

32. Salud Humana

Acción del análogo tumoral de PTH (PTHrP) en la regulación de factores asociados al fenotipo invasivo y a la angiogénesis en células de cáncer de colon humano

Carriere, P; Riquelme, AN; Novoa Díaz, MB; Calvo N¹; Gentili C¹

pm_carriere@hotmail.com

1. Orientadores-Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur (INBIOSUR)

Universidad Nacional del Sur

Resumen

El péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) está implicado en varios cánceres humanos, entre los que se encuentra el cáncer colorrectal (CCR). Esta patología implica varios procesos, como mayor supervivencia celular, proliferación, migración, invasión, transición epitelio-mesenquimática (TEM) y angiogénesis. Previamente encontramos que PTHrP induce la proliferación, supervivencia y migración de células Caco-2 y HCT116, dos líneas celulares de tumores de colon humano. La invasión celular durante la progresión del cáncer se ha asociado a la pérdida de características epiteliales, la remodelación de la matriz extracelular, y el desarrollo de vascularización, por lo que abordar estos procesos es de relevancia para entender el rol de PTHrP en la enfermedad y constituye el objetivo de este trabajo. Se observó que el tratamiento con PTHrP 10^{-8} M en estas células aumenta los niveles de ARNm de la metaloproteinasa de la matriz 7 (MMP-7) y la expresión proteica de la proteína ácida y rica en cisteína SPARC, dos proteínas que participan en la reestructuración del estroma y que están fuertemente implicadas en la invasión tumoral. Además el tratamiento con PTHrP disminuyó los niveles proteicos de citoqueratina-18 (CK-18) un marcador epitelial asociado con TEM mediante Western blot e Inmunocitoquímica. Los niveles del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), del factor inducible por hipoxia 1α (HIF- 1α) y de la metaloproteinasa de la matriz 9 (MMP-9) por RT-qPCR mostraron que PTHrP aumenta la transcripción de estos factores implicados en la angiogénesis tumoral. Estos resultados sugieren un nuevo rol de PTHrP en la regulación de fenómenos asociados a un fenotipo más agresivo de células derivadas de cáncer colorrectal.

Palabras clave: PTHrP, cáncer, invasión, transición epitelio-mesenquimática, angiogénesis

Introducción

El análogo tumoral de PTH (PTHrP) fue originalmente identificado como el agente causal de hipercalcemia humoral, uno de los síndromes más frecuentes paraneoplásicos. Actualmente se sabe que se produce normalmente en muchos tejidos y que actúa de manera endócrina, paracrina, autocrina e inclusive intracrina, siendo su modo de acción paracrino el más frecuente (Maioliet *et al.*, 2004; McCauley y Martin, 2012). PTHrP sufre un amplio proceso postraduccional para generar varias formas secretadas que parecen actuar a través de uno o más receptores distintos de la superficie celular. Se ha demostrado que los genes que codifican para PTHrP y para RPTH1 están expresados en el epitelio de las vellosidades intestinales (Watson *et al.*, 2000), lo que sugiere que en el intestino PTHrP ejercería un papel regulador local a través de una vía autocrina/paracrina. Las investigaciones de la última década argumentan en forma favorable el rol de PTHrP como factor bioactivo en la iniciación, el crecimiento y la invasión de varios carcinomas expresándose en diferentes tumores de órganos como mama, próstata, pulmón, riñón, piel, estómago y colon, y estimulando la adhesión, migración, proliferación y/o apoptosis, tanto *in vitro* como *in vivo* (Soki

et al., 2012).

Según el Instituto Nacional del Cáncer de Argentina, el cáncer colorrectal (CCR) es el segundo cáncer más frecuente en Argentina causando en 2015, 7603 muertes, el 12% del total de muertes por tumores malignos y esta cifra va en aumento. Su patogénesis y progresión implica varios procesos, incluyendo la supervivencia celular, proliferación, transición epitelio-mesenquimática (TEM), migración, invasión y angiogénesis (Sever y Brugge, 2015). La invasión del cáncer requiere de las características propias de las células tumorales y de la presencia de varios factores de crecimiento del microambiente celular, tales como PTHrP. Se observó que la expresión de PTHrP se correlaciona con la gravedad y metástasis del carcinoma de colon (Soki *et al.* 2012).

