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .

### 1.6.2 Rol de PTHrP en los cambios de expresión proteica de la isoenzima $\alpha$ de la proteína quinasa C en las células Caco-2 y en las células HCT116.

En el cáncer, las distintas isoenzimas de PKC desempeñan un papel crítico en la proliferación celular, supervivencia, invasión, migración, apoptosis, angiogénesis y resistencia a los fármacos contra el cáncer (Kang, 2014). Con respecto a PKC $\alpha$ , una de las isoenzimas más ampliamente estudiadas en relación con el cáncer, se sabe que la regulación negativa de su expresión aumenta la proliferación celular, disminuye la diferenciación y favorece el fenotipo transformado de las células Caco-2 (Scaglione-Sewell et al., 1998). Como se ha demostrado previamente que PTHrP induce la proliferación de las células Caco-2 y se observó la misma respuesta hormonal en las células HCT116, entonces se evaluó si la hormona modifica

la expresión proteica de PKC $\alpha$  en estas células tumorales intestinales. Para este fin, las células Caco-2 y las células HCT116 se expusieron a PTHrP durante los tiempos indicados en la **Figura 19** seguido del análisis por Western blot de las proteínas de los lisados celulares empleando el anticuerpo anti-PKC $\alpha$ . Como se muestra en la **Figura 19** (panel izquierdo), los niveles de la proteína PKC $\alpha$  disminuyeron en las células Caco-2 expuestas a PTHrP durante 60 minutos, mientras que el tratamiento con la hormona durante 30 minutos aumentó la expresión proteica de esta isoenzima en las células HCT116 (**Figura 19**, panel derecho).

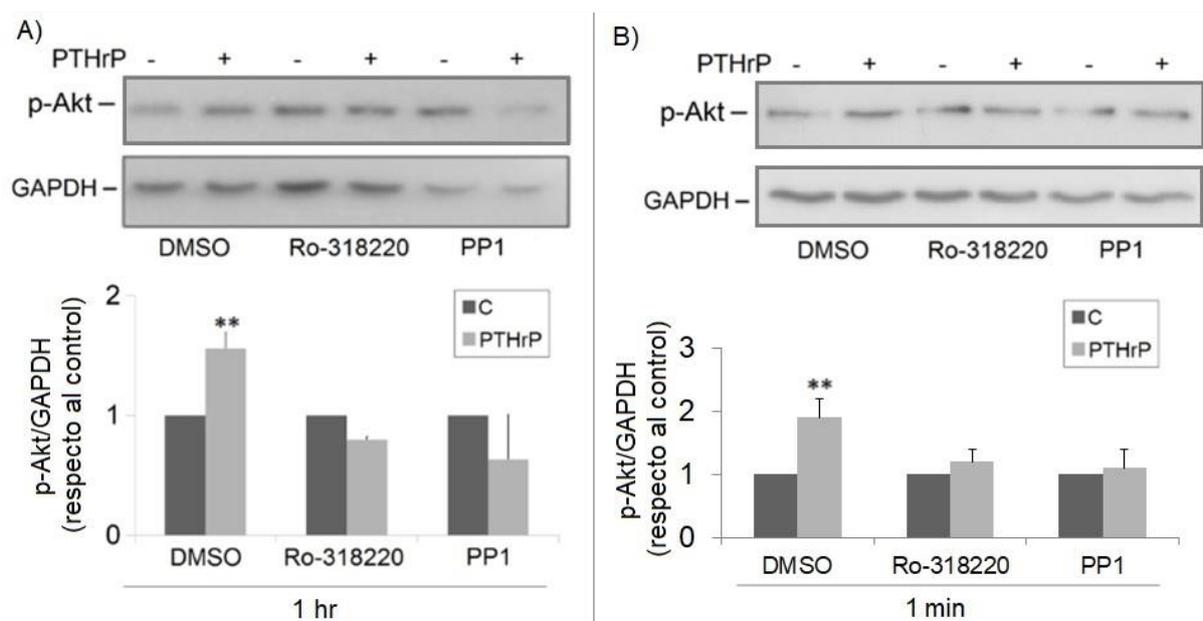


**Figura 19. Efectos de PTHrP sobre la expresión de PCK $\alpha$ .** Se trataron las células Caco-2 (**A**) y HCT116 (**B**) con PTHrP (1-34)  $10^{-8}$  M durante 15 a 60 minutos y 15 a 120 minutos, respectivamente. Las proteínas de los lisados se procesaron como se describe en Materiales y Métodos, se separaron en SDS-PAGE y se realizaron inmunoblots utilizando el anticuerpo anti-PCK $\alpha$ . Con el fin de evaluar la equivalencia del contenido de proteínas entre las diferentes condiciones experimentales, las membranas fueron re-probados con el anticuerpo anti-GAPDH. Se muestran inmunoblots representativos y la cuantificación por densitometría de tres experimentos independientes; se indican el promedio  $\pm$  SD. \*\*  $P < 0,01$ , con respecto al control correspondiente.

### 1.6.3. Las vías de señalización PKC, Src y Akt modulan la fosforilación y la activación de ERK 1/2 inducida por PTHrP en células tumorales intestinales.

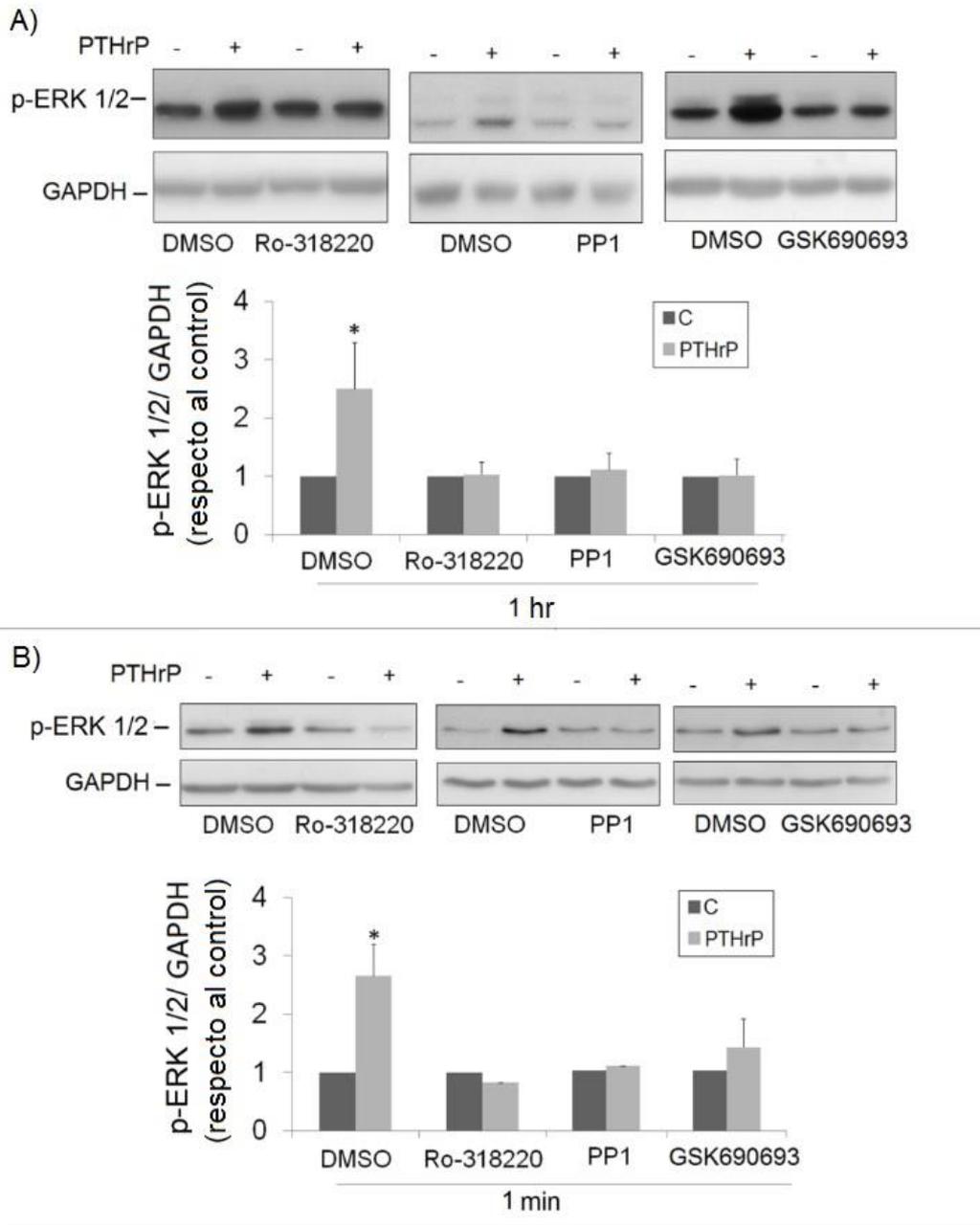
Se ha informado que la desregulación de la expresión y/o activación de Src puede favorecer la progresión del cáncer de colon a través de múltiples vías de señalización, incluyendo PI3K / Akt (Chen et al., 2014). Con respecto a PKC, varias de sus isoenzimas estimulan la supervivencia o la proliferación de las células tumorales a través de diferentes vías de señalización tales como PI3K / Akt (Kang, 2014). Basados en estas observaciones, se evaluó si las vías de señalización de PKC y Src están involucrados en la fosforilación de Akt inducida por PTHrP en células tumorales intestinales. Para ello, las células Caco-2 y las células HCT116 se pre-incubaron con un inhibidor específico de PKC, Ro-318220 (200 nM) o con

un inhibidor específico de Src, PP1 (10  $\mu$ M) y después se trataron las células Caco-2 y HCT116 durante 60 minutos o 1 minuto con PTHrP, respectivamente. El análisis de los resultados obtenidos mediante la técnica de Western blot usando un anticuerpo anti-fosfo (Ser473) de Akt reveló que ambos inhibidores suprimieron totalmente la fosforilación de Akt dependiente de la hormona en ambas líneas celulares (**Figura 20A y 20B**). DMSO, que es el vehículo de ambos inhibidores, se usó en células control.



Se sabe que la estimulación de la cascada Ras/Raf/MEK/ ERK puede ocurrir mediante la activación de la quinasa Src (McCubrey et al., 2007) o mediante la activación directa de Raf vía PKC (Plotnikov et al., 2011). Además la ruta PI3K/Akt es necesaria para la activación de ERK1/2 en muchos tipos de células (Steelman et al., 2011, Ebi et al., 2013). A partir de estos antecedentes y de la evidencia de que tanto PKC como c-Src están involucradas en la fosforilación/activación de Akt inducida por PTHrP en ambas líneas celulares, entonces el próximo objetivo fue investigar si estas quinastas participan en la activación de ERK 1/2 MAPK desencadenada por PTHrP en ambas líneas celulares. Para este fin, las células se pre-incubaron con un inhibidor específico de Akt, GSK690693 (50 nM), con Ro-318220 (200 nM), o con PP1 (10  $\mu$ M), y después se trataron las células Caco-2 durante 60 minutos con PTHrP mientras que las células HCT116 fueron expuestas a la hormona por 1 minuto seguido del análisis por Western blot

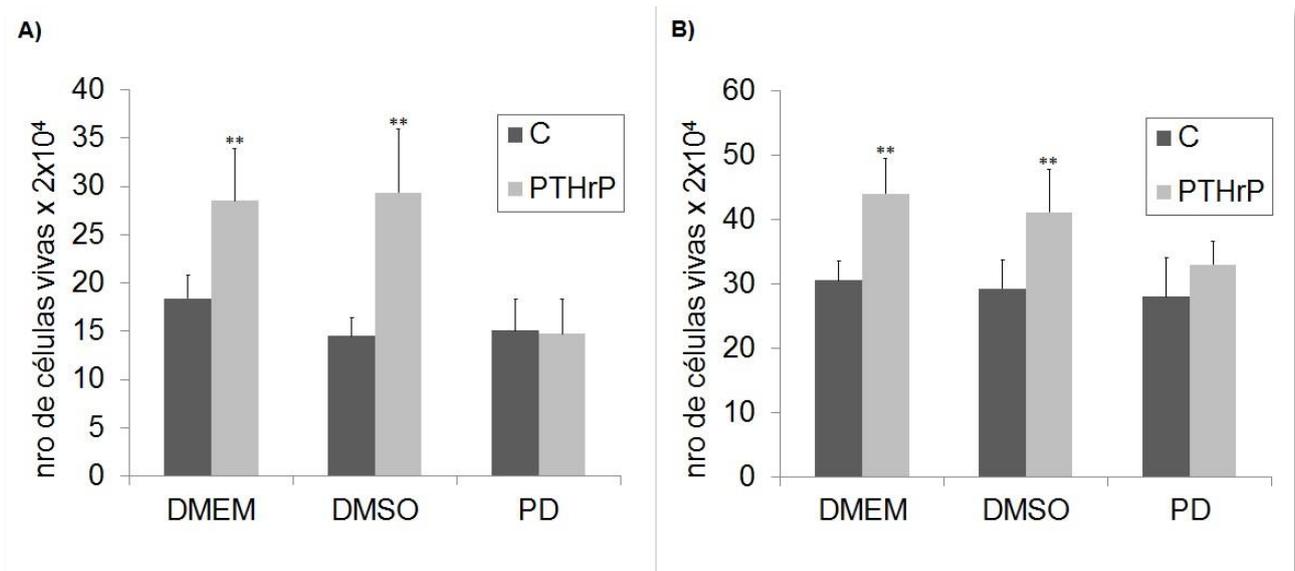
empleando un anticuerpo que reconoce la forma activa de ERK 1/2. Se observó que todos los inhibidores empleados suprimieron la fosforilación de ERK 1/2 MAPK dependiente de la hormona tanto en las células Caco-2 (**Figura 21A**) como en las células HCT116 (**Figura 21B**). En conjunto, estos resultados indican que las vías de señalización de PKC, Src y Akt modulan la fosforilación y la activación de ERK 1/2 inducida por PTHrP en ambas líneas tumorales intestinales.



**Figura 21.** Las células Caco-2 (**A**) y HCT116 (**B**) se pre-incubaron durante 30 minutos con Ro-318220 (200 nM), PP1 (10  $\mu$ M) o GSK690693 (50 nM) y luego se trataron con PTHrP (1-34)  $10^{-8}$  M durante 1 hora o un minuto, respectivamente. Se utilizó un anticuerpo anti-fosfo ERK 1/2. Las membranas se reprobaron con anticuerpo anti-GAPDH para asegurar la equivalencia de la carga de proteína. DMSO, que es el vehículo de los inhibidores, se usó en células control. Se muestran inmunoblots representativos y la cuantificación por densitometría de tres experimentos independientes; se indican el promedio  $\pm$  S.D. \*P < 0,05.

### 1.7. PTHrP estimula la proliferación de las células Caco-2 y de las células HCT116 a través de la vía de señalización de ERK 1/2 MAPKs

En vista de la relevancia de la vía ERK 1/2 MAPK en la regulación de la proliferación de las células tumorales (Dhillon et al., 2007, Mebratu and Tesfagzi, 2009), y de que varias vías de señalización conducen a la activación de estas quinasas inducida por PTHrP en ambas líneas derivadas de CCR, entonces se realizaron estudios para comprobar si PTHrP exógeno aumenta el número de células Caco-2 y HCT116 a través de la activación de estas enzimas. Para este fin, las células se pre-incubaron con PD98059 (20  $\mu$ M), que es un inhibidor específico de MEK 1/2 (las quinasas que activan las ERK1/2), y luego se trataron las células Caco-2 durante 5 días y las células HCT116 durante 2 días con PTHrP. DMSO, que es el vehículo del inhibidor, se usó en células control. Al finalizar el tratamiento se estimó el número de células viables (que excluyeron el colorante azul de tripano) y se observó que la respuesta de ambas líneas a PTHrP fue completamente abolida en presencia del inhibidor de MAPKs (**Figura 22**). Estos resultados sugieren el rol clave de la vía de señalización de ERK 1/2 MAPKs en la proliferación de las células Caco-2 y de las células HCT116 inducida por PTHrP.

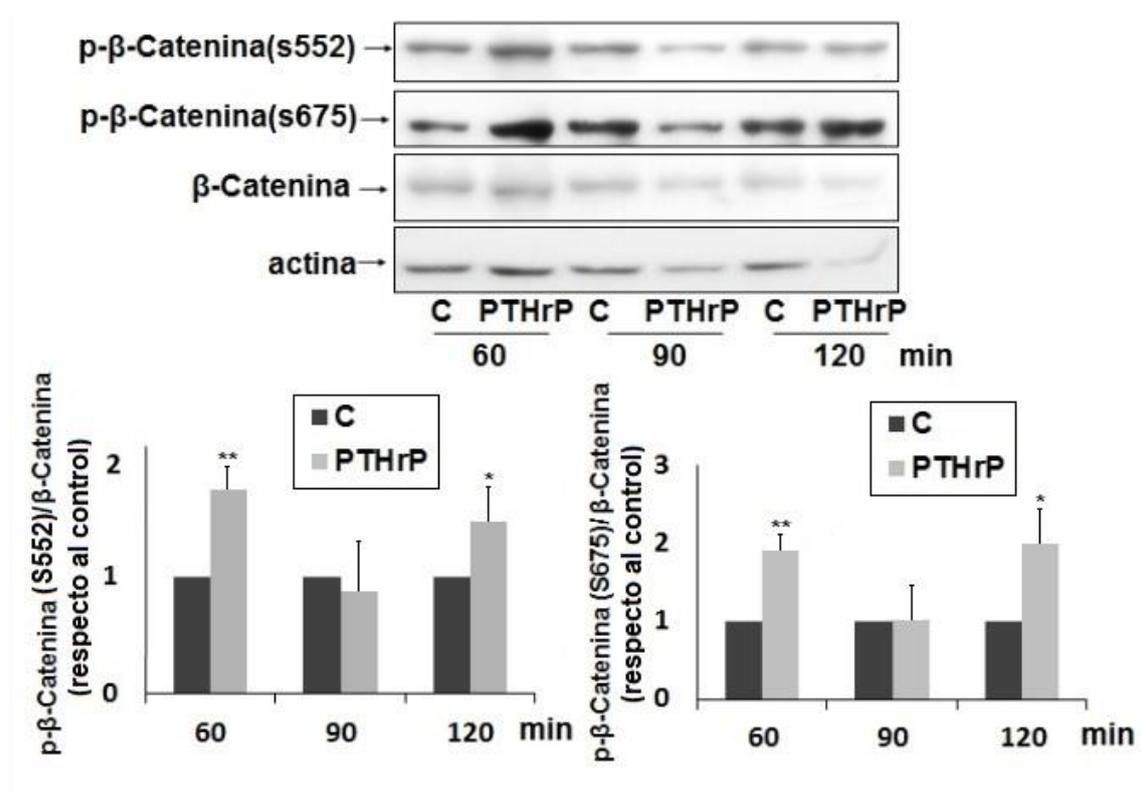


**Figura 22. Participación de la vía ERK en la proliferación inducida por PTHrP de células tumorales intestinales.** Las células Caco-2 (A) y HCT116 (B) se pre-incubaron con el inhibidor PD98059 (20mM), por 30 minutos y luego se trataron con PTHrP por 5 días(A) o 2 días (B). Se realizó el recuento de células viables mediante la tinción azul de tripano empleando una cámara de Neubauer. Se muestra el promedio de los resultados obtenidos a partir de 4 experimentos independientes. \*\*P < 0.01.

## Sección II: Modulación por PTHrP de la vía de señalización de $\beta$ -catenina

### 1. PTHrP promueve la fosforilación de $\beta$ -catenina en residuos de serina 552 y de serina 675.

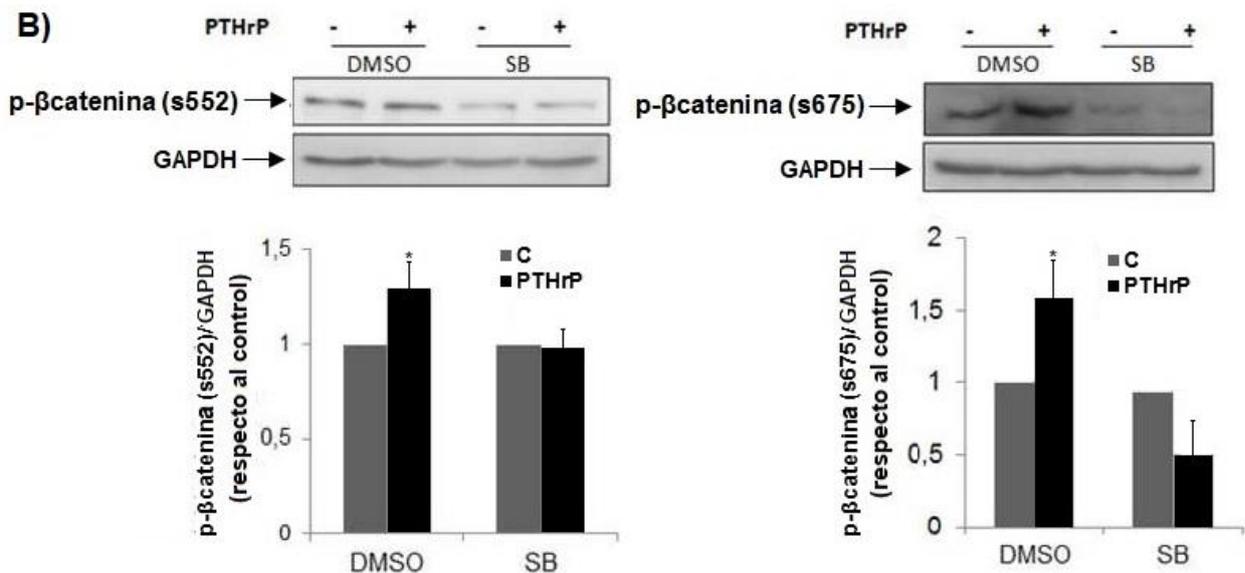
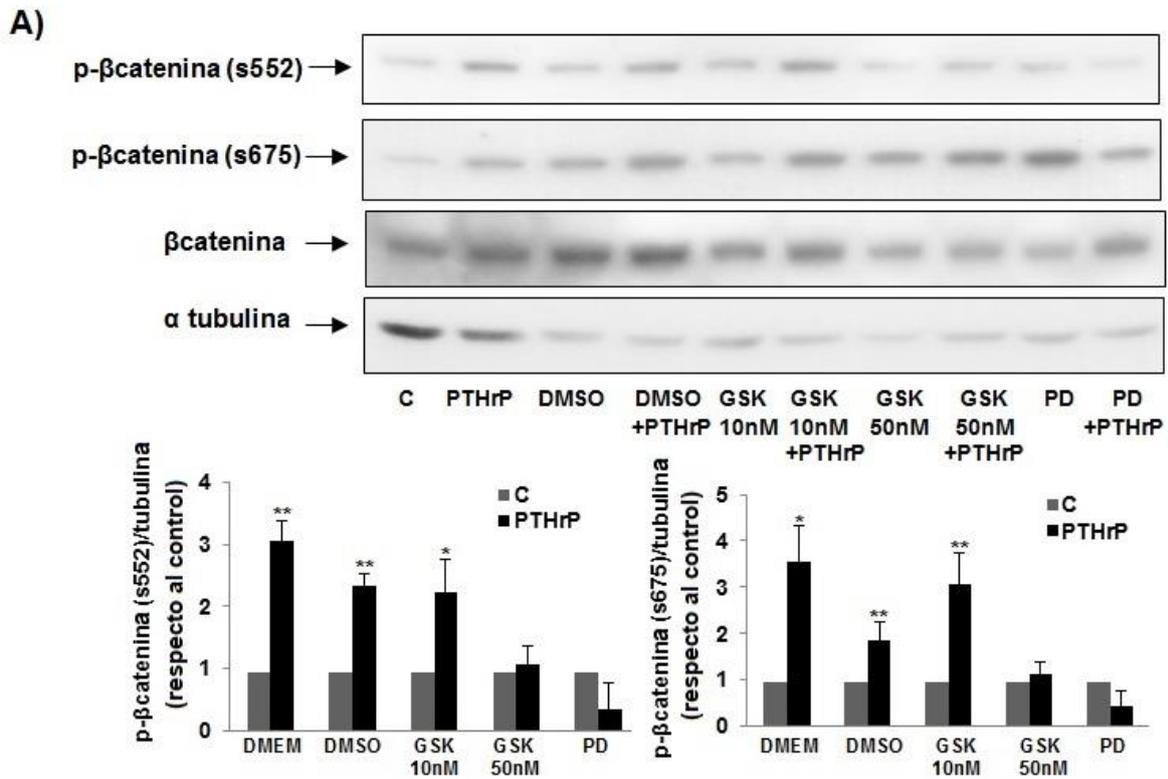
$\beta$ -catenina es el principal componente de la vía de señalización de Wnt que tiene un rol clave en la patogénesis y progresión del CCR (Saif and Chu, 2010).  $\beta$ -catenina puede ser fosforilada en diversos residuos (tales como Serina 552 y Serina 675) que estimulan su entrada al núcleo y su actividad transcripcional independientemente de la vía de señalización activada por Wnt (Verheyen and Gottardi, 2009, Paul et al., 2013); quinasas tales como Akt y las MAPKs fosforilan distintos residuos de  $\beta$ -catenina regulando su función como mediador en la transducción de señales extracelulares (Valenta et al., 2012). Una vez en el núcleo,  $\beta$ -catenina se combina con diferentes factores de transcripción para inducir la expresión de varios marcadores relevantes en el CCR (Saif and Chu, 2010). Con el fin de continuar investigando los mecanismos moleculares que median el efecto proliferativo de PTHrP exógeno en células tumorales intestinales, se investigó si la hormona modula la fosforilación y ubicación nuclear de  $\beta$ -catenina. El análisis por Western blot empleando los anticuerpos que reconocen los residuos fosforilados de serina 552 y de serina 675 de  $\beta$ -catenina revela que el tratamiento de las células Caco-2 con PTHrP por 1 y 2 horas aumenta la fosforilación de estos residuos de  $\beta$ -catenina. No hubo cambios en la expresión proteica de  $\beta$ -catenina a ninguno de los tiempos estudiados (**Figura 23**).



**Figura 23. Fosforilación de  $\beta$ -catenina inducida por PTHrP.** Se trataron las células Caco-2 con PTHrP (1-34)  $10^{-8}$  M durante 60 a 120 minutos. Las proteínas de lisados se procesaron como se describe en Materiales y Métodos, se separaron en SDS-PAGE y se realizaron inmunoblots utilizando los anticuerpos anti-  $\beta$ -catenina, anti-p-  $\beta$ -catenina (S552) y anti-p-  $\beta$ -catenina (S675). Con el fin de evaluar la equivalencia del contenido de proteínas entre las diferentes condiciones experimentales, las membranas fueron re-probadas con el anticuerpo anti-GAPDH. Se muestran inmunoblots representativos y la cuantificación por densitometría de tres experimentos independientes; se indican el promedio  $\pm$  SD. \*  $P < 0,05$ , con respecto al control correspondiente.

## 2. PTHrP fosforila a $\beta$ -catenina en residuos de serina 552 y de serina 675 a través de las vías Akt y MAPKs.

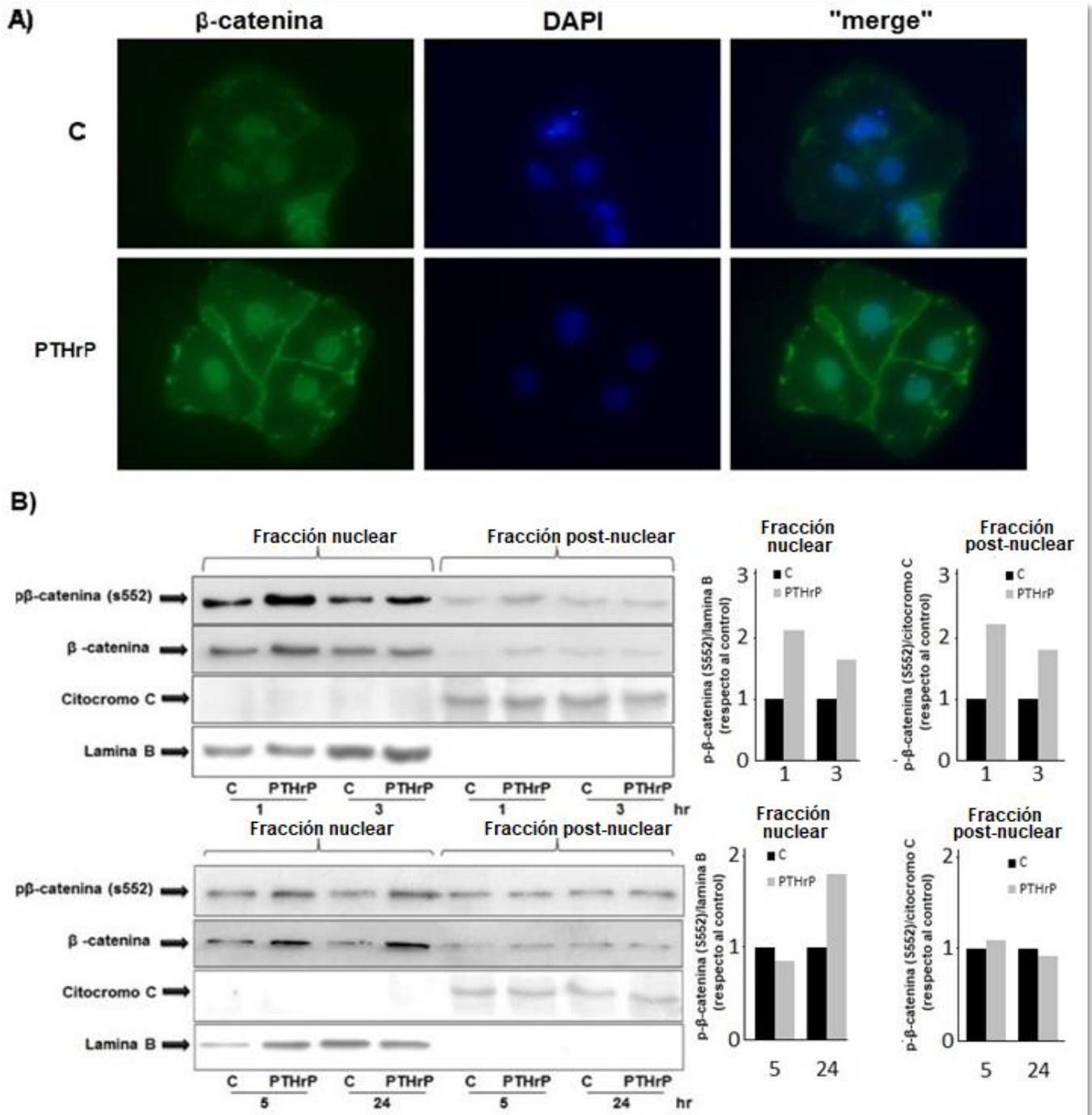
Como PTHrP activa Akt y las MAPKs en las células Caco-2, entonces se investigó la participación de estas vías de señalización en la modulación de la fosforilación de los residuos de serina 552 y de serina 675 de  $\beta$ -catenina inducida por PTHrP. La pre-incubación de las células con PD 98059 (20  $\mu$ M) (un inhibidor de MEK, la quinasa que fosforila ERK 1/2 MAPK), con GSK 690693 (50 nM) (un inhibidor de Akt) o con SB203580 (20  $\mu$ M) (un inhibidor específico de p38MAPK), revierten en gran medida el efecto hormonal en la fosforilación de ambos residuos, sugiriendo que estas quinasas participan en la fosforilación de  $\beta$ -catenina inducida por PTHrP (**Figura 24A y B**). DMSO, que es el vehículo de los inhibidores, se usó en células control.



**Figura 24. (A) Las vías de de Akt, ERK MAPK y (B) p38 MAPK modulan la fosforilación de  $\beta$ -catenina inducida por PTHrP.** Las células Caco-2 se pre-incubaron con (A) los inhibidores GSK690693 (10nM y 50 nM), PD98059 (20mM) o (B) SB203580 (20 uM) por 30 minutos y luego se trataron con PTHrP por 1 hora. Las proteínas de lisados se procesaron como se describe en Materiales y Métodos, se separaron en SDS-PAGE y se realizaron inmunoblots utilizando los anticuerpos anti-  $\beta$ -catenina, anti-p-  $\beta$ -catenina (S552) y anti-p-  $\beta$ -catenina (S675). Se muestra el promedio de los resultados obtenidos a partir de 2 experimentos independientes. \* P < 0.05, \*\*P < 0.01. Los anticuerpos contra GAPDH y  $\alpha$  tubulina se usaron para evaluar la equivalencia del contenido de proteínas.

### 3. PTHrP favorece la ubicación nuclear de $\beta$ -catenina

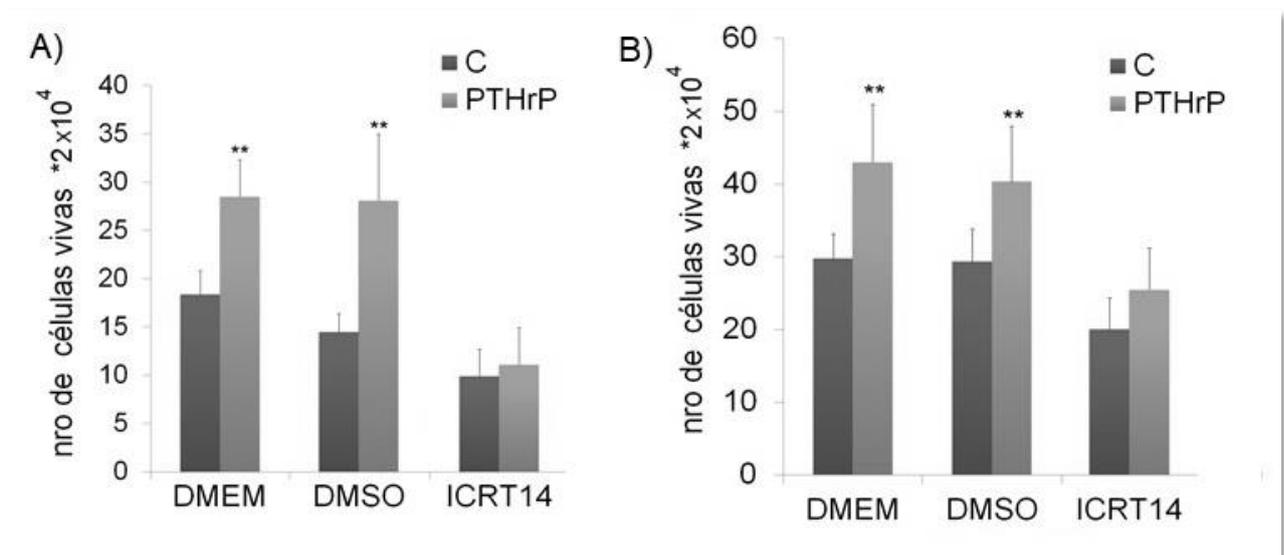
Como la fosforilación de los residuos estudiados puede favorecer la ubicación nuclear de  $\beta$ -catenina, entonces se realizaron estudios de inmunocitoquímica empleando el anticuerpo contra  $\beta$ -catenina seguido de la observación de los preparados mediante microscopía de fluorescencia. La **Figura 25A** sugiere que PTHrP favorece la ubicación nuclear de  $\beta$ -catenina en las células tumorales Caco-2 luego de 24 horas de tratamiento. Para confirmar y profundizar este último resultado, se realizó un fraccionamiento subcelular de células control y células tratadas con PTHrP seguido del análisis por Western blot empleando el anticuerpo que reconoce el residuo fosforilado de serina 552 de  $\beta$ -catenina. La **Figura 25B** muestra que PTHrP induce un aumento en el núcleo y en el citosol, de  $\beta$ -catenina fosforilada. Estos datos sugieren que una vez fosforilada en este residuo serina,  $\beta$ -catenina es estabilizada y no es degradada por el proteosoma en el citoplasma, lo que permite su acumulación citosólica y su translocación al núcleo luego del tratamiento con PTHrP por 1 a 24 horas.



**Figura 25. PTHrP promueve la localización nuclear de  $\beta$ -catenina.** (A) Las células Caco-2 fueron tratadas con PTHrP por 24 horas, luego fijadas y procesadas para inmunocitoquímica como se describe en Materiales y Métodos, empleado un anticuerpo anti- $\beta$ -catenina y DAPI para teñir los núcleos. (B) Las células Caco-2 fueron tratadas con PTHrP por 1 a 24 horas y luego se separaron las fracciones nucleares y citoplasmáticas de acuerdo a lo descrito en la sección Materiales y Métodos. Para confirmar la pureza de las fracciones y la cantidad de proteínas se empleó un anticuerpo que reconoce a la proteína nuclear Lamina B, y a la proteína citosólica citocromo C.

#### 4. PTHrP aumenta la proliferación celular a través del estímulo de la actividad transcripcional en respuesta a $\beta$ -catenina.

Una vez en el núcleo,  $\beta$ -catenina puede unirse a factores de transcripción, tales como LEF-1 y miembros de la familia TCF, promoviendo la expresión de genes tales como c-Myc y ciclina D, los cuales están implicados en la proliferación celular (Saif and Chu, 2010, Valenta et al., 2012). Como observamos la translocación de  $\beta$ -catenina al núcleo celular debida al tratamiento con PTHrP, entonces se decidió evaluar si esta proteína participa en la respuesta proliferativa de células tumorales intestinales a PTHrP. Para ello, se pre-incubaron las células Caco-2 y las células HCT116 con el inhibidor ICRT14 (50  $\mu$ M), el cual bloquea la transcripción génica inducida por  $\beta$ -catenina, y luego se trataron con la hormona por 5 días (células Caco-2, **Figura 26A**) o 24 horas (células HCT116, **Figura 26B**). Se observó mediante el ensayo de exclusión con el colorante azul de tripano que el aumento en el número de células vivas inducido por PTHrP fue abolido al bloquear la actividad transcripcional inducida por  $\beta$ -catenina, sugiriendo que, bajo el efecto hormonal,  $\beta$ -catenina una vez fosforilada y translocada al núcleo induce la actividad transcripcional de genes que favorecen la proliferación de las células tumorales intestinales.

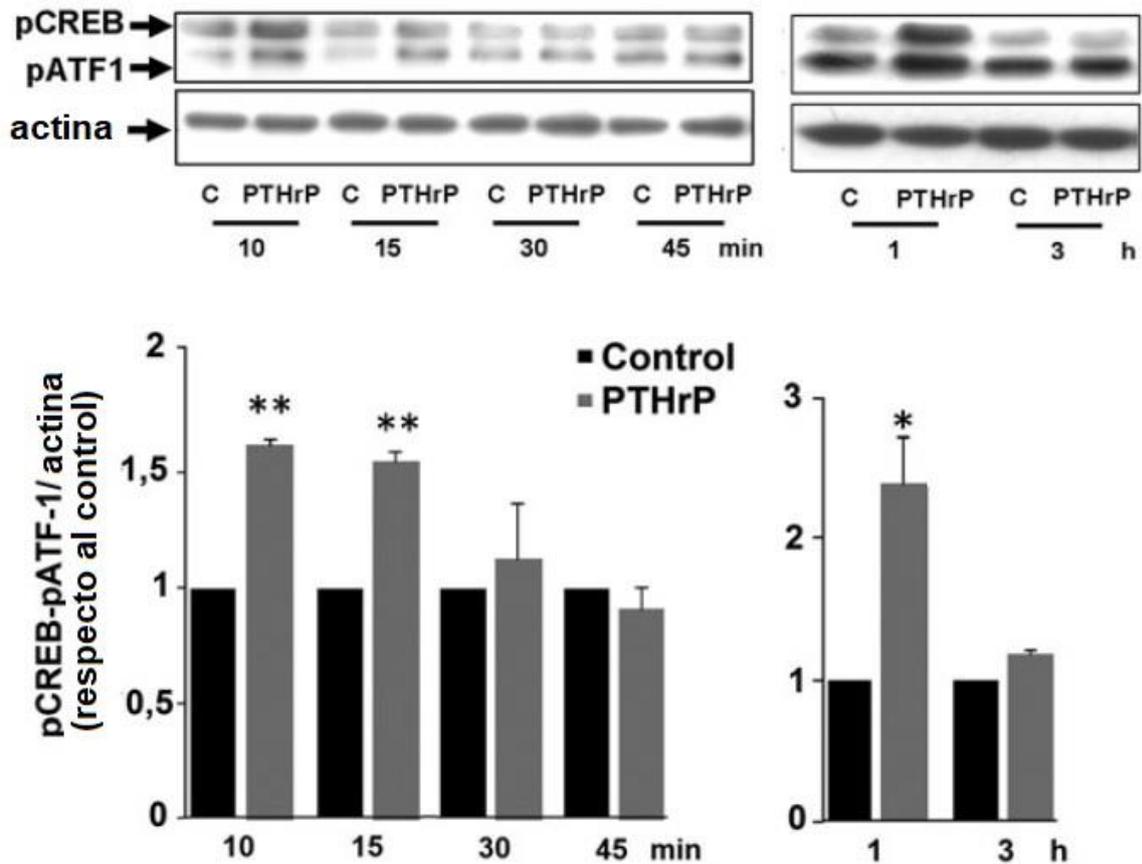


**Figura 26.  $\beta$ -catenina participa en la proliferación celular inducida por PTHrP en células tumorales intestinales.** Las células Caco-2 (A) y HCT116 (B) fueron pre-incubadas con el inhibidor iCRT14 por 30 minutos y luego tratadas por 5 días (A) o 24 horas (B) en presencia o ausencia de PTHrP. Se empleó DMSO, el vehículo del inhibidor como control. Luego las células se tripsinizaron y se contaron mediante el ensayo de exclusión de azul de tripano, como se describe en materiales y métodos. Se muestra el promedio de los resultados obtenidos a partir de tres experimentos independientes.\* P < 0,05, \*\* P < 0,01.

# Sección III: Modulación por PTHrP de eventos moleculares relevantes para la progresión del CCR

## 1. PTHrP induce la fosforilación/activación de los factores de transcripción CREB / ATF-1.

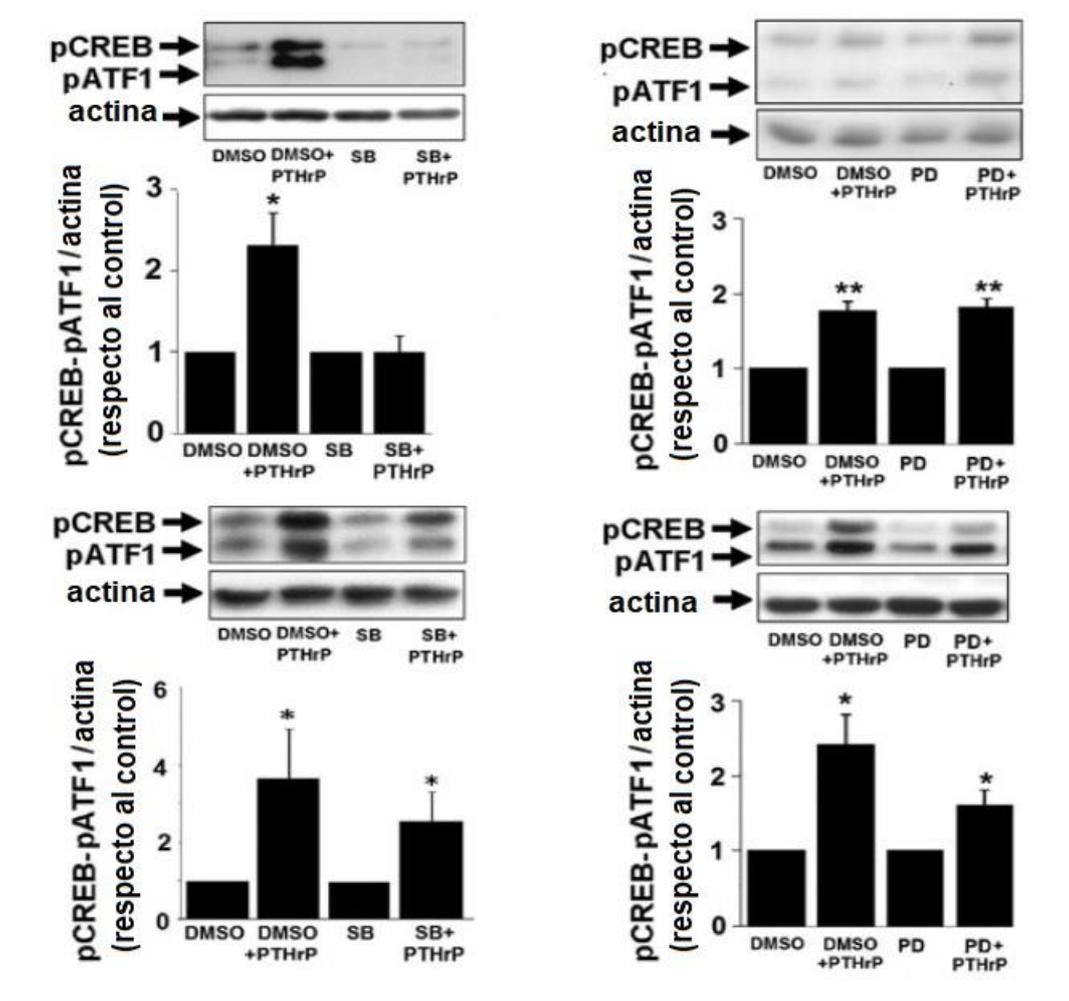
Las MAPK activadas en el núcleo inducen la fosforilación y activación de factores de transcripción, tales como CREB y ATF-1 (Cargnello and Roux, 2011). La familia ATF/CREB tiene un rol importante en la regulación de varias funciones celulares, incluyendo la proliferación celular; en el CCR se ha observado que la proteína que se une a CREB (CBP) hiperactiva la vía de señalización de  $\beta$ -catenina favoreciendo la progresión de esta enfermedad (Bordonaro, 2015). Como se observó que PTHrP aumenta la proliferación de las células intestinales tumorales a través de las vías de señalización de las MAPKs y  $\beta$ -catenina, entonces se decidió investigar si la hormona induce cambios en la fosforilación/activación de estos factores de transcripción. Para tal fin, las células Caco-2 fueron expuestas a PTHrP por distintos tiempos seguido del análisis por Western blot utilizando un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de CREB y de ATF-1. Como se muestra en la **Figura 27** (paneles izquierdo y derecho), la fosforilación de ambos factores de transcripción fue bifásica, con una fase temprana (10-15 minutos) y una segunda fase alcanzando su máximo en 1 hora y retornando a valores basales a las 3 horas de tratamiento con la hormona.



**Figura 27. Efectos de PTHrP en la fosforilación de CREB/ATF-1.** Las células Caco-2 se trataron con PTHrP (1-34)  $10^{-8}$  M por diferentes intervalos de tiempo (10 - 45 min y 1-3 horas) como se muestra en los paneles izquierdo y derecho, respectivamente. El análisis por Western blot de lisados celulares se llevó a cabo utilizando un anticuerpo anti-fosfo CREB/ATF-1. Se utilizó el anticuerpo anti- $\beta$ -actina para garantizar la equivalencia proteica. Se muestra la cuantificación por densitometría de tres experimentos independientes; se indica el promedio  $\pm$  S.D. \*P <0,05; \*\* P <0,01.

**2. Participación de las MAP quinasas en la fosforilación de CREB / ATF-1 dependiente de PTHrP.**

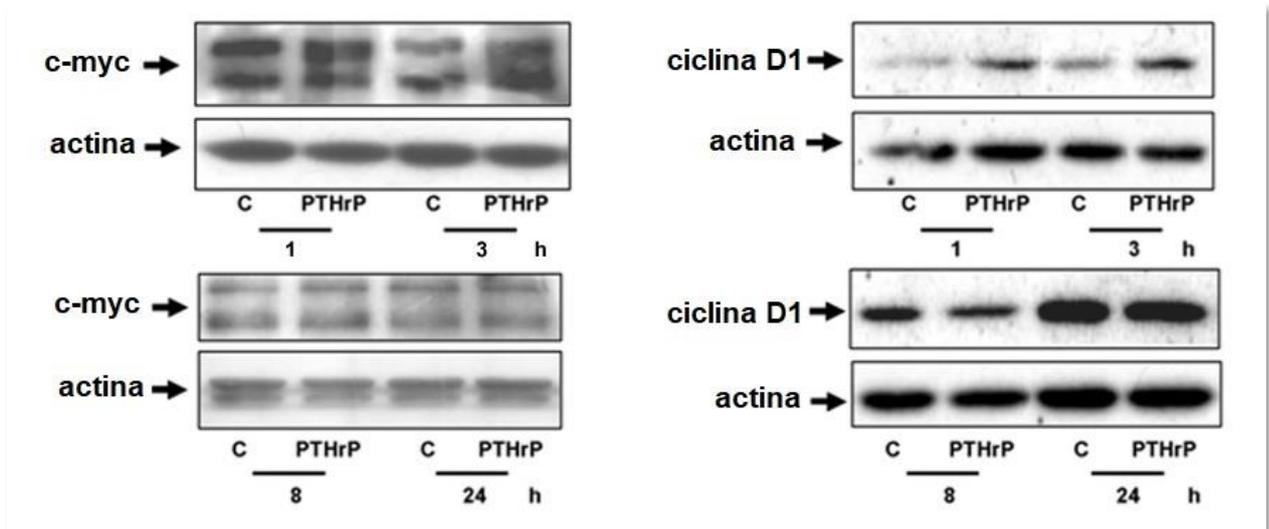
Para investigar la participación de las MAP quinasas en la fosforilación de CREB/ATF-1 dependiente de PTHrP, las células Caco-2 se pre-incubaron en presencia o ausencia de PD98059 (20  $\mu$ M), un inhibidor específico de MEK1/2 (las quinasas activadoras de ERK1/2) o SB203580 (20  $\mu$ M), un inhibidor de las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de p38 MAPK, y luego se trataron durante 15 o 60 minutos con la hormona. El análisis por Western blot utilizando un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de CREB y de ATF-1 revela que el inhibidor de p38 bloquea totalmente la fase temprana de la fosforilación de CREB/ATF-1 inducida por PTHrP (**Figura 28**, panel superior) mientras que ambos inhibidores de las MAPKs suprimieron parcialmente la segunda fase de fosforilación (**Figura 28**, panel inferior), sugiriendo que ERK MAPK y p38MAPK participan en la fosforilación/activación de CREB/ATF-1 inducida por PTHrP.



**Figura 28. Participación de MAP quinases en la fosforilación de CREB / ATF-1 dependiente de PTHrP.** Las células Caco-2 se pre-incubaron con el inhibidor de MAPK p38 SB203580 (20 mM) y luego se trataron con PTHrP (1-34) durante 15 min o 1 h (paneles izquierdos superior e inferior) o se pre-incubaron con el inhibidor específico de ERK PD98059 (20 mM) y luego se trató con la hormona durante 15 min o 1 h (paneles de la derecha superior e inferior). El análisis por Western blot de lisados celulares fue llevado a cabo usando un anticuerpo anti-fosfo CREB / ATF-1. Se empleó el anticuerpo anti- $\beta$ -actina para asegurar la equivalencia proteica. Se utilizó DMSO, el vehículo de los inhibidores, como control. Se muestra la cuantificación por densitometría de tres experimentos independientes; son dados el promedio  $\pm$  S.D. \*P <0,05

### 3. PTHrP aumenta la expresión proteica de c-myc y ciclina D1 en las células Caco-2.

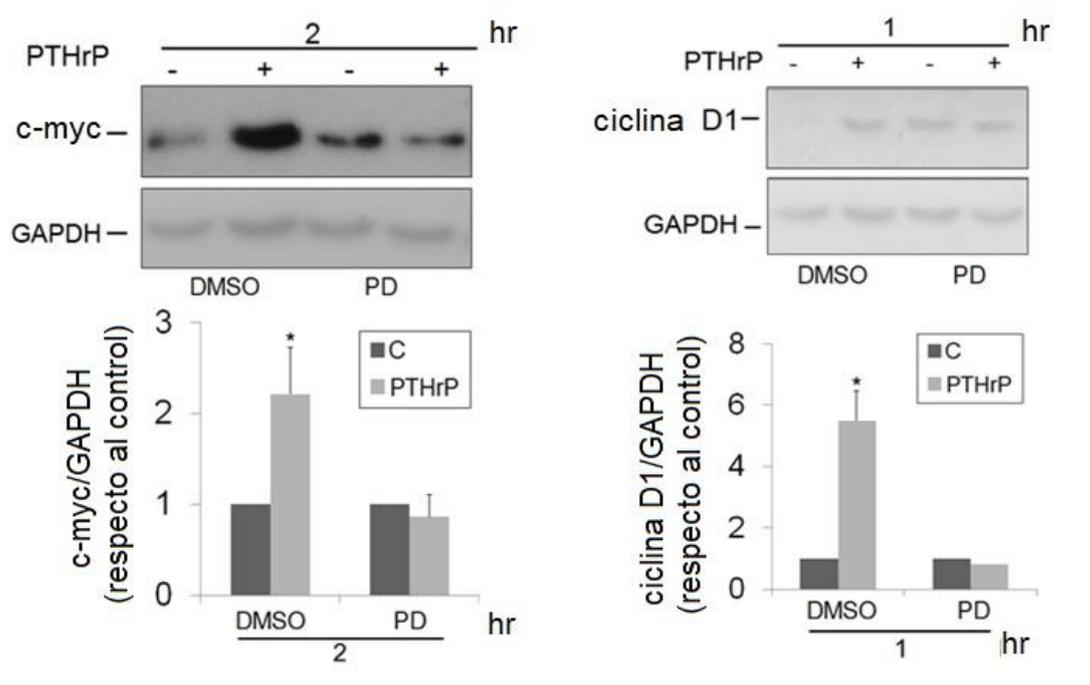
Está bien establecido que en el CCR ciertos genes tales como c-Myc y Ciclina D, que son dos reguladores positivos del ciclo celular asociados con la proliferación de las células tumorales intestinales, presentan activación transcripcional (El Khoury et al., 2016); también es sabido que una vez en el núcleo,  $\beta$ -catenina puede unirse a factores de transcripción, tales como LEF-1 y distintos miembros de la familia TCF, y de esta manera puede promover la expresión de estos genes (Saif and Chu, 2010, Valenta et al., 2012). En base a estos antecedentes y teniendo en cuenta la respuesta proliferativa de las células tumorales intestinales a PTHrP, entonces seguidamente se investigó si la hormona induce cambios en la expresión proteica de c-Myc y Ciclina D en las células Caco-2. Mediante el análisis por la técnica de Western blot y utilizando los anticuerpos anti-c-myc y anti-ciclina D1 se observó que la expresión proteica de ciclina D1 y c-myc aumenta en aquellas células tratadas durante 1 y 3 horas con PTHrP (**Figura 29**, panel superior). No se observaron efectos cuando las células fueron expuestas al péptido durante 8-24 horas (**Figura 29**, panel inferior).



**Figura 29. PTHrP induce la expresión proteica de c-myc y ciclina D1 en células Caco-2.** Las células fueron tratadas por 1 a 24 horas con PTHrP. El análisis por Western blot de lisados celulares fue llevado a cabo usando los anticuerpos anti-c-myc y anti-ciclina D1. Se empleó el anticuerpo anti- $\beta$ -actina para asegurar la equivalencia proteica. Se muestran inmunoblots representativos de dos experimentos independientes.

#### 4. Los cambios de expresión proteica de c-myc y ciclina D1 inducidos por PTHrP dependen de la vía de señalización ERK 1/2 en células tumorales intestinales.

Trabajos previos realizados en el laboratorio donde se desarrolló este Trabajo de Tesis demuestran que PTHrP modula positivamente la progresión del ciclo celular y cambia la expresión de varias proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular a través de la vía de señalización de las MAPKs (Calvo et al., 2014). Basados en estos antecedentes y teniendo en cuenta lo observado en este trabajo revelando la participación clave de las ERK1/2 en la fosforilación y consecuente translocación nuclear de  $\beta$ -catenina, entonces se decidió investigar si el efecto de PTHrP en los cambios de expresión proteica de c-myc y ciclina D1 son dependientes de la vía ERK 1/2. Para tal fin, las células intestinales tumorales se pre-incubaron en presencia o ausencia de PD98059 (20  $\mu$ M) y luego se trataron con la hormona durante 1 ó 2 horas seguido del análisis por Western blot utilizando anticuerpos específicos. Como se muestra en la **Figura 30**, cuando las células Caco-2 se incubaron con el inhibidor, la respuesta de PTHrP se revierte. Tomados en conjunto, estos resultados indican que el efecto de PTHrP sobre la expresión proteica de c-myc y ciclina D1 es dependiente de la vía ERK 1/2 MAPK.



**Figura 30. Los cambios de expresión de c-Myc y ciclina D1 inducida por PTHrP dependen de la vía de señalización ERK 1/2 en células tumorales intestinales.** Se pre-incubaron las células Caco-2 durante 30 minutos con PD98059 (20  $\mu$ M) y luego se trataron en presencia o ausencia de PTHrP (1-34)  $10^{-8}$  M durante 1 hora (panel derecho), o 2 horas (panel izquierdo). El análisis por Western blot de lisados celulares se llevó a cabo usando anticuerpos anti-c-myc (panel izquierdo) y anti-ciclina D1 (panel derecho). Las membranas se re-probaron con el anticuerpo anti-GAPDH para asegurar la equivalencia de la carga de proteína. Se empleó DMSO, el vehículo del inhibidor como condición control. Se muestran inmunoblots representativos y la cuantificación por densitometría de tres experimentos independientes; son dados el promedio  $\pm$  S.D \* P < 0,05, \*\* P < 0,01.

## Sección IV: Efectos de PTHrP *in vivo*

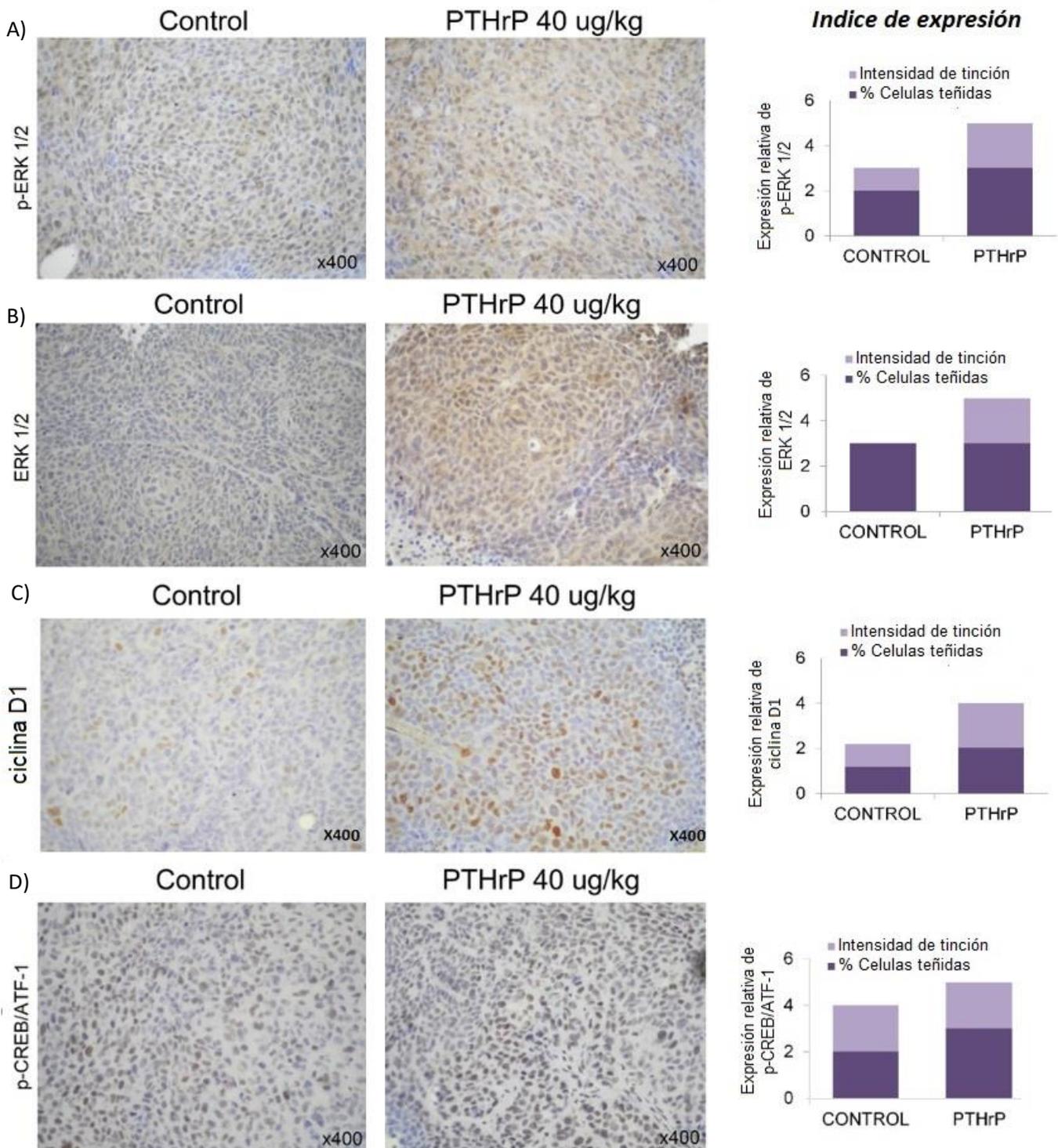
Se sabe que las células HCT116 derivadas de carcinoma de colon humano son ampliamente usadas en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* (Moser et al., 2007, Zhang et al., 2015) y está demostrado que estas células son tumorigénicas en ratones inmunodeficientes (Dunn et al., 2011); inclusive su capacidad tumorigénica es mucho mayor que la de las células Caco-2. Del desarrollo de esta Tesis Doctoral se observó que en las células HCT116, PTHrP activa vías mitogénicas e induce un aumento en la proliferación celular. Por otro lado, trabajos realizados en el laboratorio donde se generó esta Tesis indican que en estas células la hormona favorece además la progresión del ciclo celular modulando la expresión de ciertas proteínas reguladoras del ciclo celular (Calvo et al., 2014) y aumenta la migración celular a través de la vía RSK-ERK1/2 (Calvo et al., 2017). Basado en estas observaciones a continuación se realizaron estudios *in vivo* generando xenoinjertos de las células HCT116 en ratones inmunodeficientes con el fin de validar los efectos de PTHrP observados *in vitro*. Se realizaron dos ensayos pilotos con el fin de optimizar el número de células tumorales a inyectar, así como la dosis y el tiempo de exposición de la hormona. A continuación, se detalla los procedimientos experimentales y los resultados del tercer ensayo.

Se dispusieron de 12 ratones a los cuales en el flanco derecho de cada uno se les inyectaron de manera subcutánea 1 millón de células HCT116 vehiculizadas en 100  $\mu$ l de DMEM sin SFB. Al cabo de 4 días se procedió a distribuir a los ratones de manera aleatoria en 2 grupos, recibiendo el grupo control el vehículo de la hormona (PBS) y el grupo tratado PTHrP (40  $\mu$ g/kg). Esta dosis se eligió según estudios previos realizados en ratones (Stewart et al., 2000). Se aplicó la dosis diariamente dentro del tumor durante 20 días y se monitoreó por 8 días más. El tratamiento diario tuvo como objeto mantener el nivel del compuesto en sangre. El tamaño de los tumores fue medido diariamente (largo/ancho) y dichas medidas permitieron estimar el volumen del tumor en base a la fórmula: volumen ( $\text{mm}^3$ )= ancho ( $\text{mm}^2$ ) x largo (mm)/2 (Wang et al., 2002). Se realizó la eutanasia de los animales usando el agente químico  $\text{CO}_2$ . El método de eutanasia fue elegido de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio, Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. Luego se extrajeron los tumores para ser procesados para análisis inmunohistoquímico. Al final del ensayo no hubo diferencias significativas entre el tamaño de los tumores controles y tratados.

Análisis de marcadores de proliferación celular: En base a los resultados obtenidos *in vitro*, se procedió a evaluar marcadores claves de la proliferación celular.

Se realizó el análisis inmunohistoquímico empleando los anticuerpos contra la forma fosforilada (activa) de ERK 1/2, contra ERK 1/2, contra ciclina D1 y contra la forma fosforilada (activa) de los factores de transcripción CREB/ATF-1 y posteriormente se evaluaron las tinciones basándose en las puntuaciones

combinadas del porcentaje de células tumorales positivamente teñidas junto con la intensidad de tinción. La **Figura 31** revela que la hormona aumenta los niveles proteicos de todos estos reguladores positivos de la proliferación celular en ratones tratados con PTHrP respecto a los niveles observados en tumores de ratones control. Además, como se esperaba, la localización de todos los factores de transcripción evaluados fue nuclear, mientras que la ubicación de ERK 1/2 (tanto activa como total) fue en el citoplasma y el núcleo de las células HCT116.



**Figura 31. Efectos de la administración de PTHrP (40 ug / kg) en xenoinjertos tumorales.** Patrón de tinción representativo de la expresión proteica detectado por inmunohistoquímica (positividad + intensidad) en xenoinjertos de HCT116. Las secciones tumorales se tiñeron con anticuerpos **(A)** anti-fosfo ERK 1/2, **(B)** anti-ERK 1/2, **(C)** anti-ciclina D1 y **(D)** anti-fosfo CREB / ATF1. Las imágenes provienen de un tumor no tratado (izquierda) o tratado con PTHrP (derecha). **(A)** Puntuación de 2 + 1 en tumores control y 3 + 2 en tumores tratados, **(B)** puntaje de 3 + 0 en tumores de control y 3 + 2 en tumores tratados, **(C)** puntuación de 1 + 1 en tumores control y 2 + 2 en tumores tratados, **(D)** puntuación de 2 + 2 en tumores control y 3 + 2 en tumores tratados. Aumento  $\times 400$ .

# CAPÍTULO II:

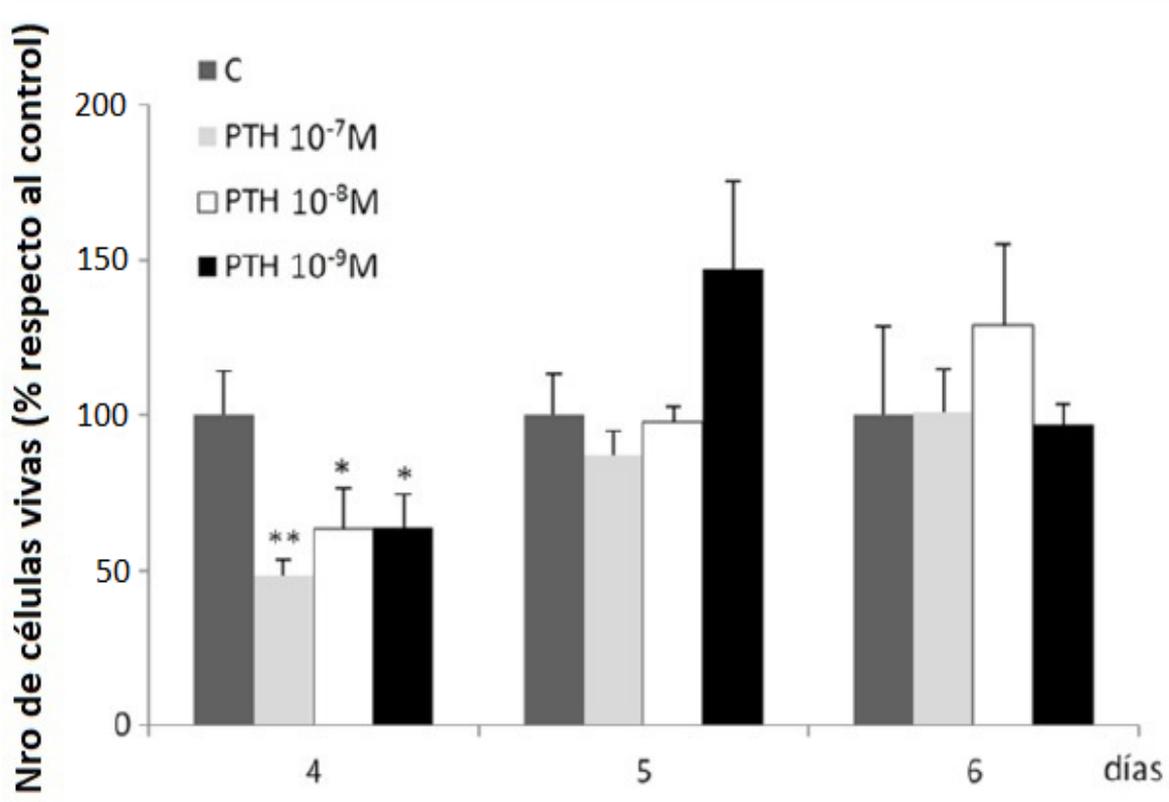
Modulación de la expresión de  
PTHrP por las hormonas  
calcitropicas PTH y calcitriol.

Trabajos realizados en el laboratorio donde se generó esta Tesis indican que PTH desencadena efectos pro-apoptóticos y anti-proliferativos en las células Caco-2 (Calvo et al., 2008, Calvo et al., 2009, Calvo et al., 2010, Calvo et al., 2011, Calvo et al., 2013); en estas células se observó además que el calcitriol presenta un efecto anti-proliferativo a dosis superiores a  $10^{-10}$  M (Cross et al., 1995). En las líneas celulares C4-2 y PC-3 derivadas de cáncer de próstata humano, el calcitriol ejerce este efecto a través de la regulación negativa de la expresión de PTHrP (Shen et al., 2007, Bhatia et al., 2011). En base a estos antecedentes, en este trabajo de Tesis se propuso evaluar si PTH y calcitriol ejercen su acción en las células Caco-2 a través del control de la expresión génica de PTHrP.

## **1. Efectos de PTH en el control de la expresión génica de PTHrP.**

### **1.1. PTH disminuye el número de células Caco-2 vivas.**

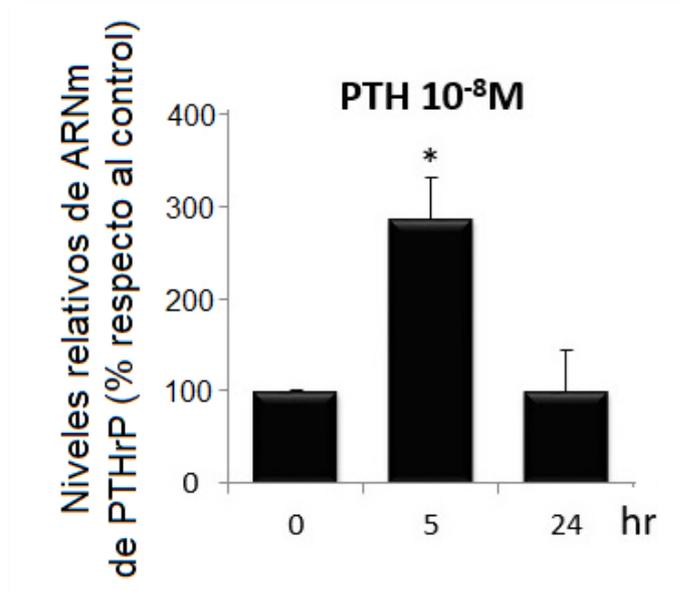
Para validar los resultados previamente obtenidos con las técnicas de MTS y cristal violeta respecto a los efectos de PTH sobre la viabilidad de las células Caco-2 (Calvo et al., 2009), inicialmente se decidió realizar un estudio tiempo y dosis respuesta y estimar el número de células vivas mediante el ensayo de exclusión del colorante azul de tripano. Acorde a lo observado con las técnicas de MTS y cristal violeta, la **Figura 32** muestra que el tratamiento con PTH a dosis de  $10^{-8}$  M durante 4 días en un medio libre de suero disminuye significativamente el número de células vivas (que son aquellas que excluyen el colorante azul de tripano).



**Figura 32. PTH disminuye el número de células Caco-2.** Las células Caco-2 fueron deprivadas de suero fetal bovino por 24 horas y luego tratadas con dosis crecientes de PTH por 4 a 6 días en ausencia de SFB. Se muestran el promedio  $\pm$  el desvío estándar de datos provenientes de tres experimentos independientes. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

### 1.2. PTH modula los niveles de ARNm de PTHrP en células Caco-2 normales

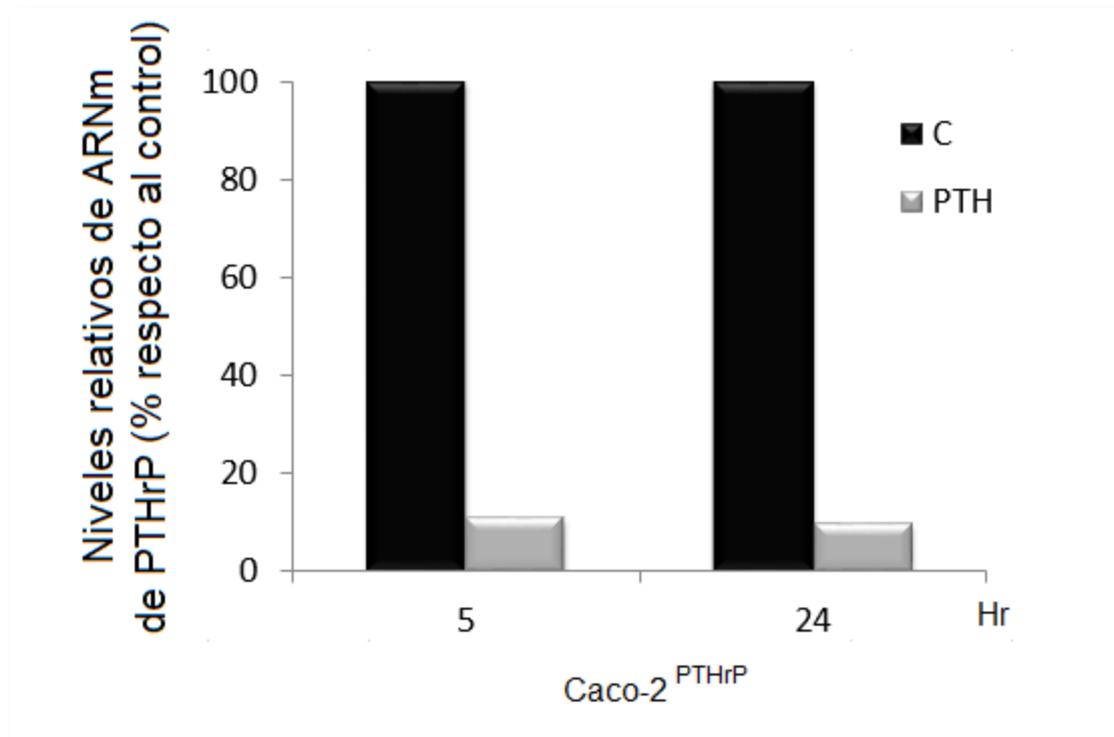
Basado en la comprobada acción anti-proliferativa de PTH, se procedió a investigar si la hormona ejerce este efecto a través del control de la expresión génica de PTHrP. Para tal fin las células Caco-2 fueron tratadas con PTH ( $10^{-8}$  M) durante 5, 24 o 48 horas y luego se analizaron los niveles de ARNm de PTHrP mediante la técnica de qRT-PCR. Como se observa en la **Figura 33** PTH (5 hs) aumenta significativamente la expresión génica de PTHrP, sugiriendo que las células activan mecanismos moleculares de supervivencia y/o de proliferación con el fin de evitar o contra-arrestar los mecanismos moleculares activados tempranamente e involucrados en los efectos pro-apoptóticos y/o anti-proliferativos de PTH. Sin embargo, los niveles del ARNm de PTHrP vuelven al estado basal luego de 24 horas de tratamiento con PTH, sugiriendo que cuando la célula es sometida a exposiciones más prolongadas de PTH, los mecanismos moleculares anti-proliferativos y/o pro-apoptóticos inducidos por PTH prevalecen frente a los mecanismos moleculares de supervivencia y/o de proliferación activados por la célula; de esta manera, uno de los mecanismos que usaría PTH para ejercer su rol sería a través de la regulación negativa de la expresión génica de PTHrP.



**Figura 33. En las células Caco-2, PTH modula los niveles de ARNm de PTHrP.** Se realizó un análisis por RT-PCR cuantitativa, como se describe en materiales y métodos, para medir los niveles de ARNm correspondientes al gen de PTHrP. Los datos representan el promedio de dos experimentos independientes. \*P<0,05.

### 1.3. PTH modula los niveles de ARNm de PTHrP en células Caco-2 que sobre-expresan PTHrP.

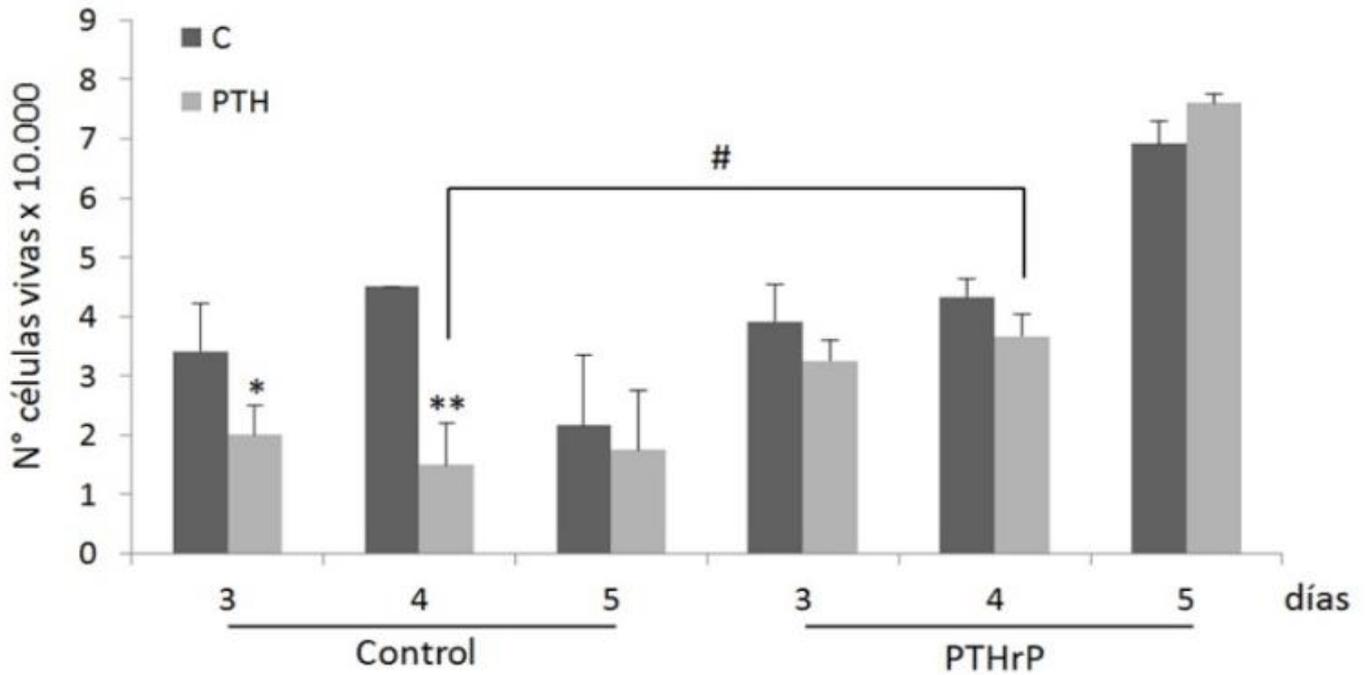
Para confirmar la hipótesis de que PTH ejerce sus acciones a través de la regulación negativa de la expresión del gen de PTHrP, seguidamente se realizaron experimentos utilizando células Caco-2 que sobre-expresan PTHrP y células Caco-2 controles (que fueron transfectadas con el vector vacío). En primera instancia, se corroboró que el tratamiento con PTH modula negativamente los niveles de ARNm de PTHrP en células que sobre-expresan este gen. Según se muestra en la **Figura 34**, y similarmente a lo que ocurre en células normales, PTH en ausencia de suero fetal bovino disminuyó los niveles del ARNm del análogo tumoral de PTH luego de 5 y 24 horas de tratamiento en las células que sobre-expresan PTHrP.



**Figura 34.** En células Caco-2 que sobre-expresan PTHrP, PTH disminuye los niveles de ARNm del péptido. Se realizó un análisis por RT-PCR cuantitativa, como se describe en materiales y métodos, para medir los niveles de ARNm correspondientes al gen que sobre-expresa PTHrP. Los datos representan el promedio de dos experimentos independientes. \*P<0,05.

#### 1.4. El tratamiento con PTH no afecta el número de células Caco-2 vivas que sobre-expresan PTHrP.

Seguidamente ambos grupos, células Caco-2<sup>control</sup> y células Caco-2<sup>PTHrP</sup> fueron expuestos a PTH por 3, 4 o 5 días y luego el número de células vivas fue estimado mediante el ensayo de exclusión del colorante azul de tripano. Acorde a la **Figura 32** en la **Figura 35**, nuevamente se observa que el tratamiento con PTH por 4 días disminuye el número de células Caco-2 vivas del grupo control (sin sobre-expresión de PTHrP y que fueron transfectadas con el vector vacío, barra gris clara); por otro lado, al comparar los grupos que sobre-expresan PTHrP (barra gris oscura, control no tratado y barra gris clara, tratado con PTH por 4 días) se observa que PTH no afecta el número de células Caco-2 vivas; sin embargo la diferencia es significativa en el número de células vivas entre los grupos con tratamiento que no sobre-expresa PTHrP y con tratamiento que sobre-expresa PTHrP (**Figura 35** símbolo #). Este resultado sugiere que a pesar de que PTH controla la expresión génica de PTHrP en células con sobre-expresión del péptido, no logra ejercer su efecto anti-proliferativo.

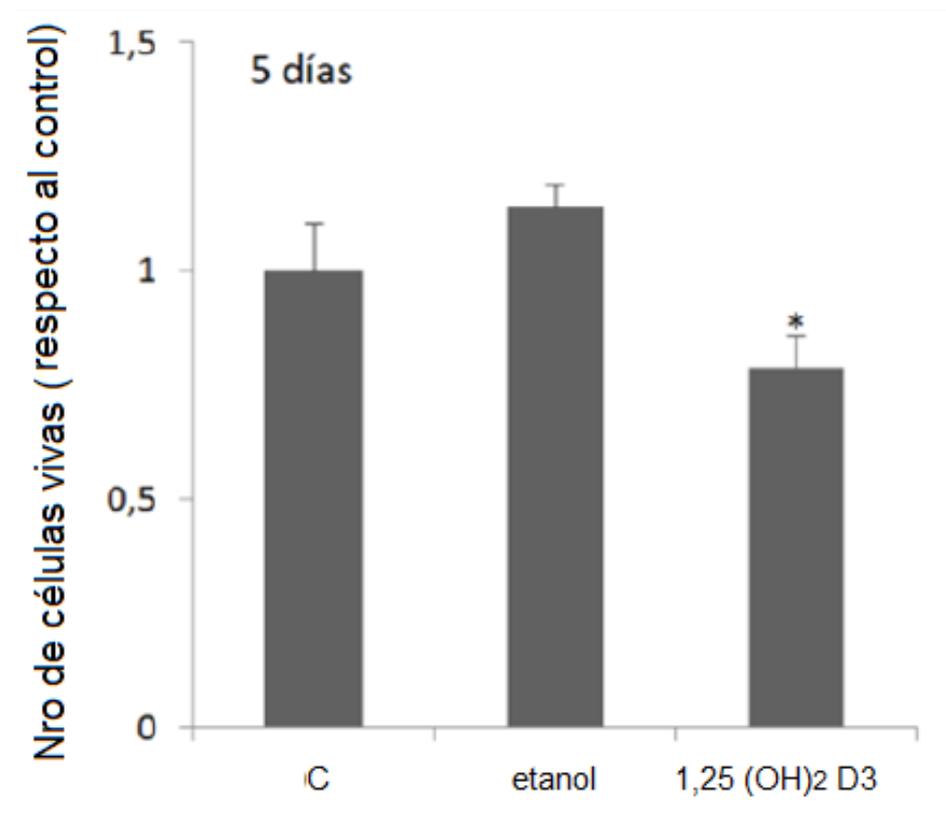


**Figura 35. En células que sobre-expresan PTHrP, PTH controla la expresión de PTHrP pero no afecta el número de células Caco-2 vivas.** Las células Caco-2<sup>control</sup> y Caco-2<sup>PTHrP</sup> fueron deprivadas de suero fetal bovino por 24 horas y luego tratadas con PTH 10<sup>-8</sup> M por 3 a 5 días en ausencia de SFB. Se muestran el promedio ± el desvío estándar de datos provenientes de tres experimentos independientes. \*P<0,05; \*\*P<0,01. # P<0,05.

## 2. Efectos del calcitriol en el control de la expresión génica de PTHrP.

### 2.1. Calcitriol disminuye el número de células Caco-2 vivas.

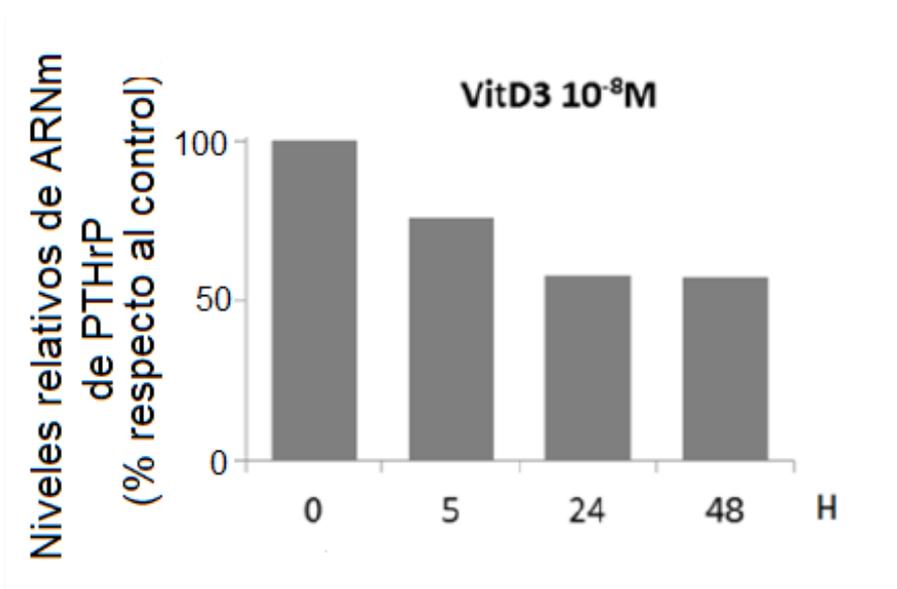
Como en las células Caco-2 previamente se observó el efecto anti-proliferativo del calcitriol (Cross et al. 1995), entonces en primera instancia se decidió validar estas observaciones mediante el ensayo de exclusión del colorante azul de tripano. Acorde a las observaciones de Cross y colaboradores (Cross et al. 1995), la **Figura 36** muestra que la forma activa de la vitamina D ( $10^{-8}$  M) en medio libre de suero disminuye el número de células vivas a los 5 días de tratamiento hormonal. Las células control fueron expuestas a etanol, que es el vehículo de la hormona.



**Figura 36.** El calcitriol disminuye el número de células Caco-2. Las células Caco-2 fueron deprivadas de suero fetal bovino por 24 horas y luego tratadas con calcitriol por 5 días en ausencia de SFB. Se muestran el promedio  $\pm$  el desvío estándar de datos provenientes de tres experimentos independientes. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

## 2.2. El calcitriol modula los niveles de ARNm de PTHrP en células Caco-2 normales.

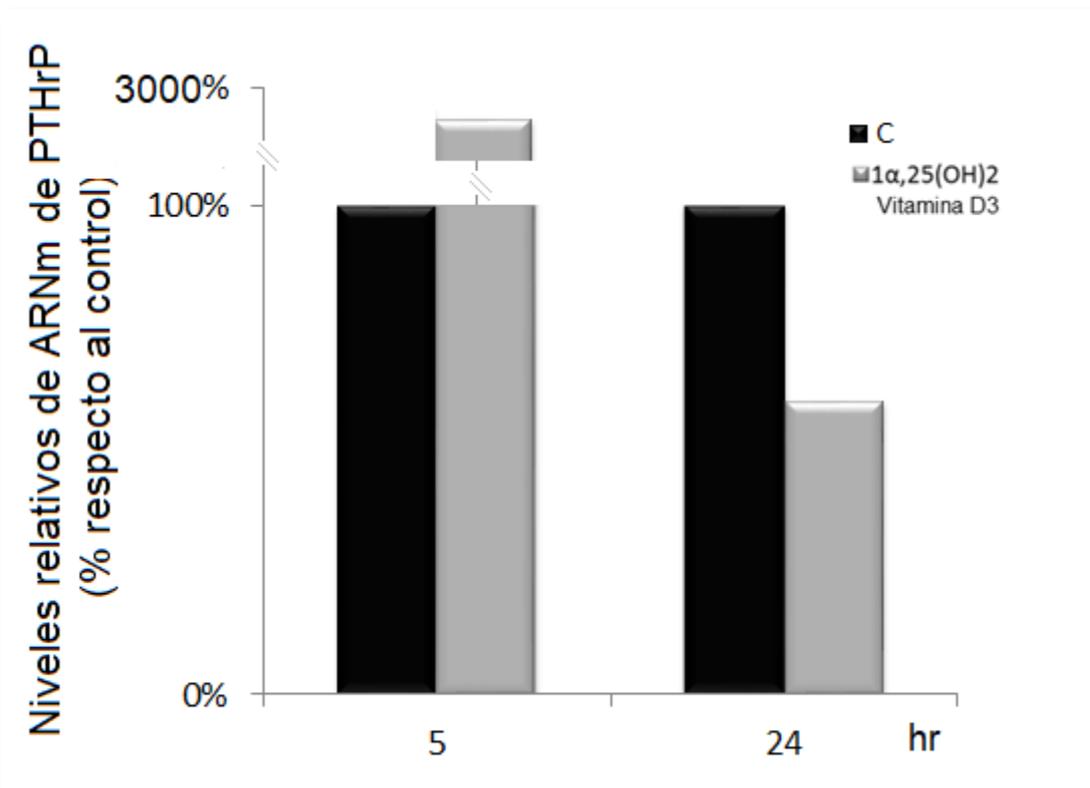
En vista del efecto anti-proliferativo del calcitriol, de la acción proliferativa de PTHrP y de que el calcitriol en otras líneas tumorales ejerce su efecto a través de la regulación negativa de la expresión de PTHrP, entonces seguidamente se procedió a investigar si la hormona ( $10^{-8}$  M) modula los niveles del ARNm de PTHrP en las células Caco-2 mediante la técnica de qRT-PCR. En la **Figura 37** se observa que, al igual que PTH, el calcitriol controlaría la expresión de PTHrP. Se desconoce si a tiempos menores de 5 horas la célula ejerce algún mecanismo inicial de defensa frente a la acción del calcitriol aumentando los niveles del ARNm de PTHrP, tal como sucede con exposiciones tempranas de PTH.



**Figura 37.** El tratamiento con calcitriol modula los niveles de ARNm de PTHrP. Se realizó un análisis por RT-PCR cuantitativa, como se describe en materiales y métodos, para medir los niveles de ARNm correspondientes al gen de PTHrP.

### 2.3. $1,25(\text{OH})_2$ Vit D3 modula los niveles de ARNm de PTHrP en células Caco-2 que sobre-expresan PTHrP.

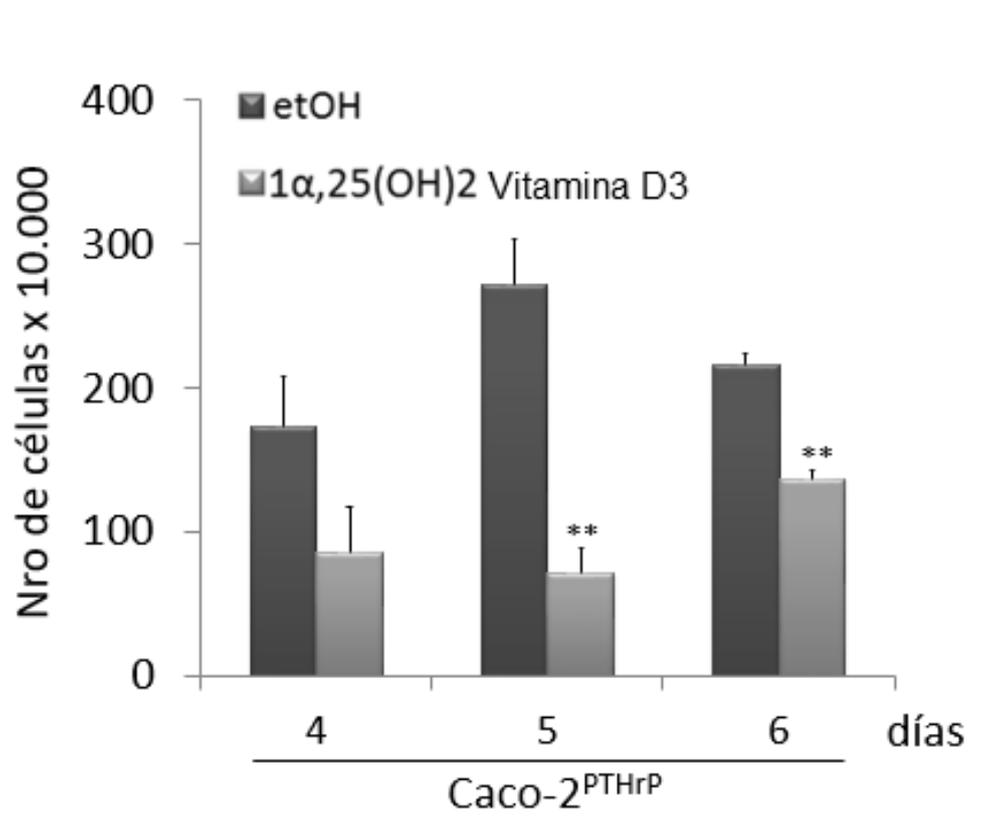
Para corroborar la hipótesis de que el calcitriol ejerce sus acciones anti-proliferativas a través de la regulación negativa de la expresión génica de PTHrP, seguidamente se realizaron experimentos utilizando células Caco-2 que sobre-expresan PTHrP. En primera instancia, se evaluó si el tratamiento con calcitriol modula negativamente los niveles de ARNm de PTHrP en células que sobre-expresan este gen. En contraste a lo que ocurre en células no transfectadas (normales), el tratamiento con calcitriol en ausencia de suero fetal bovino incrementó marcadamente los niveles del ARNm del análogo tumoral de PTH luego de 5 horas de tratamiento, pero a 24 horas de exposición con el calcitriol estos niveles se observan por debajo de los valores basales (**Figura 38**).



**Figura 38.** El tratamiento con calcitriol modula los niveles de ARNm de PTHrP en células caco-2 que sobre-expresan PTHrP. Se realizó un análisis por RT-PCR cuantitativa, como se describe en materiales y métodos, para medir los niveles de ARNm correspondientes al gen de PTHrP.

#### 2.4. El tratamiento con calcitriol disminuye el número de células Caco-2 vivas que sobre-expresan PTHrP.

Por último, las células Caco-2<sup>PTHrP</sup> (que sobre-expresan PTHrP) fueron tratadas con calcitriol por 4, 5 o 6 días y luego el número de células vivas fue estimado mediante el ensayo de exclusión del colorante azul de tripano. Acorde a la **Figura 36** en la **Figura 39**, se observa que el tratamiento con calcitriol por 5 días también disminuye el número de células Caco-2 que sobre-expresan PTHrP. Este resultado sugiere que el calcitriol controla la expresión génica de PTHrP en células con sobre-expresión del péptido y ejercería su efecto anti-proliferativo a través de la modulación de los niveles endógenos de PTHrP.



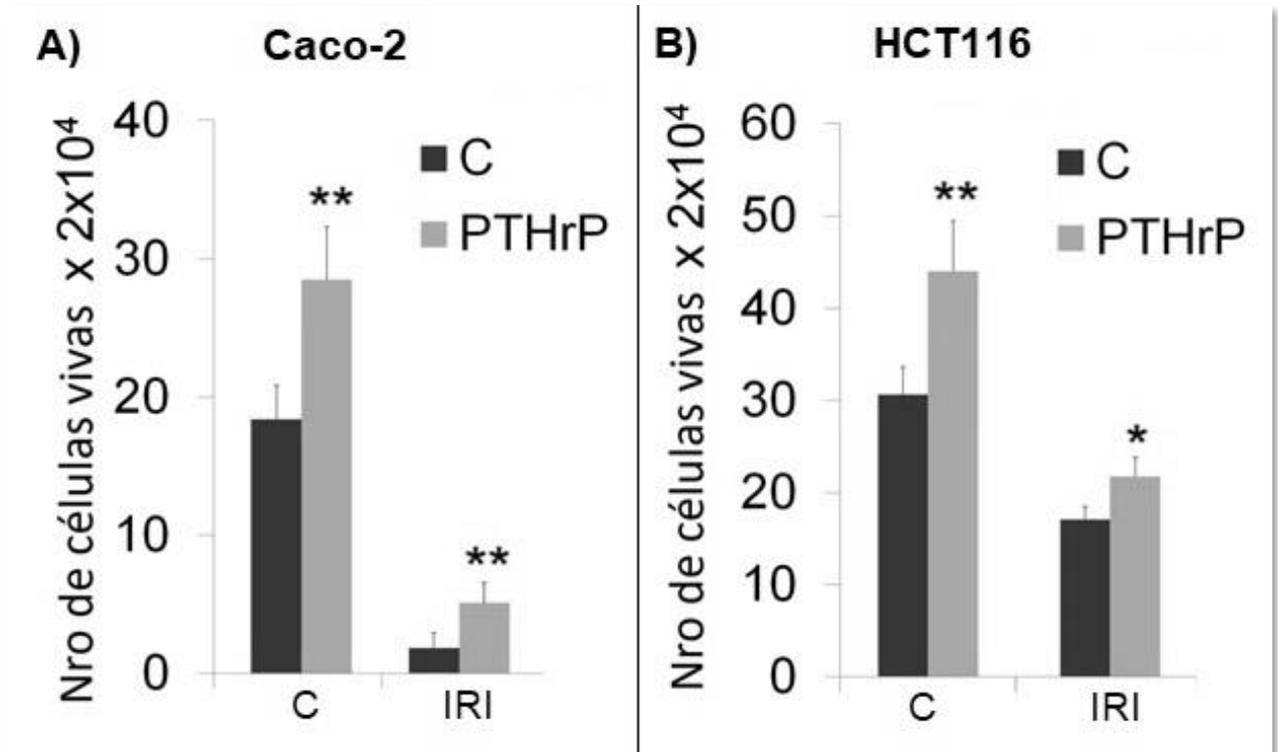
**Figura 39.** El calcitriol disminuye el número de células Caco-2 que sobre-expresan PTHrP. Las células fueron deprivadas de suero fetal bovino por 24 horas y luego tratadas con calcitriol por 4 a 6 días en ausencia de SFB. Se muestran el promedio  $\pm$  el desvío estándar de datos provenientes de tres experimentos independientes. \*\*P<0,01.

# CAPÍTULO III:

## Rol de PTHrP en la quimiorresistencia de células de CCR

## 1. PTHrP exógeno disminuye la sensibilidad de células tumorales intestinales al agente quimioterapéutico Irinotecan

Aunque el CCR puede tratarse con éxito en etapas tempranas, los pacientes frecuentemente se encuentran en estadios muy avanzados de la enfermedad en el momento de la aparición de los síntomas y el diagnóstico de la enfermedad, lo que conduce a una alta tasa de mortalidad (Li et al., 2014). Irinotecán (CPT-11) se usa de forma rutinaria en el tratamiento del CCR metastásico, ya sea como agente único, o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos (Li et al., 2014, Mocellin et al., 2017); no obstante, la resistencia a fármacos quimioterapéuticos como CPT-11 es una causa frecuente de fracaso del tratamiento (Li et al., 2014, Erdem et al., 2017). Se ha observado una correlación entre quimiorresistencia de células de CCR y alteración en la expresión de varios marcadores. PTHrP puede mediar la quimiorresistencia a diversos agentes terapéuticos en células de cáncer de próstata y de osteosarcoma (Gagiannis et al., 2009, Cui et al., 2016); sin embargo al momento de iniciar este Trabajo de Tesis se desconocía si PTHrP confiere quimiorresistencia a células de CCR. Como la hormona favorece la proliferación, la progresión del ciclo celular, la supervivencia y la migración de las células tumorales intestinales, que son todos eventos que contribuyen al fenotipo agresivo de estas células, y teniendo en cuenta el comprobado efecto citotóxico de CPT-11 en células tumorales intestinales (Maitra et al., 2014, Erdem et al., 2017), entonces el siguiente objetivo de este Trabajo de Tesis fue estudiar si el péptido puede contrarrestar esa citotoxicidad inducida por la droga en las células Caco-2 y HCT116. Para tal fin ambas líneas celulares fueron tratadas con PTHrP seguido de la exposición a Irinotecán (10  $\mu$ M), siendo esta dosis seleccionada acorde con estudios previos que reportan los efectos de esta droga en estas líneas celulares (Maitra et al., 2014, Erdem et al., 2017). La exposición a la hormona y la droga fue de 5 días para las células Caco-2 y de 24 horas para las células HCT116, y estos días fueron seleccionados según la respuesta proliferativa de ambos tipos celulares a PTHrP (ver **Figuras 11A y 17 Capítulo I, sección I**). Los resultados obtenidos a partir del recuento de células vivas en cámara de Neubauer por medio de la exclusión de colorante azul de tripano, revelan que el Irinotecán drásticamente disminuye el número de células vivas Caco-2 (**Figura 40A, barra gris oscura respecto a barra gris oscura control**) y de células vivas HCT116 (**Figura 40B barra gris oscura respecto a barra gris oscura control**); sin embargo PTHrP revirtió parcialmente la respuesta anti-proliferativa ejercida por el agente citostático en ambos tipos celulares (**Figura 40A y Figura 40B, barra gris clara respecto a barra gris clara control**) sugiriendo que PTHrP favorece la quimiorresistencia de células tumorales intestinales a CPT-11.

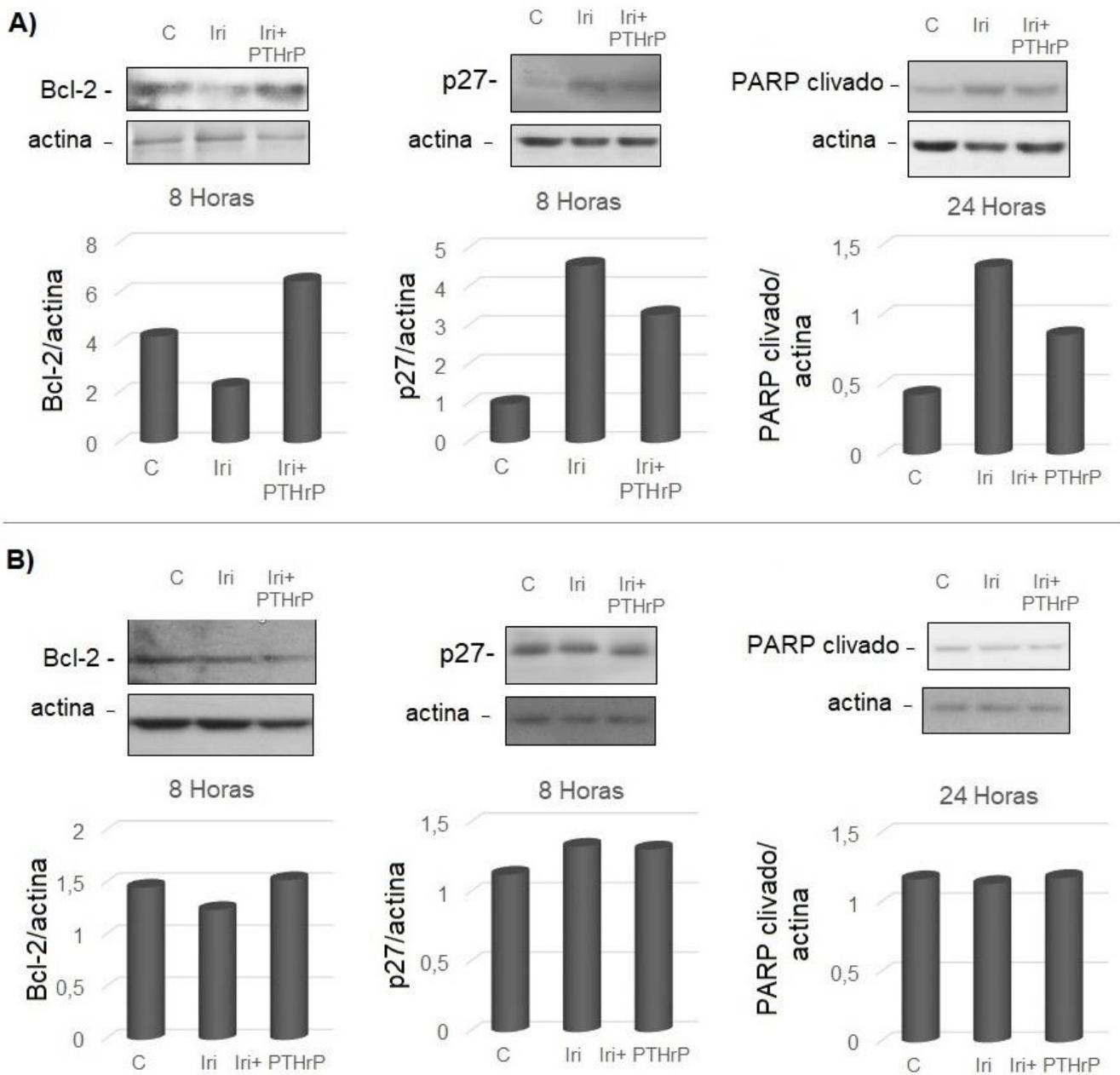


**Figura 40. PTHrP disminuye la respuesta de células tumorales intestinales a CPT-11.** Las células Caco-2 (A) y HCT116 (B) se trataron con PTHrP y CPT-11 (10uM) por 5 días (A) o 1 día (B). Se realizó el recuento del número de células viables mediante la tinción azul de tripano empleando una cámara de Neubauer. Se muestra el promedio de los resultados obtenidos a partir de tres experimentos independientes. \*P <0.05, \*\*P <0.01.

## 2. Los efectos de CPT-11 sobre los niveles de factores pro-apoptóticos y anti-proliferativos necesarios para la respuesta citotóxica en células tumorales intestinales son contrarrestados por PTHrP.

El aumento en la expresión de ciertos reguladores negativos del ciclo celular tales como p21, p27 y p53 así como la disminución en la expresión de moléculas con actividad anti-apoptótica tales como Bcl-2 pueden predecir una evolución favorable en pacientes con CCR tratados con CPT-11 (Charara et al., 2004). Además, la activación del efector apoptótico caspasa-3 y consecuentemente el clivaje de su sustrato, la poli-ADP ribosa polimerasa (PARP), son eventos esperados una vez que las células tumorales de CCR responden al Irinotecan (Yang et al., 2016). Teniendo en cuenta que PTHrP favorece la supervivencia frente a una situación de apoptosis inducida por estrés oxidativo (Lezcano et al., 2013) y además modula negativamente varios inhibidores del ciclo celular (Calvo et al., 2014), entonces se decidió evaluar la expresión de algunos marcadores moleculares relevantes y asociados a estas respuestas celulares tanto en las células Caco-2 como HCT116 tratadas con Irinotecán solo o en combinación con

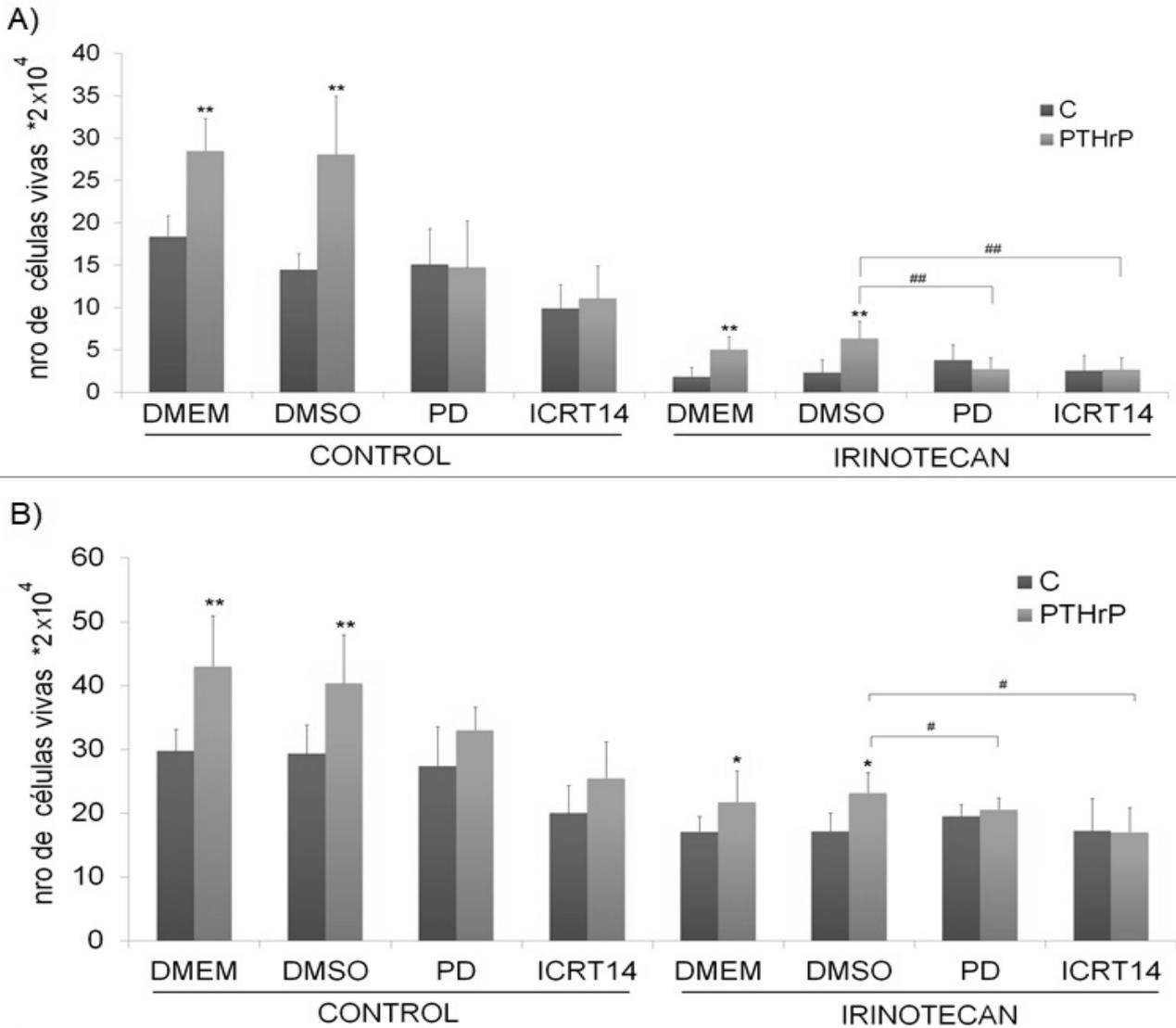
PTHrP. Para tal fin inicialmente se expusieron las células a la droga o a la droga más la hormona por 8, 24 y 48 hs, seleccionando estos tiempos de acuerdo a los estudios previos realizados en el laboratorio donde se desarrolló este Trabajo de Tesis (Lezcano et al., 2013, Calvo et al., 2014). A continuación, se muestran los tiempos de exposición donde se evidenciaron los cambios más significativos en la expresión proteica de los marcadores evaluados. El análisis de las proteínas de los lisados de células HCT116 mediante la técnica de Western blot empleando los anticuerpos anti-PARP clivado, anti Bcl-2 y anti p27, reveló que tanto el aumento de los niveles proteicos del inhibidor p27 y de la forma clivada de PARP como la disminución de los niveles proteicos de Bcl-2 inducida por el tratamiento con Irinotecán fueron revertidas por la exposición de las células a PTHrP más Irinotecán (**Figura 41A**), sugiriendo que PTHrP disminuye la sensibilidad a CPT-11 en las células HCT 116 a través de la modulación de la expresión proteica de al menos Bcl-2 y p27 y a través de la modulación de la actividad de al menos caspasa-3. Sin embargo, empleando la misma técnica y los mismos anticuerpos no se evidenció ningún cambio en los niveles de expresión de estas proteínas en la línea celular Caco-2 debida al tratamiento con Irinotecán ni con PTHrP más Irinotecán (**Figura 41B**), sugiriendo que la droga afecta la viabilidad de esta línea celular mediante otros mecanismos distintos a los observados en la línea intestinal HCT116.



**Figura 41. PTHrP revierte los cambios en los niveles de expresión de PARP clivado, Bcl-2 y p27 debidos al tratamiento con Irinotecán en la línea celular HCT116 pero no en las células Caco-2.** Se cultivaron las células HCT116 (A) y Caco-2 (B) y se incubaron en ausencia o presencia de PTHrP (1-34)  $10^{-8}$  M durante 8 a 48 horas. El análisis por la técnica de Western blot de lisados celulares se llevó a cabo utilizando anticuerpos anti-Bcl-2, anti-p27 y anti-PARP. Las membranas se re-incubaron con anticuerpo anti-actina para asegurar la equivalencia de la carga de proteína.

### 3. Las vías de señalización de ERK y de $\beta$ -catenina participan en la quimiorresistencia a CPT-11 inducida por PTHrP.

Trabajos previos han demostrado que la vía de p38 MAPK está implicada en la sensibilidad al Irinotecán y sugieren que el nivel de expresión de p38 fosforilado podría ser utilizado como marcador de resistencia clínica al Irinotecán; de esta manera la vía de señalización de p38 MAPK podría ser un blanco terapéutico y por lo tanto una estrategia potencial para superar la resistencia a las quimioterapias basadas en Irinotecán en el CCR (Paillas et al., 2011). Además, se ha observado que la activación de ERK en la línea celular HCT116 puede generar resistencia a otros agentes antitumorales como el Erlotinib, el cual inhibe la actividad quinasa del receptor para el factor de crecimiento epidermal (Chen et al., 2007). Dado que PTHrP en el sistema experimental empleado para el desarrollo de este trabajo de Tesis activa varias vías de señalización que convergen en la activación de ERK MAPK y en la activación de  $\beta$ -catenina que conlleva a la inducción de la actividad transcripcional en respuesta a  $\beta$ -catenina, entonces se evaluó si el uso de los inhibidores específicos de estas vías de señalización (PD98059 20 mM e ICRT14 50  $\mu$ M, respectivamente) restablecen la sensibilidad de las células tumorales intestinales al Irinotecán, aun en presencia de PTHrP. El conteo de células vivas empleando la técnica de exclusión del colorante azul de tripano revela que el bloqueo de las vías de señalización de ERK y  $\beta$ -catenina restableció la inhibición del crecimiento celular debida al tratamiento con el quimioterapéutico en las células Caco-2 y en las células HCT116 (**Figura 42A y B** barras gris claro señaladas con el símbolo #). En conjunto, estos resultados sugieren que PTHrP atenúa la citotoxicidad del Irinotecán a través de las vías ERK y  $\beta$ -Catenina tanto en las células Caco-2 como en las células HCT116.



**Figura 42. PTHrP atenúa la citotoxicidad del Irinotecán a través de las vías ERK y  $\beta$ -Catenina.** Las células Caco-2 (A) y HCT116 (B) fueron pre-incubadas con los inhibidores PD98059 (20mM) o iCRT14 (50 uM), por 30 minutos y luego se trataron con PTHrP e Irinotecan por 5 días (A) o 1 día (B). Se realizó el recuento del número de células viables mediante la tinción azul de tripano empleando una cámara de Newbauer. Se empleó DMSO como vehículo de ambos inhibidores. Se muestra el promedio de los resultados obtenidos a partir de 2 experimentos independientes. \*P <0.05, \*\*P <0.01, # P <0.05, ## P <0.01.

# 6. DISCUSIÓN

En trabajos previos, se ha demostrado que la hormona paratiroidea (PTH) induce la apoptosis y el arresto en fase G0/G1 de las células Caco-2 derivadas de adenocarcinoma de colon humano (Calvo et al., 2008; Calvo et al., 2009; Calvo et al., 2010, Calvo et al., 2011). Sin embargo y a diferencia de PTH, su análogo tumoral (PTHrP) en esta línea celular ejerce efectos protectores en condiciones apoptóticas (Lezcano et al., 2013). En esta Tesis Doctoral se demuestra, por primera vez, que el análogo tumoral de PTH aumenta el número de células Caco-2 y HCT116 vivas. PTH y PTHrP comparten el receptor de PTH tipo 1 (RPTH1), que es un receptor clase b acoplado a proteína G (Esbrit and Alcaraz, 2013). El hecho de que PTH y PTHrP ejercen efectos opuestos en las células tumorales intestinales, aunque interactúan con el mismo receptor, podría deberse a que las respuestas específicas provocadas por ligandos diferentes son dependientes del tipo de proteínas G que se activan y también, de otros factores citosólicos que son capaces de unirse y regular la actividad del RPTH1.

Se sabe que la gran mayoría de las acciones de PTHrP son de naturaleza parácrina (Maioli and Fortino, 2004, McCauley and Martin, 2012), por esta razón los modelos experimentales empleados en este Trabajo de Tesis se trataron con el fragmento sintético 1-34 N-terminal de PTHrP, ya que esta región de la hormona contiene una secuencia señal que dirige a PTHrP a la vía de secreción, donde se ejerce un efecto parácrino. Existen varios reportes que muestran que el fragmento de PTHrP amino-terminal añadido exógenamente induce la proliferación de células normales tales como las células  $\beta$  humanas (Guthalu Kondegowda et al., 2010), células transformadas de próstata (Asadi et al., 2001, Tovar Sepulveda and Falzon, 2002) y líneas de células tumorales adenocorticales (Rizk-Rabin et al., 2008). Sin embargo, el tratamiento con el péptido disminuye la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de mama y pulmón humano (Luparello et al., 1997, Hastings et al., 2001). Por lo tanto, los efectos relacionados con el crecimiento celular debido a la acción del fragmento de PTHrP amino-terminal son complejos, y pueden ser tanto estimuladores como inhibidores. Estas acciones opuestas del péptido apoyan aún más las observaciones descriptas por muchos investigadores que postulan que la hormona ejerce efectos discordantes dependiendo del tipo celular y/o condiciones experimentales (Maioli and Fortino, 2004).

En vista del resultado inicial respecto a que PTHrP aumenta el número de células Caco-2 y HCT116 vivas, entonces el próximo objetivo de este Trabajo fue estudiar cuáles vías de señalización relacionadas con eventos proliferativos estaban moduladas por PTHrP exógeno en las células Caco-2 y HCT116. Se observó que PTHrP estimula la fosforilación/activación de ERK en ambas líneas celulares, sin afectar a su expresión proteica. Sin embargo, cuando se analizó si PTHrP modula la fosforilación de p38 MAPK, se observó que PTHrP induce un aumento en la activación de p38 MAPK en la línea celular Caco-2 mientras que no se observó efecto hormonal en la activación de esta quinasa, al menos en los tiempos estudiados, en las células HCT116. Las señales transmitidas a través de la proteína quinasa C (PKC) o Ras activan la señalización de la vía ERK, que luego activan Raf1, iniciando una cascada que activa a MEK y luego a ERK (Cargnello and Roux, 2011). La cascada Ras / Raf / MEK / ERK está implicada en respuestas a factores de crecimiento, supervivencia celular e invasión en el cáncer. Durante el proceso de transformación oncogénica, las células derivadas de CCR escapan del control normal de crecimiento y diferenciación y adquieren la capacidad de invadir tejidos y órganos circundantes. Las mutaciones de Ras o BRAf, una serina-treonina quinasa de la familia Raf y la regulación positiva del receptor de EGF son los principales mecanismos que activan la señalización de ERK / MAPK en el CCR (Saif and Chu, 2010). Sin embargo, en este tipo de cáncer, la regulación de la proliferación celular también se ve afectada por señales externas tales como varios factores de crecimiento que desencadenan cascadas de transducción de señales a través de la unión a receptores de membrana (Fang and Richardson, 2005). En este sentido, nuestros resultados sugieren que PTHrP es un factor externo que promueve la activación de la señalización ERK MAPK en células derivadas del CCR. p38 MAPK es una vía que está implicada en la proliferación, diferenciación, metabolismo y muerte celular (Cargnello and Roux, 2011). Esta cascada regula la actividad de varios factores de transcripción de una manera dependiente de señales y tejidos específicos (Cheruku et al., 2015). En los mamíferos, las diferentes isoformas de p38 (p38  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) son codificadas por cuatro genes. Comes y colaboradores evaluaron el impacto de la señalización de p38 sobre el destino celular en el CCR usando el inhibidor SB202190 (específico para las isoformas  $\alpha/\beta$  de p38) y concluyeron que  $\alpha$  p38 es necesario para la homeostasis de las células de CCR (Comes et al., 2007). Basándonos en este hallazgo, el hecho de que PTHrP fosforila/activa a p38 MAPK en células Caco-2 enfatiza la importancia de los mecanismos activados por el análogo de PTH en células de adenocarcinoma de colon humano, sin embargo, esta vía parece no estar activada en respuesta a PTHrP en células más indiferenciadas y más agresivas como es la línea celular HCT116.

Se encontró que PTHrP exógeno aumenta los niveles de Akt fosforilado (activo) en las células Caco-2 y HCT116; además, la vía de señalización de PI3K-Akt estaría involucrada en la activación de ERK 1/2 inducida por PTHrP en ambos tipos celulares. Al igual que las MAPK, existen cada vez más evidencias de que la activación de PI3K/Akt está asociada con el CCR y puede convertir la mucosa gástrica o colónica humana diferenciada en un fenotipo menos diferenciado y más maligno. Se cree que los efectos de PI3K sobre el crecimiento y progresión del tumor están mediados principalmente por Akt (Pandurangan, 2013).

Akt se expresa en exceso en varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de colon, de páncreas, de ovario y de mama. Por otra parte, la fosforilación de Akt en los carcinomas de colon humano se correlaciona con la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis, así como diferentes parámetros clínico-patológicos tales como el grado de invasión, infiltración de vasos, metástasis en ganglios linfáticos y estadio tumoral (Khaleghpour, 2004).

Los estudios mediante microscopía de fluorescencia sugieren que PTHrP exógeno estimula la ubicación nuclear de ERK1/2,  $\alpha$  p38 y Akt en las células tumorales intestinales. Se sabe que una vez activadas, las MAPKs pueden trasladarse desde el citoplasma al núcleo, lo que lleva a la fosforilación de varios factores de transcripción y la regulación de la expresión génica (Cargnello and Roux, 2011). Zehorai y colaboradores describen un nuevo mecanismo de translocación nuclear para ERKs, que se basa en una secuencia de translocación nuclear (NTS) dentro de su dominio de inserción de quinasa (KID) (Zehorai et al., 2010). Los mecanismos reguladores de la localización subcelular y el tráfico núcleo-citoplasmático de p38 MAPK aún no están claros porque p38 MAPK no tiene una secuencia señal clara para la importación o exportación nuclear como ERK1/2 (Zehorai et al., 2010). Sin embargo, se ha demostrado que p38 MAPK transloca al núcleo por diferentes estímulos en diferentes tipos de células (Cargnello and Roux, 2011). Se ha demostrado que tanto Akt como varios de sus reguladores y sus efectores se ubican específicamente entre el núcleo y el citoplasma de una manera que sugiere un alto grado de regulación de este proceso. Así, después de su activación, Akt ha sido implicado, ya sea directa o indirectamente, en la fosforilación y regulación posterior de varios factores de transcripción (Martelli et al., 2012).

Como se observó que PTHrP induce la fosforilación/activación de ERK 1/2 y Akt tanto en células Caco-2 como en las células HCT116, entonces, el siguiente objetivo de este Trabajo fue profundizar aún más en los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta de las células tumorales intestinales a PTHrP. Un activador de las vías de señalización mitogénicas es la quinasa Src; los resultados presentados revelan que PTHrP induce su fosforilación/activación en células Caco-2 y HCT116. La actividad de Src se halla incrementa en el 80% de los pacientes con CCR, lo que indica su importancia en esta enfermedad (Lieu and Kopetz, 2010). En el 12% de los pacientes con CCR se describió una mutación activadora del gen Src sin embargo, hay estudios que revelan la falta de mutaciones en esta quinasa en muchos otros pacientes con esta enfermedad (Chen et al., 2014), sugiriendo que Src es más probablemente un mediador de la señalización inducida por agonistas. El papel de Src en la progresión del CCR se confirma por tener una mayor actividad quinasa con la progresión de los pólipos benignos a carcinomas y cáncer metastásicos. La expresión de Src es mayor en los pólipos malignos humanos en etapas tempranas pero no en pólipos benignos (Irby and Yeatman, 2000). También se ha demostrado que la actividad de Src es mucho mayor en el cáncer de colon metastásico que en el cáncer de colon no metastásico (Chen et al., 2014). Los resultados presentados en esta Tesis revelaron que Src modula la fosforilación y activación de Akt y ERK 1/2 inducida por PTHrP en células Caco-2 y HCT116. Se sabe que Src regula a PI3K mediante la fosforilación directa de la subunidad p85 e inhibición de la fosfatasa que

modula negativamente a PI3K (PTEN). Src recluta a PI3K hacia la membrana y fosforila a p85 en Tyr688, lo cual conduce a la desinhibición de la subunidad p110 catalítica. Esta serie de eventos conduce a un aumento en la actividad PI3K. Además, Src regula la vía Ras-Raf-MEK-ERK1/2 activando c-Ras, que es el principal regulador de MAPK. Ras activa Raf, que a su vez activa MEK, y MEK activa ERK 1/2 (Frame, 2004).

A partir de las evidencias obtenidas en este Trabajo de Tesis empleando Ro 31-820, que es un inhibidor específico de la actividad de varias isoformas de PKC, se piensa que al menos una isoenzima de PKC podría estar mediando la activación de Akt y ERK 1/2 inducida por PTHrP en ambas líneas celulares.

Los resultados presentados en este Trabajo indican que luego del tratamiento con PTHrP los niveles de PKC $\alpha$  disminuyeron y aumentaron en las células Caco-2 y HCT116, respectivamente. Se sabe que las isoenzimas de PKC pueden exhibir patrones de expresión y papeles similares en múltiples tipos de cáncer. Sin embargo, en algunos casos, pueden mostrar un patrón de expresión y una función específica que dependen del tipo de cáncer (Kang, 2014). De hecho, debido a sus funciones tan complejas y altamente específicas en los tejidos, la PKC $\alpha$  actúa como un promotor tumoral o un supresor tumoral dependiendo del contexto (Garg et al., 2014). Varios estudios mostraron resultados discordantes respecto al papel de la PKC $\alpha$  en la progresión del cáncer de colon: aunque hay evidencias que demuestran que PKC $\alpha$  participa en el arresto del crecimiento y la supresión del cáncer en el epitelio intestinal (Garg et al., 2014), un estudio reciente ha sugerido que la activación de PKC $\alpha$  está implicada en la activación de ERK1/2/NF- $\kappa$ B a través de la vía del factor tisular/ VIIa/PAR2 y esta vía de señalización conduce a un incremento en la proliferación, migración y supervivencia en la línea celular de cáncer de colon SW620 (Wu et al., 2013). Alternativamente, PKC $\alpha$  también puede incrementar la adhesión celular y la resistencia a la quimioterapia a través de una vía de señalización diferente a la descrita en el arresto de la división celular. La alta actividad migratoria de las células de cáncer de colon se relaciona con la alta expresión de PKC $\alpha$  y baja expresión de E-cadherina (Masur et al., 2001), en este contexto, la regulación negativa de PKC $\alpha$  podría aumentar la sensibilidad a los agentes terapéuticos (Kang, 2014).

Varios estudios han reportado niveles elevados de PKC $\beta$ II durante la tumorigénesis inicial de los carcinomas de colon en relación con la expresión observada en el tejido colónico normal. El 18% de los adenocarcinomas primarios muestran niveles muy altos de PKC $\beta$ II, lo que se correlaciona con tasas de supervivencia pobres. PKC $\beta$ II ha sido implicada en la proliferación celular de CCR *in vitro* (Garg et al., 2014), por lo tanto, ésta podría ser una de las isoenzimas implicadas en la respuesta de las células Caco-2 y HCT116 a PTHrP.

PKC $\delta$  es otra isoenzima que también ha sido ampliamente estudiada en relación con el cáncer (Marengo et al., 2011). PKC $\delta$  es modulada positivamente en su expresión y/o en su activación (mediante fosforilación) para promover el comportamiento agresivo de las células intestinales tumorales (Kang, 2014). Se supone que PKC $\delta$  podría estar implicada en la respuesta a PTHrP de las células Caco-2 así

como de las células HCT116, ya que en ambas líneas celulares intestinales tumorales, el tratamiento con el éster de forbol TPA bajo condiciones que activan PKC (100 nM, 15 minutos), aumentó significativamente la fosforilación de PKC $\delta$ , mientras que este efecto se invirtió en células tratadas con TPA y en presencia de Ro 31-820 a una dosis de 200 nM. Otros colegas demostraron que la bradiquinina actúa como un agente proliferativo en el cáncer de mama ya que activa vías intracelulares tales como PKC $\delta$ , Akt y ERK1/2; en ese trabajo se demostró que PKC $\delta$  está implicada en la activación de ERK 1/2 (Greco et al., 2006).

Se ha demostrado de que PKC $\delta$  es fosforilado y activado por Src favoreciendo el fenotipo agresivo de las células tumorales intestinales y la consecuente progresión del CCR (McKinley et al., 2013). Estudios que emplean la línea celular normal PC12, derivada de feocromocitoma de rata, mostraron que PKC- $\iota$  y PKC- $\zeta$ , que son dos isoformas de PKC atípicas, también son fosforilados y activados por Src (Wooten et al., 2001). Además, se ha demostrado que PI3K regula la actividad de PKC en el cáncer, de una manera independiente de Akt, a través de mecanismos pobremente caracterizados que conducen a la supervivencia, el reordenamiento y la transformación del citoesqueleto (Vivanco and Sawyers, 2002).

Aunque tanto las células Caco-2 como las células HCT116 son líneas celulares derivadas de CCR, las grandes diferencias fenotípicas entre ambos tipos de células debido a variaciones en las mutaciones de los genes que se observan con frecuencia en la patogénesis y progresión del CCR (Ahmed et al., 2013), podría explicar los diferentes patrones de expresión proteica de PKC $\alpha$  en ambas líneas celulares después del tratamiento con PTHrP, podría explicar los cambios en el nivel de expresión de Src inducidos por la hormona, al menos a los tiempos estudiados, en células HCT116 pero no en las células Caco-2 y también podría explicar la ausencia de cambios en la fosforilación de p38 MAPK en células HCT116 expuestas a PTHrP, al menos a los tiempos estudiados. Además, el hecho de que el tiempo de duplicación de las células HCT116 es más corto que el observado en las células Caco-2 (21 horas y 36 horas, respectivamente) y que la actividad metabólica en las células HCT116 es más alta que en las células Caco-2 podría explicar los hallazgos que muestran que, después del tratamiento con PTHrP, las vías de señalización mitogénicas tales como Src, ERK y Akt se activan más rápidamente en las células HCT116 que en las células Caco-2.

Los datos experimentales presentados en esta Tesis indican que PTHrP exógeno estimula la fosforilación de  $\beta$ -catenina en los residuos de serina 552 y de serina 675; estos eventos conllevarían a su acumulación en el citosol y en el núcleo de las células tumorales intestinales. Se sabe que frente a un estímulo proliferativo, la  $\beta$ -catenina transloca al núcleo (Osaki et al., 2004); una vez en el núcleo, se combina con diferentes factores de transcripción para inducir la expresión de varios genes, como c-Myc y Ciclina D (Saif and Chu, 2010). La desregulación de la vía de señalización de  $\beta$ -catenina se ha observado en varios tipos de cáncer. Por ejemplo, en el CCR se ha descrito la degradación defectuosa vía proteosoma de  $\beta$ -catenina, lo que conduce a una acumulación anormal en el núcleo con la

consiguiente activación constitutiva de genes diana. También se han identificado mutaciones en el gen de  $\beta$ -catenina en el CCR y en varios tumores sólidos (Saif and Chu, 2010). En este Trabajo de Tesis se demostró que PTHrP fosforila a  $\beta$ -catenina en los residuos S552 y S675 a través de Akt y las MAPKs. La fosforilación en diversos residuos de  $\beta$ -catenina inducida por varias quinasas, entre ellas Akt y MAPKs, mediarían la transducción de señales extracelulares (Valenta et al., 2012). Se ha observado que Akt puede controlar la activación de  $\beta$ -catenina por fosforilación en S552 en líneas celulares derivadas de cáncer de tiroides (Sastre-Perona et al., 2016). Estos datos respaldan el concepto de que Akt y las MAPKs estabilizarían mediante fosforilación a la proteína  $\beta$ -catenina en el citosol con su consecuente acumulación en el núcleo de las células del CCR expuestas a PTHrP.

Los resultados generados por el desarrollo de este Trabajo de Tesis indican que las vías de señalización de PKC, Src y Akt modulan la fosforilación y la activación de ERK 1/2 inducida por PTHrP en células tumorales intestinales; una vez activada las MAPKs y Akt fosforilan residuos de  $\beta$ -catenina claves para su ubicación nuclear y consecuentemente para su función como inductor en la transcripción génica. Empleando los inhibidores específicos de las vías de señalización de ERK1/2 y  $\beta$ -catenina se observó el bloqueo total del efecto sobre la proliferación inducida por PTHrP tanto en las células Caco-2 como en las células HCT-116. Estos resultados enfatizan la relevancia de ambas vías de señalización como mediadores del efecto hormonal sobre las células tumorales intestinales, pero además evidencia la complejidad en la transducción de la señal de PTHrP al involucrar la activación de varios mecanismos moleculares que convergen en la activación de ERK y consecuentemente de la vía de  $\beta$ -catenina.

La familia de los factores de transcripción ATF/CREB juega un papel importante en la regulación de una serie de funciones celulares, incluyendo proliferación y apoptosis. Los miembros de la familia ATF/CREB dimerizan con ellos mismos u otros miembros de la familia y se unen al elemento de respuesta de AMP cíclico (CRE) en los genes (van Dam and Castellazzi, 2001). Se obtuvo la evidencia de que PTHrP induce la fosforilación de ATF-1 y CREB de una manera bifásica en las células Caco-2. Los resultados presentados en esta Tesis sugieren que p38 MAPK contribuye a los cambios observados en la fosforilación temprana de ATF/CREB mientras que la segunda fase es dependiente de p38 MAP quinasa y ERK1/2. De acuerdo con estos hallazgos, Buzzi y colaboradores (Buzzi et al., 2009) mostraron que en células Caco-2 y en presencia de suero, la fosforilación de CREB es dependiente de la activación de MAPK.

Los resultados aquí presentados mostraron que PTHrP también aumenta la expresión de las proteínas c-myc y ciclina D1 en las células tumorales intestinales a través de la vía de ERK1/2. Myc es un factor de transcripción que coordina la expresión de diversos programas intracelulares y extracelulares que juntos son necesarios para el crecimiento y la expansión de las células somáticas (Soucek et al., 2008); ha sido también involucrado en la génesis y la progresión de muchos tipos de cáncer al regular la expresión de genes implicados en la proliferación y la invasión celular. En el CCR, se sabe que la expresión de la

proteína c-myc está up-regulada hasta en un 70% de los casos (Boudjadi and Beaulieu, 2016). Se ha encontrado que la vía RTK/Ras/MEK/ERK mejora la estabilización de la proteína c-myc por fosforilación (Boudjadi et al., 2016) y que la fosforilación por ERK1/2 de LRP6 (que es un componente clave de la vía de señalización de Wnt) con la consecuente regulación positiva de c-Myc puede proporcionar un único punto de convergencia entre las vías de señalización de MAPK y Wnt /  $\beta$ -catenina durante la oncogénesis (Lemieux et al., 2015). Tal vez el aumento en la expresión de esta onco-proteína por PTHrP observado en este Trabajo de Tesis pueda deberse a la estabilización de la proteína c-myc por fosforilación junto con la regulación positiva de su expresión.

Con respecto a ciclina D1, ésta y otras proteínas reguladoras del ciclo celular son esenciales para la progresión del mismo desde la fase G1 a S. Se ha demostrado, en condiciones experimentales que conducen a la proliferación celular, de que la expresión de c-Myc se vio incrementada en presencia de suero en las células Caco-2 (Buzzi et al., 2009) mientras que PTHrP estimuló la progresión del ciclo celular induciendo la expresión de Ciclina D1 en células osteoblásticas (Datta et al., 2007); además, en condrocitos y en el condrosarcoma, una mutación activadora del RPTH1 causó un aumento en la expresión de ciclina D1 y ciclina A (Beier and LuValle, 2002). Hay evidencia de que la expresión de ciclina D1 puede ser regulada negativamente por PKC $\alpha$ , pero está regulada positivamente por PKC $\epsilon$  a través de la vía ERK. Estos hallazgos ponen nuevamente en evidencia las acciones opuestas de los miembros de la familia PKC y el papel de ERK, que convergen en la modulación de la expresión de la ciclina D1, como importantes reguladores de la homeostasis de los tejidos y la tumorigénesis en el intestino (Pysz et al., 2014).

En conjunto, los resultados de esta Tesis Doctoral que muestran que PTHrP regula positivamente la expresión de c-myc y de ciclina D1 así como la fosforilación/activación de CREB/ATF-1 proporcionan información adicional respecto a los efectos de PTHrP sobre eventos moleculares habitualmente asociados a la carcinogénesis y progresión del CCR.

En modelos *in vivo* PTHrP ha sido extensamente estudiado en cuanto a su rol como regulador de la remodelación ósea, entre tantas de sus funciones fisiológicas (Stewart et al., 2000, Esbrit and Alcaraz, 2013). Con respecto a su papel en situaciones patológicas, inicialmente se lo había relacionado como el factor inductor de la hipercalcemia humoral maligna; sin embargo, las investigaciones de la última década indican que PTHrP es un factor bioactivo en la iniciación, el crecimiento y la invasión de varios carcinomas (Soki et al., 2012). Se ha estudiado que esta hormona cumple un papel importante en el desarrollo de tumores de mama favoreciendo la metástasis de los mismos en hueso (Guise et al., 2002, Cheung et al., 2013). En cuanto a su rol en el CCR, Nishihara y colaboradores observaron que su expresión se correlaciona con la gravedad y metástasis de esta enfermedad (Nishihara et al., 1999); inclusive varios años después estos mismos investigadores volvieron a enfatizar la correlación positiva entre la expresión de PTHrP y la progresión de la enfermedad mediante un estudio que reveló que alrededor del 95% de los

adenocarcinomas colorrectales sobre-expresan PTHrP siendo el nivel de expresión mayor en los adenocarcinomas menos diferenciados que en aquellos con mayor grado de diferenciación (Nishihara et al., 2007).

Los resultados generados por el desarrollo de este Trabajo de Tesis empleando un modelo *in vivo* evidencian la activación de varios marcadores moleculares asociados con la proliferación celular, siendo este un aporte consistente con el rol de esta hormona en la iniciación y/o progresión de muchos tipos de cáncer, aportando evidencia original respecto de las vías de señalización activadas en respuesta a un factor secretado por el mismo tumor o por el microambiente tumoral como puede ser PTHrP.

En el modelo murino empleado en este Trabajo se demostró que existe un aumento tanto de la forma activa como total de ERK. La vía de señalización Ras-Raf-MEK-ERK está hiperactivada en un alto porcentaje de tumores, con mayor frecuencia debido a mutaciones activadoras de los genes KRAS, NRAS y BRAF (Samatar and Poulikakos, 2014), y esta información junto con el dato de que las células HCT116 empleadas para generar los xenoinjertos en ratones “nude” presentan una mutación activadora en el gen KRAS (Ahmed et al., 2013) son consistentes con los cambios en ERK por PTHrP observados en el modelo animal empleado en este Trabajo. En base a los resultados obtenidos en los modelos experimentales empleados *in vitro*, se podría suponer que esta sobre-activación de ERK inducida por PTHrP podría ser la responsable del aumento en la expresión proteica de ciclina D1 y p-CREB/ATF-1 observados en los tumores subcutáneos.

Los resultados presentados en esta Tesis han demostrado que tanto PTH como el calcitriol son capaces de regular los niveles de ARNm de PTHrP en células tumorales intestinales. Mientras que el gen de PTH tiene una estructura relativamente simple, el gen de PTHrP es complejo, el cual sufre empalmes alternativos que pueden generar múltiples especies de ARNm que codifican para péptidos de 139, 141 o 173 aminoácidos. Se ha observado en modelos experimentales *in vitro* que tanto PTH, como hormonas glucocorticoides, el calcitriol y factores de crecimiento pueden regular los niveles de ARNm de PTHrP en osteoblastos normales (Walsh et al., 1997). Por otra parte, en células de cáncer de mama los niveles tanto de ARNm de PTHrP como de PTHrP que será secretado pueden ser modulados por calcio extracelular y moléculas de la matriz extracelular, como el colágeno; de esta manera habría una participación activa del estroma en la regulación de las vías de señalización moduladas por PTHrP que pueden desempeñar un papel en la carcinogénesis (Luparello et al., 1999). Además, en pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, se ha observado una retroalimentación positiva entre los niveles de calcio, PTHrP y el factor de transcripción RUNX2, con los niveles de ARNm de PTHrP siendo todos estos factores, signos de una pobre prognosis (Chang et al., 2017).

A pesar de modular los niveles de ARNm de PTHrP, PTH no ejerce sus efectos anti-proliferativos en células que sobre-expresan PTHrP. Pioszak y colaboradores han estudiado cómo PTH y PTHrP interaccionan con RPTH1 y han reportado que ambas hormonas muestran selectividad diferente para dos

conformaciones distintas de RPTH1. PTHrP se une en el mismo sitio que PTH, sin embargo, en contraste con la necesidad de un sitio de unión recto por parte de PTH, PTHrP necesita para su unión de una curvatura y una forma desenrollada de la porción carboxilo terminal (Pioszak et al., 2009). Este es un factor a tener en cuenta a la hora de estudiar ambas hormonas en conjunto. Una posible explicación para los resultados presentados en este trabajo de Tesis, es que el receptor se halle en su mayoría en su forma “curva”, favoreciendo la unión de PTHrP por sobre la de PTH. A pesar de esta conformación del receptor, la cantidad de PTH exógeno (dosis de cada experimento  $10^{-8}$ M) sería suficiente para “down-regular” la expresión de PTHrP, no así para desencadenar efectos anti-proliferativos en las células tumorales intestinales.

Por otra parte, en células que sobre-expresan PTHrP, el calcitriol sigue ejerciendo sus efectos anti-proliferativos al disminuir el número de células vivas. Es muy probable que la actividad antitumoral del calcitriol en este y otros tipos de cáncer sea un proceso irreversible, por lo que PTHrP no podría ejercer sus efectos en la promoción de la proliferación celular (Beer and Myrthue, 2004, Trump et al., 2004, Flynn et al., 2006).

Los resultados de este Trabajo de Tesis indican que PTHrP aumenta el número de células tumorales intestinales vivas en presencia de Irinotecán, respecto del tratamiento con Irinotecan solo. Se ha estudiado que PTHrP puede inducir quimiorresistencia a otros agentes terapéuticos en otros tipos de tumores (Gagiannis et al., 2009, Cui et al., 2016). Hay trabajos que reportan que la menor sensibilidad a la droga podría ser favorecida por la modulación de vías pro-apoptóticas y anti-proliferativas necesarias para la respuesta al Irinotecán (Charara et al., 2004, Yang et al., 2016). De acuerdo con este concepto, en este Trabajo se observó que PTHrP revierte los cambios en los niveles de expresión de PARP clivado, Bcl-2 y p27 debidos al tratamiento con Irinotecán en la línea celular HCT116. Sin embargo, no se evidenció ningún cambio en los niveles de expresión de estas proteínas en la línea celular Caco-2 debida al tratamiento con Irinotecán ni con PTHrP más Irinotecán sugiriendo que la droga afecta la viabilidad de esta línea celular mediante otros mecanismos distintos a los observados en la línea intestinal HCT116. Además, en este Trabajo se observó que el bloqueo de las vías de señalización de ERK y  $\beta$ -catenina en presencia de la hormona restauró la sensibilidad de las líneas celulares Caco-2 y HCT116 al Irinotecán. Recientemente, el uso de compuestos que se dirigen a los componentes de la vía de señalización de ERK, tales como inhibidores de Raf o MEK, ha conducido a una mejora sustancial en el resultado clínico en otro tipo de cáncer, el melanoma metastásico, y ha mostrado actividad clínica prometedora en otros tipos de tumores. Sin embargo, la respuesta y la eficacia de estos fármacos son muy variables y está limitada principalmente por el desarrollo de la resistencia. Tanto la resistencia intrínseca como la adquirida a los inhibidores de Raf y MEK se asocian con frecuencia con la persistencia de la señalización de ERK, lo que implica la necesidad de enfoques más innovadores para dirigirse a la vía (Samatar and Poulidakos, 2014).

# 7. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis se puede concluir que PTHrP es capaz de inducir un aumento en la proliferación celular de dos líneas derivadas de CCR, las células Caco-2 y las células HCT116. Además, este efecto inducido por la hormona está modulado por las cascadas de señalización mitogénicas PKC, Src, Akt, ERK MAPK y  $\beta$ -catenina. Se observó que la activación de estas vías desencadenó el aumento de la expresión y/o activación por fosforilación de CREB/ATF-1, c-myc y ciclina D1 que son relevantes en la proliferación celular (**Figura 43A**). A partir de los experimentos desarrollados en el modelo murino se puede concluir que la administración continua de la hormona en forma intra-tumoral modula la expresión de ciertos marcadores claves en la progresión del CCR que previamente habían sido observados de ser modulados por PTHrP *in vitro*, como son ERK, ciclina D1 y CREB/ATF-1 (**Figura 43B**). Por otra parte se concluye que tanto las células tumorales intestinales normales como aquellas que sobre-expresan PTHrP responden a la acción de las hormonas calcitriol y PTH al menos a nivel transcripcional disminuyendo la expresión de PTHrP. Por último, se concluye que PTHrP no sólo favorece la activación de vías mitogénicas y la proliferación de las células Caco-2 y HCT 116 sino que también es capaz de disminuir la sensibilidad de estas células al Irinotecán (que es una droga comúnmente utilizada para la quimioterapia del CCR) mediante las vías de ERK MAPK y  $\beta$ -catenina.

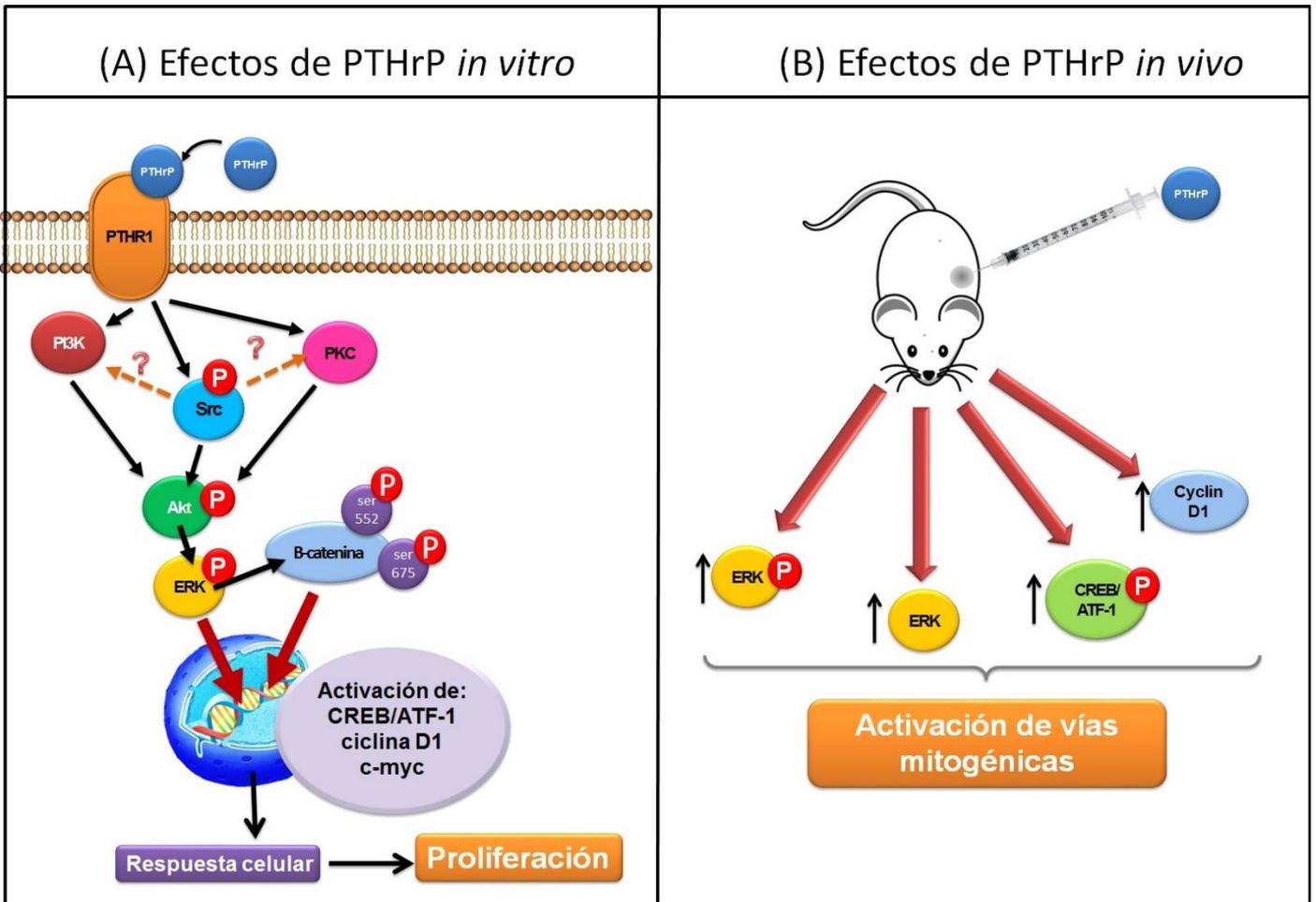


Figura 43. (A) PTHrP induce la proliferación de células tumorales intestinales a través de la activación de vías mitogénicas *in vitro* (B) PTHrP modula la expresión de marcadores claves en la progresión del CCR *in vivo*.

# 8. PUBLICACIONES ORIGINADAS DE ESTA TESIS

## Publicaciones como primer autor (total=3):

**2014.** María Julia Martín, Natalia Calvo, Ana Russo de Boland, Claudia Gentili. "Molecular mechanisms associated with PTHrP-induced proliferation of colon cancer cells". **Journal of Cellular Biochemistry**, 115(12): 2133-2145. DOI: 10.1002/jcb.24890. Online ISSN: 1097-4644.

**2017.** María Julia Martín, Graciela Gigola, Martin Carriquiborde, Florencia Gentil, Claudia Gentili. "Potential therapeutic targets for growth arrest of colon cancer cells exposed to PTHrP". Versión enviada para su publicación a *Molecular and Cellular Endocrinology*.

María Julia Martín, Belén Novoa Díaz, Graciela Gigola, Claudia Gentili. "PTHrP induces tumorigenic  $\beta$ -catenin pathway independently of Wnt signaling in colon cancer cells". Manuscrito en preparación.

## Co-Autorías (Total=4):

**2014.** Natalia Calvo, M. Julia Martin, Ana Russo de Boland, Claudia Gentili. "Involvement of ERK 1/2, p38 MAPK and PI3k/Akt signaling pathways in the regulation of cell cycle progression by PTHrP in colon adenocarcinoma cells". **Biochemistry and Cell Biology**, 92(4): 305-315. ISSN (electronic): 1208-6002.

**2017.** Natalia Calvo, Carriere Pedro, M. Julia Martin, Claudia Gentili. "RSK activation via ERK modulates human colon cancer cells response to PTHrP". **Journal of Molecular Endocrinology** 59: 13-27. doi: 10.1530/JME-16-0216. Online ISSN: 1479-6813.

María Gabriela Montiel Schneider, María Julia Martin, Claudia Gentilli, Verónica Leticia Lassalle. "Ascorbic-acid covered magnetite nanoparticles: synthesis and biocompatibility with tumor intestinal cell lines". Manuscrito en preparación.

Ricardo E. Barcia \*, María Julia Martín\*, Alejo Pérez de la Hoz , Claudia Gentili. \*Estos autores contribuyeron equitativamente con esta publicación. "Penile squamous cell carcinoma associated with severe hypercalcemia and high levels of Parathyroid Hormone related Peptide (PTHrP) expressed in metastatic skin tissue. A case report and review of the literature". Manuscrito en preparación.

## Premios logrados:

**2013. Primer Premio Investigación Básica.** Martín María Julia, Calvo Natalia, Wies Mancini Victoria, Russo de Boland Ana, Gentili Claudia. "El péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP)

estimula la proliferación en células de adenocarcinoma de colon humano a través de las vías de señalización ERK 1/2, p38 MAPK y PI3K/AKT". XXX Reunión Anual AAOMM.

Presentacion de trabajos en reuniones científicas (total=15):

**2012.** Calvo Natalia, Martín María Julia, Russo de Boland Ana y Gentili Claudia. "El análogo tumoral de PTH favorece la progresión del ciclo celular en células de cáncer de colon humano". LVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Noviembre 2012. Mar del Plata, Argentina. Publicado en **Medicina, 72 supl I :251. ISSN 0025-7680 (Impresa) ISSN 1669-9106 (En línea).**

**2013.** Martín María Julia, Calvo Natalia, Wies Mancini Victoria, Russo de Boland Ana y Gentili Claudia. "El péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) estimula la proliferación en células de adenocarcinoma de colon humano a través de las vías de señalización ERK 1/2, p38 MAPK y PI3K/AKT". XXX Reunión Anual AAOMM. 29-31 de Agosto 2013. Buenos Aires, Argentina (1° Premio investigación básica). Publicado en **Actualizaciones en Osteología, 9, supl. 1 (2013) ISSN Print: 1669-8975. ISSN Online: 1669-8973** Resumen publicado en **BONE, 2015, Volume 71, Page 261.**

**2013.** Martín María Julia, Calvo Natalia, Russo de Boland Ana, Gentili Claudia. "Signal transduction pathways associated with PTHrP-induced proliferation of colon adenocarcinoma cells". 2013 Annual Meeting - The American Society for Bone and Mineral Reserch. Octubre 4-7. Baltimore, Maryland, USA.

**2013.** Calvo Natalia, Martín María Julia, Russo de Boland Ana y Gentili Claudia. "Mecanismos moleculares involucrados en la regulación del ciclo celular por el análogo tumoral de PTH en células de cáncer de colon humano". LVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC).20-23/11. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Publicado en **Medicina, 73 supl III: 270 ISSN 0025-7680 (Impresa) ISSN 1669-9106 (En línea).**

**2014.** Calvo Natalia, Carriere Pedro, Martín María Julia, Russo de Boland Ana y Gentili Claudia. "Involvement of ERK1/2 Pathway in the Migration of Colon Cancer Cells Induced by PTHrP". L Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). 11-14/11. Rosario, Argentina. Publicado en **BIOCELL, 38 supl 2: 188. ISSN print:0327-9545. ISSN online: 1667-5746**

**2014.** Martín María Julia, Wies Mancini Victoria, Calvo Natalia, Russo de Boland Ana, Gentili Claudia. "Mecanismo de activación de la vía de señalización PI3K/Akt en células intestinales tumorales expuestas al análogo tumoral de la hormona paratiroidea". LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). 19-22 noviembre. Mar del Plata, Argentina. Publicado en **Medicina, 74 supl III:166 ISSN 0025-7680 (Impresa) ISSN 1669-9106 (En línea).**

- 2015.** Martín María Julia, Calvo Natalia, Gentili Claudia. "Implication of ERK 1/2 MAPK in PTHrP-induced signal transduction in colon adenocarcinoma cells". The Third South American Symposium in Signal Transduction and Molecular Medicine (SISTAM 2015). 1-6 abril, 2015. Bariloche, Argentina.
- 2015.** Pedro Carriere, Natalia Calvo , María Julia Martín, Claudia Gentili . "Vías de transducción de señales asociadas con la migración inducida por PTHrP en células tumorales intestinales". XXXII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral (AAOMM). 29-31/10. Sierra de la Ventana, Buenos Aires, Argentina. Publicado en **Actualizaciones en Osteología, 11, supl. 1: 35 (2015) ISSN Print: 1669-8975. ISSN Online: 1669-8973** Resumen publicado en **BONE, 2016, Volume 89, Page 64-72.**
- 2015.** Natalia Calvo, Pedro Carriere, María Julia Martín, Claudia Gentili . "Rol diferencial de ERK 1/2 MAPK y p38 MAPK en la respuesta de las células de adenocarcinoma de colon humano estimuladas con el análogo tumoral de la hormona paratiroidea". LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). 18-21/11. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Publicado en **Medicina, 75 supl II:89 ISSN 0025-7680 (Impresa) ISSN 1669-9106 (En línea).**
- 2016.** María Julia Martín, María Belén Novoa Díaz, Graciela Gigola, Martin Carriquirborde, Florencia Gentil, Claudia Gentili. "Pivotal role of PKC, Src and Akt in colon cancer cells response to PTHrP: control of mitogenic signaling". LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). 16 al 19 de Noviembre de 2016. Mar del Plata.
- 2016.** María Julia Martín, Natalia Calvo, Claudia Gentili. "Control of Parathyroid Hormone related Peptide expression by calciotropic hormones in colon cancer cells". LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). 16 al 19 de Noviembre de 2016. Mar del Plata.
- 2017.** M. Gabriela Montiel Schneider, Ma. Julia Martín, Claudia Gentili, Verónica L. Lassalle. "Síntesis y ensayos sobre células HCT116 de Nanopartículas de magnetita cubiertas con ácido ascórbico". IV NanoCórdoba. Jornadas sobre Nanociencia y Nanotecnología. 19 y 20 de Mayo de 2017. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina.
- 2017.** María Julia Martín , Belén Novoa Díaz, Natalia Calvo, Pedro Carriere, Claudia Gentili. "Inhibitors of the ERK signaling pathway cooperate in the anti-proliferative effect of chemotherapeutics in colon cancer cells exposed to PTHrP". XXXIV Reunión Anual AAOMM. 12 al 14 de Octubre. Buenos Aires, Argentina.
- 2017.** María Julia Martín , Belén Novoa Díaz, Graciela Gigola , Horacio Maturi, Martin Carriquirborde, Florencia Gentil, Pedro Carriere, Natalia Calvo, Claudia Gentili. "Continuous PTHrP administration in

colorectal cancer cells xenografts increases positive regulators levels of cell proliferation". Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. 13 al 17 de noviembre. Buenos Aires, Argentina.

**2017.** Belén Novoa Díaz, María Julia Martín, Pedro Carriere, Natalia Calvo, Claudia Gentili. "PTHrP induces tumorigenic  $\beta$ -catenin pathway independently of Wnt signaling in colon cancer cells". Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. 13 al 17 de noviembre. Buenos Aires, Argentina.

# 9. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, D., Eide, P.W., Eilertsen, I.A., Danielsen, S.A., Eknæs, M., Hektoen, M., Lind, G.E., and Lothe, R.A. 2013. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* 2(9): e71.
- Allen, D.C. 2006. *Histopathology Reporting: Guidelines for Surgical Cancer*. In 2nd edition. Springer, London. Available from
- Asadi, F., Faraj, M., Malakouti, S., and Kukreja, S.C. 2001. Effect of parathyroid hormone related protein, and dihydrotestosterone on proliferation and ornithine decarboxylase mRNA in human prostate cancer cell lines. *Int Urol Nephrol* 33(3): 417–22.
- Backer, J.M. 2010. The Regulation of Class IA PI 3-Kinases by Inter-Subunit Interactions. pp. 87–114.
- Beer, T.M., and Myrthue, A. 2004. Calcitriol in cancer treatment: from the lab to the clinic. *Mol Cancer Ther* 3(3): 373–381.
- Beier, F., and LuValle, P. 2002. The Cyclin D1 and Cyclin A Genes Are Targets of Activated PTH/PTHrP Receptors in Jansen's Metaphyseal Chondrodysplasia. *Mol Endocrinol* 16(9): 2163–2173.
- Bhatia, V., Mula, R. V., and Falzon, M. 2011. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates PTHrP expression via transcriptional, post-transcriptional and post-translational pathways. *Mol Cell Endocrinol* 342(1–2): 32–40.
- Bhatia, V., Saini, M.K., and Falzon, M. 2009. Nuclear PTHrP targeting regulates PTHrP secretion and enhances LoVo cell growth and survival. *Regul Pept* 158(1–3): 149–155.
- Boggon, T.J., and Eck, M.J. 2004. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 23(48): 7918–7927.
- Bordonaro, M. 2015. CREB-binding protein, p300, butyrate, and Wnt signaling in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 21(27): 8238.
- Boudjadi, S., and Beaulieu, J. 2016. MYC and integrins interplay in colorectal cancer. *Oncoscience* 3(2): 50–51.
- Boudjadi, S., Carrier, J.C., Groulx, J.-F., and Beaulieu, J.-F. 2016. Integrin  $\alpha 1\beta 1$  expression is controlled by c-MYC in colorectal cancer cells. *Oncogene* 35(13): 1671–1678.

- Buzzi, N., Colicheo, A., Boland, R., and de Boland, A.R. 2009. MAP kinases in proliferating human colon cancer Caco-2 cells. *Mol Cell Biochem* 328(1–2): 201–208.
- Calvo, N., de Boland, A.R., and Gentili, C. 2010. PTH inactivates the AKT survival pathway in the colonic cell line Caco-2. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1803(3): 343–351.
- Calvo, N., Boland, A.R. De, and Gentili, C. 2013. Modulación por la hormona paratiroidea del ciclo celular en células de adenocarcinoma de colon humano. 9(2): 165–175.
- Calvo, N., Carriere, P., Martin, M.J., and Gentili, C. 2017. RSK activation via ERK modulates human colon cancer cells response to PTHrP. *J Mol Endocrinol* 59(1): 13–27.
- Calvo, N., Gentili, C., and de Boland, A.R. 2011. Parathyroid hormone and the regulation of cell cycle in colon adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1813(10): 1749–1757.
- Calvo, N., German, O., Russo de Boland, A., and Gentili, C. 2009. Pro-apoptotic effects of parathyroid hormone in intestinal cells. *Biochem Cell Biol* 87(2): 389–400.
- Calvo, N., Martin, M.J., de Boland, A.R., and Gentili, C. 2014. Involvement of ERK1/2, p38 MAPK, and PI3K/Akt signaling pathways in the regulation of cell cycle progression by PTHrP in colon adenocarcinoma cells. *Biochem Cell Biol* 92(4): 305–315.
- Calvo, N.G., Gentili, C.R., and de Boland, A.R. 2008. The early phase of programmed cell death in Caco-2 intestinal cells exposed to PTH. *J Cell Biochem* 105(4): 989–997.
- Cargnello, M., and Roux, P.P. 2011. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75(1): 50–83.
- Castellano, E., and Downward, J. 2011. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer* 2(3): 261–274.
- Chang, W.-M., Lin, Y.-F., Su, C.-Y., Peng, H.-Y., Chang, Y.-C., Hsiao, J.-R., Chen, C.-L., Chang, J.-Y., Shieh, Y.-S., Hsiao, M., and Shiah, S.-G. 2017. Parathyroid Hormone-Like Hormone is a Poor Prognosis Marker of Head and Neck Cancer and Promotes Cell Growth via RUNX2 Regulation. *Sci Rep* 7: 41131.
- Charara, M., Edmonston, T.B., Burkholder, S., Walters, R., Anne, P., Mitchell, E., Fry, R., Boman, B., Rose, D., Fishel, R., Curran, W., and Palazzo, J. 2004. Microsatellite status and cell cycle associated markers in rectal cancer patients undergoing a combined regimen of 5-FU and CPT-11 chemotherapy and radiotherapy. *Anticancer Res* 24(5 B): 3161–3167.
- Chen, J., Elfiky, A., Han, M., Chen, C., and Saif, M.W. 2014. The Role of Src in Colon Cancer and Its

Therapeutic Implications. *Clin Colorectal Cancer* 13(1): 5–13.

- Chen, J., Smith, M., Kolinsky, K., Adames, V., Mehta, N., Fritzky, L., Rashed, M., Wheeldon, E., Linn, M., and Higgins, B. 2007. Antitumor activity of HER1/EGFR tyrosine kinase inhibitor erlotinib, alone and in combination with CPT-11 (irinotecan) in human colorectal cancer xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol* 59(5): 651–659.
- Cheruku, H.R., Mohamedali, A., Cantor, D.I., Tan, S.H., Nice, E.C., and Baker, M.S. 2015. Transforming growth factor- $\beta$ , MAPK and Wnt signaling interactions in colorectal cancer. *EuPA Open Proteomics* 8: 104–115.
- Cheung, V., Bouralexis, S., and Gillespie, M.T. 2013. PTHrP Overexpression Increases Sensitivity of Breast Cancer Cells to Apo2L/TRAIL. *PLoS One* 8(6): e66343.
- Cianferotti, L. 2015. PTH and PTHrP: Nonclassical Targets. *In* Hypoparathyroidism. Springer Milan, Milano. pp. 111–126.
- Comes, F., Matrone, A., Lastella, P., Nico, B., Susca, F.C., Bagnulo, R., Ingravallo, G., Modica, S., Lo Sasso, G., Moschetta, A., Guanti, G., and Simone, C. 2007. A novel cell type-specific role of p38 $\alpha$  in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. *Cell Death Differ* 14(4): 693–702.
- Cross, H.S., Hulla, W., Tong, W.M., and Peterlik, M. 1995. Growth regulation of human colon adenocarcinoma-derived cells by calcium, vitamin D and epidermal growth factor. *J Nutr* 125(7 Suppl): 2004S–2008S.
- Cui, Y., Sun, Y., Hu, S., Luo, J., Li, L., Li, X., Yeh, S., Jin, J., and Chang, C. 2016. Neuroendocrine prostate cancer (NEPCa) increased the neighboring PCa chemoresistance via altering the PTHrP/p38/Hsp27/androgen receptor (AR)/p21 signals. *Oncogene* 35(47): 6065–6076.
- van Dam, H., and Castellazzi, M. 2001. Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* 20(19): 2453–2464.
- Datta, N.S., Pettway, G.J., Chen, C., Koh, A.J., and McCauley, L.K. 2007. Cyclin D1 as a Target for the Proliferative Effects of PTH and PTHrP in Early Osteoblastic Cells. *J Bone Miner Res* 22(7): 951–964.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26(22): 3279–3290.
- Dunn, E.F., Iida, M., Myers, R.A., Campbell, D.A., Hintz, K.A., Armstrong, E.A., Li, C., and Wheeler, D.L. 2011. Dasatinib sensitizes KRAS mutant colorectal tumors to cetuximab. *Oncogene* 30(5): 561–

574.

- Ebi, H., Costa, C., Faber, A.C., Nishtala, M., Kotani, H., Juric, D., Della Pelle, P., Song, Y., Yano, S., Mino-Kenudson, M., Benes, C.H., and Engelman, J.A. 2013. PI3K regulates MEK/ERK signaling in breast cancer via the Rac-GEF, P-Rex1. *Proc Natl Acad Sci* 110(52): 21124–21129.
- Erdem, Z.N., Schwarz, S., Drev, D., Heinzle, C., Reti, A., Heffeter, P., Hudec, X., Holzmann, K., Grasl-Kraupp, B., Berger, W., Grusch, M., and Marian, B. 2017. Irinotecan Upregulates Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Expression in Colorectal Cancer Cells, Which Mitigates Irinotecan-Induced Apoptosis. *Transl Oncol* 10(3): 332–339.
- Esbrit, P., and Alcaraz, M.J. 2013. Current perspectives on parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) as bone anabolic therapies. *Biochem Pharmacol* 85(10): 1417–1423.
- Fang, J.Y., and Richardson, B.C. 2005. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 6(5): 322–327.
- Feldman, D., Krishnan, A. V., Swami, S., Giovannucci, E., and Feldman, B.J. 2014. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer* 14(5): 342–357.
- Flynn, G., Chung, I., Yu, W.-D., Romano, M., Modzelewski, R.A., Johnson, C.S., and Trump, D.L. 2006. Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol) Selectively Inhibits Proliferation of Freshly Isolated Tumor-Derived Endothelial Cells and Induces Apoptosis. *Oncology* 70(6): 447–457.
- Frame, M.C. 2004. Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it. *J Cell Sci* 117(7): 989–998.
- Fruman, D.A., and Rommel, C. 2014. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 13(2): 140–156.
- Gagiannis, S., Müller, M., Uhlemann, S., Koch, A., Melino, G., Krammer, P.H., Nawroth, P.P., Brune, M., and Schilling, T. 2009. Parathyroid hormone-related protein confers chemoresistance by blocking apoptosis signaling via death receptors and mitochondria. *Int J Cancer* 125(7): 1551–1557.
- Gao, Y., Moten, A., and Lin, H.-K. 2014. Akt: a new activation mechanism. *Cell Res* 24(7): 785–786.
- Garg, R., Benedetti, L.G., Abera, M.B., Wang, H., Abba, M., and Kazanietz, M.G. 2014. Protein kinase C and cancer: what we know and what we do not. *Oncogene* 33(45): 5225–5237.
- Greco, S., Storelli, C., and Marsigliante, S. 2006. Protein kinase C (PKC)- $\delta$ / $\epsilon$  mediate the PKC/Akt-dependent phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 in MCF-7 cells stimulated by bradykinin. *J Endocrinol* 188(1): 79–89.

- Guise, T.A., Yin, J.J., Thomas, R.J., Dallas, M., Cui, Y., and Gillespie, M.T. 2002. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP)-(1-139) isoform is efficiently secreted in vitro and enhances breast cancer metastasis to bone in vivo. *Bone* 30(5): 670–6.
- Guthalu Kondegowda, N., Joshi-Gokhale, S., Harb, G., Williams, K., Zhang, X.Y., Takane, K.K., Zhang, P., Scott, D.K., Stewart, A.F., Garcia-Ocana, A., and Vasavada, R.C. 2010. Parathyroid Hormone-Related Protein Enhances Human  $\alpha$ -Cell Proliferation and Function With Associated Induction of Cyclin-Dependent Kinase 2 and Cyclin E Expression. *Diabetes* 59(12): 3131–3138.
- Hastings, R.H., Burton, D.W., Quintana, R.A., Biederman, E., Gujral, A., and Defetos, L.J. 2001. Parathyroid hormone-related protein regulates the growth of orthotopic human lung tumors in athymic mice. *Cancer* 92(6): 1402–10. Available from
- Hawkins, P.T., and Stephens, L.R. 2015. PI3K signalling in inflammation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1851(6): 882–897.
- Irby, R.B., and Yeatman, T.J. 2000. Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* 19(49): 5636–5642.
- Kang, J.-H. 2014. Protein Kinase C (PKC) Isozymes and Cancer. *New J Sci* 2014: 1–36.
- Keshet, Y., and Seger, R. 2010. The MAP Kinase Signaling Cascades: A System of Hundreds of Components Regulates a Diverse Array of Physiological Functions. pp. 3–38.
- Khaleghpour, K. 2004. Involvement of the PI 3-kinase signaling pathway in progression of colon adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 25(2): 241–248.
- El Khoury, F., Corcos, L., Durand, S., Simon, B., and Le Jossic-Corcos, C. 2016. Acquisition of anticancer drug resistance is partially associated with cancer stemness in human colon cancer cells. *Int J Oncol* 49(6): 2558–2568.
- Kir, S., White, J.P., Kleiner, S., Kazak, L., Cohen, P., Baracos, V.E., and Spiegelman, B.M. 2014. Tumour-derived PTH-related protein triggers adipose tissue browning and cancer cachexia. *Nature* 513(7516): 100–104.
- Kovacs, C.S. 2015. Calcium, phosphorus, and bone metabolism in the fetus and newborn. *Early Hum Dev* 91(11): 623–628.
- Lemieux, E., Cagnol, S., Beaudry, K., Carrier, J., and Rivard, N. 2015. Oncogenic KRAS signalling promotes the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway through LRP6 in colorectal cancer. *Oncogene* 34(38): 4914–4927.

- Lezcano, V., Gentili, C., and de Boland, A.R. 2013. Role of PTHrP in human intestinal Caco-2 cell response to oxidative stress. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1833(12): 2834–2843.
- Li, J., Karaplis, A.C., Huang, D.C., Siegel, P.M., Camirand, A., Yang, X.F., Muller, W.J., and Kremer, R. 2011. PTHrP drives breast tumor initiation, progression, and metastasis in mice and is a potential therapy target. *J Clin Invest* 121(12): 4655–4669.
- Li, Y., Wang, J., Gao, X., Han, W., Zheng, Y., Xu, H., Zhang, C., He, Q., Zhang, L., Li, Z., and Zhou, D. 2014. c-Met Targeting Enhances the Effect of Irradiation and Chemical Agents against Malignant Colon Cells Harboring a KRAS Mutation. *PLoS One* 9(11): e113186.
- Lieu, C., and Kopetz, S. 2010. The Src Family of Protein Tyrosine Kinases: A New and Promising Target for Colorectal Cancer Therapy. *Clin Colorectal Cancer* 9(2): 89–94.
- Luna-Ulloa, L.B., Hernández-Maqueda, J.G., Castañeda-Patlán, M.C., and Robles-Flores, M. 2011. Protein kinase C in Wnt signaling: Implications in cancer initiation and progression. *IUBMB Life* 63(10): 915–921.
- Luparello, C., Birch, M.A., Gallagher, J.A., and Burtis, W.J. 1997. Clonal heterogeneity of the growth and invasive response of a human breast carcinoma cell line to parathyroid hormone-related peptide fragments. *Carcinogenesis* 18(1): 23–9. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9054585>.
- Luparello, C., Schilling, T., Cirincione, R., and Pucci-Minafra, I. 1999. Extracellular matrix regulation of PTHrP and PTH/PTHrP receptor in a human breast cancer cell line. *FEBS Lett* 463(3): 265–269.
- Maioli, E., and Fortino, V. 2004. The complexity of parathyroid hormone-related protein signalling. *Cell Mol Life Sci* 61(3): 257–262.
- Maitra, R., Seetharam, R., Tesfa, L., Augustine, T.A., Klampfer, L., Coffey, M.C., Mariadason, J.M., and Goel, S. 2014. Oncolytic reovirus preferentially induces apoptosis in KRAS mutant colorectal cancer cells, and synergizes with irinotecan. *Oncotarget* 5(9): 2807–2819.
- Malakouti, S., Asadi, F.K., Kukreja, S.C., Abcarian, H.A., and Cintron, J.R. 1996. Parathyroid hormone-related protein expression in the human colon: immunohistochemical evaluation. *Am Surg* 62(7): 540-4-5. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8651548>.
- Mantilla, C., Mellado, I.S., Jaramillo, A.D., and Navas, M.-C.N. 2015. Mecanismos de señalización por  $\beta$ -catenina y su papel en la carcinogénesis. *CES Med* 29(1): 128. Available from <http://revistas.ces.edu.co/index.php/medicina/article/view/109%5Cnhttp://revistas.ces.edu.co/index.php/medicina/article/download/109/2394>.

- Marengo, B., De Ciucis, C., Ricciarelli, R., Pronzato, M., Marinari, U., and Domenicotti, C. 2011. Protein Kinase C: An Attractive Target for Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* 3(4): 531–567.
- Martelli, A.M., Tabellini, G., Bressanin, D., Ognibene, A., Goto, K., Cocco, L., and Evangelisti, C. 2012. The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1823(12): 2168–2178.
- Masur, K., Lang, K., Niggemann, B., Zanker, K.S., and Entschladen, F. 2001. High PKC alpha and low E-cadherin expression contribute to high migratory activity of colon carcinoma cells. *Mol Biol Cell* 12(7): 1973–82.
- McCauley, L.K., and Martin, T.J. 2012. Twenty-five years of PTHrP progress: From cancer hormone to multifunctional cytokine. *J Bone Miner Res* 27(6): 1231–1239.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W.T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A.M., and Franklin, R.A. 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1773(8): 1263–1284.
- McKinley, E.T., Liu, H., McDonald, W.H., Luo, W., Zhao, P., Coffey, R.J., Hanks, S.K., and Manning, H.C. 2013. Global Phosphotyrosine Proteomics Identifies PKC $\delta$  as a Marker of Responsiveness to Src Inhibition in Colorectal Cancer. *PLoS One* 8(11): e80207.
- Mebratu, Y., and Tesfaigzi, Y. 2009. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* 8(8): 1168–1175.
- Mocellin, S., Baretta, Z., M, R.F., Solà, I., Hallum, S., and X, B.C. 2017. Second-line systemic therapy for metastatic colorectal cancer ( Review ). *Cochrane Database Syst Rev* (1).
- Moser, C., Lang, S.A., Kainz, S., Gaumann, A., Fichtner-Feigl, S., Koehl, G.E., Schlitt, H.J., Geissler, E.K., and Stoeltzing, O. 2007. Blocking heat shock protein-90 inhibits the invasive properties and hepatic growth of human colon cancer cells and improves the efficacy of oxaliplatin in p53-deficient colon cancer tumors in vivo. *Mol Cancer Ther* 6(11): 2868–2878.
- Mula, R. V., Bhatia, V., and Falzon, M. 2010. PTHrP promotes colon cancer cell migration and invasion in an integrin  $\alpha 6\beta 4$ -dependent manner through activation of Rac1. *Cancer Lett* 298(1): 119–127.
- Nishihara, M., Ito, M., Tomioka, T., Ohtsuru, A., Taguchi, T., and Kanematsu, T. 1999. Clinicopathological implications of parathyroid hormone-related protein in human colorectal tumours. *J Pathol* 187(2): 217–222.
- Nishihara, M., Kanematsu, T., Taguchi, T., and Razzaque, M.S. 2007. PTHrP and Tumorigenesis: Is

- There a Role in Prognosis? *Ann N Y Acad Sci* 1117(1): 385–392.
- Okada, M. 2012. Regulation of the Src Family Kinases by Csk. *Int J Biol Sci* 8(10): 1385–1397.
- Osaki, M., Oshimura, M., and Ito, H. 2004. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 9(6): 667–676.
- Paillas, S., Boissiere, F., Bibeau, F., Denouel, A., Mollevi, C., Causse, A., Denis, V., Vezzio-Vie, N., Marzi, L., Cortijo, C., Ait-Arsa, I., Askari, N., Pourquier, P., Martineau, P., Del Rio, M., and Gongora, C. 2011. Targeting the p38 MAPK Pathway Inhibits Irinotecan Resistance in Colon Adenocarcinoma. *Cancer Res* 71(3): 1041–1049.
- Pandurangan, A.K. 2013. Potential targets for prevention of colorectal cancer: a focus on PI3K/Akt/mTOR and Wnt pathways. *Asian Pac J Cancer Prev* 14(4): 2201–5.
- Parsons, S.J., and Parsons, J.T. 2004. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 23(48): 7906–7909.
- Paul, I., Bhattacharya, S., Chatterjee, A., and Ghosh, M.K. 2013. Current Understanding on EGFR and Wnt/ -Catenin Signaling in Glioma and Their Possible Crosstalk. *Genes Cancer* 4(11–12): 427–446.
- Peng, H., Dara, L., Li, T.W.H., Zheng, Y., Yang, H., Tomasi, M.L., Tomasi, I., Giordano, P., Mato, J.M., and Lu, S.C. 2013. MAT2B-GIT1 interplay activates MEK1/ERK 1 and 2 to induce growth in human liver and colon cancer. *Hepatology* 57(6): 2299–2313.
- Pioszak, A.A., Parker, N.R., Gardella, T.J., and Xu, H.E. 2009. Structural Basis for Parathyroid Hormone-related Protein Binding to the Parathyroid Hormone Receptor and Design of Conformation-selective Peptides. *J Biol Chem* 284(41): 28382–28391.
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., and Seger, R. 2011. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1813(9): 1619–1633.
- Pysz, M.A., Hao, F., Hizli, A.A., Lum, M.A., Swetzig, W.M., Black, A.R., and Black, J.D. 2014. Differential Regulation of Cyclin D1 Expression by Protein Kinase C and Signaling in Intestinal Epithelial Cells. *J Biol Chem* 289(32): 22268–22283.
- Rizk-Rabin, M., Assie, G., Rene-Corail, F., Perlemoine, K., Hamzaoui, H., Tissier, F., Lieberherr, M., Bertagna, X., Bertherat, J., and Bouizar, Z. 2008. Differential Expression of Parathyroid Hormone-Related Protein in Adrenocortical Tumors: Autocrine/Paracrine Effects on the Growth and Signaling Pathways in H295R Cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(9): 2275–2285.

- De Rosa, M., Pace, U., Rega, D., Costabile, V., Duraturo, F., Izzo, P., and Delrio, P. 2015. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncol Rep*.
- Saif, M.W., and Chu, E. 2010. Biology of Colorectal Cancer. *Cancer J* 16(3): 196–201.
- Samatar, A.A., and Poulidakos, P.I. 2014. Targeting RAS–ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 13(12): 928–942.
- Sastre-Perona, A., Riesco-Eizaguirre, G., Zaballos, M.A., and Santisteban, P. 2016.  $\beta$ -catenin signaling is required for RAS-driven thyroid cancer through PI3K activation. *Oncotarget* 7(31): 49435–49449.
- Scaglione-Sewell, B., Abraham, C., Bissonnette, M., Skarosi, S.F., Hart, J., Davidson, N.O., Wali, R.K., Davis, B.H., Sitrin, M., and Brasitus, T.A. 1998. Decreased PKC- $\alpha$  expression increases cellular proliferation, decreases differentiation, and enhances the transformed phenotype of CaCo-2 cells. *Cancer Res* 58(5): 1074–1081.
- Schlüter, K.-D. 1999. PTH and PTHrP: Similar Structures but Different Functions. *News Physiol Sci* 14: 243–249. Available from
- Sen, B., and Johnson, F.M. 2011. Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers. *J Signal Transduct* 2011: 1–14.
- Shen, X., and Falzon, M. 2005. PTH-related protein enhances LoVo colon cancer cell proliferation, adhesion, and integrin expression. *Regul Pept* 125(1–3): 17–27.
- Shen, X., Rychahou, P.G., Evers, B.M., and Falzon, M. 2007. PTHrP increases xenograft growth and promotes integrin  $\alpha 6\beta 4$  expression and Akt activation in colon cancer. *Cancer Lett* 258(2): 241–252.
- Soki, F.N., Park, S.I., and McCauley, L.K. 2012. The multifaceted actions of PTHrP in skeletal metastasis. *Futur Oncol* 8(7): 803–817.
- Soucek, L., Whitfield, J., Martins, C.P., Finch, A.J., Murphy, D.J., Sodik, N.M., Karnezis, A.N., Swigart, L.B., Nasi, S., and Evan, G.I. 2008. Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. *Nature* 455(7213): 679–683.
- Soubrier, C., and Massfelder, T. 2006. Parathyroid hormone-related protein in human renal cell carcinoma. *Cancer Lett* 240(2): 170–182.
- Steeg, P.S. 2016. Targeting metastasis. *Nat Rev Cancer* 16(4): 201–218.
- Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Kempf, C.R., Long, J., Laidler, P., Mijatovic, S., Maksimovic-Ivanic, D., Stivala, F., Mazzarino, M.C., Donia, M., Fagone, P., Malaponte, G., Nicoletti,

- F., Libra, M., Milella, M., Tafuri, A., Bonati, A., Bäsecke, J., Cocco, L., Evangelisti, C., Martelli, A.M., Montalto, G., Cervello, M., and McCubrey, J.A. 2011. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)* 3(3): 192–222.
- Steinberg, S.F. 2012. Cardiac Actions of Protein Kinase C Isoforms. *Physiology* 27(3): 130–139.
- Stewart, A.F., Cain, R.L., Burr, D.B., Jacob, D., Turner, C.H., Hock, J.M., and Drezner, M.K. 2000. Six-Month Daily Administration of Parathyroid Hormone and Parathyroid Hormone-Related Protein Peptides to Adult Ovariectomized Rats Markedly Enhances Bone Mass and Biomechanical Properties: A Comparison of Human Parathyroid Hormone 1-34, Parathyroid Hormo. *J Bone Miner Res* 15(8): 1517–1525.
- Tariq, K., and Ghias, K. 2016. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med* 13(1): 120–35.
- Thorpe, L.M., Yuzugullu, H., and Zhao, J.J. 2014. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer* 15(1): 7–24.
- Tovar Sepulveda, V.A., and Falzon, M. 2002. Parathyroid hormone-related protein enhances PC-3 prostate cancer cell growth via both autocrine/paracrine and intracrine pathways. *Regul Pept* 105(2): 109–20. Available from
- Trump, D.L., Hershberger, P.A., Bernardi, R.J., Ahmed, S., Muindi, J., Fakh, M., Yu, W.-D., and Johnson, C.S. 2004. Anti-tumor activity of calcitriol: pre-clinical and clinical studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89–90: 519–526.
- Valenta, T., Hausmann, G., and Basler, K. 2012. The many faces and functions of  $\beta$ -catenin. *EMBO J* 31(12): 2714–2736.
- Vanhaesebroeck, B., Stephens, L., and Hawkins, P. 2012. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(3): 195–203.
- Verheyen, E.M., and Gottardi, C.J. 2009. Regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by protein kinases. *Dev Dyn*: NA-NA.
- Vivanco, I., and Sawyers, C.L. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2(7): 489–501.
- Walsh, C.A., Bowler, W.B., Bilbe, G., Fraser, W.D., and Gallagher, J.A. 1997. Effects of PTH on PTHrP Gene Expression in Human Osteoblasts: Up-Regulation with the Kinetics of an Immediate Early Gene. *Biochem Biophys Res Commun* 239(1): 155–159.

- Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., and Kerr, D. 2009. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 9(7): 489–499.
- Wang, Q., Li, N., Wang, X., Kim, M.M., and Evers, B.M. 2002. Augmentation of sodium butyrate-induced apoptosis by phosphatidylinositol 3'-kinase inhibition in the KM20 human colon cancer cell line. *Clin Cancer Res* 8(6): 1940–7.
- Watson, P.H., Fraher, L.J., Hendy, G.N., Chung, U.-I., Kiesel, M., Natale, B. V., and Hodsman, A.B. 2000. Nuclear Localization of the Type 1 PTH/PTHrP Receptor in Rat Tissues. *J Bone Miner Res* 15(6): 1033–1044.
- Wooten, M.W., Vandenplas, M.L., Seibenhener, M.L., Geetha, T., and Diaz-Meco, M.T. 2001. Nerve Growth Factor Stimulates Multisite Tyrosine Phosphorylation and Activation of the Atypical Protein Kinase C's via a src Kinase Pathway. *Mol Cell Biol* 21(24): 8414–8427.
- Wu, B., Zhou, H., Hu, L., Mu, Y., and Wu, Y. 2013. Involvement of PKC $\alpha$  activation in TF/VIIa/PAR2-induced proliferation, migration, and survival of colon cancer cell SW620. *Tumor Biol* 34(2): 837–846.
- Wysolmerski, J.J. 2012. Parathyroid Hormone-Related Protein: An Update. *J Clin Endocrinol Metab* 97(9): 2947–2956.
- Yang, P., Wang, J., Wang, Y., Jan, W., Cheng, S., and Hsu, Y. 2016. 1,6-Bis[4-(4-amino-3-hydroxyphenoxy)phenyl] diamantane potentiates *in vitro* and *in vivo* antitumor effects of irinotecan on human colorectal cancer cells. *Oncol Lett*.
- Yang, Y. 2012. Wnt signaling in development and disease. *Cell Biosci* 2(1): 14.
- Yeaman, T.J. 2004. A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* 4(6): 470–480.
- Young, M.A., Gonfloni, S., Superti-Furga, G., Roux, B., and Kuriyan, J. 2001. Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation. *Cell* 105(1): 115–26.
- Yuan, T.L., and Cantley, L.C. 2008. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27(41): 5497–5510.
- Zehorai, E., Yao, Z., Plotnikov, A., and Seger, R. 2010. The subcellular localization of MEK and ERK—A novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. *Mol Cell Endocrinol* 314(2): 213–220.
- Zhang, Y., Liu, S., Wang, H., Yang, W., Li, F., Yang, F., Yu, D., Ramsey, F. V., Tuszynski, G.P., and Hu,

W. 2015. Elevated NIBP/TRAPPC9 mediates tumorigenesis of cancer cells through NF&#amp;kappa;B signaling. *Oncotarget* 6(8): 6160–6178.