En el laboratorio donde se desarrolló este trabajo se observó la localización y expresión del RPTH1 en las líneas celulares Caco-2 (Calvo *et al.*, 2009) y HCT116 (Calvo *et al.*, 2014). Se demostró que PTHrP exógeno favorece la supervivencia, la progresión del ciclo celular e incrementa la proliferación de estas células (Lezcano *et al.*, 2013; Calvo *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2014). La respuesta de estas células a PTHrP es mediada por las vías de señalización de

Erk 1/2, p38 MAPK y PI3K/Akt. Datos obtenidos mediante el ensayo de cierre de la "herida" y cámaras de filtro Transwell, indican que el tratamiento con PTHrP promueve además la migración de las células Caco-2. El péptido aumenta la expresión proteica de la quinasa de adhesión focal (FAK), que está involucrada en procesos de migración celular, e induce la fosforilación de la serina/treonina quinasa S6 ribosomal (RSK), una enzima implicada en la migración, la invasión y la metástasis tanto *in vitro* como *in vivo*. La migración celular y los cambios de la expresión de FAK y de la fosforilación de RSK inducidos por la hormona son dependientes de Erk1/2 MAPK pero independientes de p38 MAPK. Los mismos resultados se obtuvieron en la línea celular intestinal HCT116 (Calvo *et al.*, 2017).

Objetivos

Investigar los efectos de PTHrP sobre la regulación de factores asociados a la invasión y transición epitelio-mesenquimática. En la invasión tumoral la degradación de la membrana basal y luego de la matriz extracelular (MEC) subyacente al epitelio se desarrolla principalmente a través de quinasas proteolíticas, tales como las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y noveles factores remodeladores de la

matriz extracelular como SPARC (Kim *et al.*, 2013). Se plantea la posibilidad de que PTHrP 10^{-8} M regule la transcripción de MMP-7, que esta sobre-expresada en el 80% de pacientes con CCR (Brabletz *et al.*, 1999), y la expresión proteica de SPARC por RT-PCR y por Western blot, respectivamente, en las líneas celulares Caco-2 y HCT116. Para adoptar el fenotipo invasivo las células epiteliales deben incrementar su capacidad migratoria y modificar su morfología proceso conocido como Transición epitelio-mesenquimática (TEM) en el cual las células pierden sus características epiteliales y adquieren propiedades mesenquimales (Chou *et al.*, 2015). Se ha reportado que la sobreexpresión de PTHrP induce TEM en células de cáncer de próstata (Ongkeko *et al.*, 2014), en células renales (Ardura *et al.*, 2010) y recientemente asociándose a fibrosis por enfermedad de Crohn en células intestinales (He *et al.*, 2018). Con el fin de investigar el rol de PTHrP en la regulación del proceso de TEM en células tumorales intestinales, las células Caco-2 y HCT116 fueron expuestas al péptido y luego se evaluó la expresión por la técnica de Western blot e Inmunocitoquímica del marcador epitelial Citoqueratina 18, cuya disminución, previa a la pérdida de E-caderina, se reconoce como un indicador de plasticidad fenotípica asociada a TEM (Serrano *et al.*, 2016).

Evaluar la acción de PTHrP sobre marcadores asociados a la angiogénesis tumoral. El proceso de invasión contribuye a la liberación de factores involucrados en la progresión tumoral, por ejemplo esta ampliamente reportado que la MMP-9 posee una actividad directa en la que degrada la membrana basal permitiendo la proliferación y migración de las células tumorales y que además puede actuar a través de mecanismos indirectos desencadenando un cambio estructural que libera al VEGF de la matriz (Araujo *et al.*, 2015). VEGF queda así disponible para interactuar con el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) y activar la angiogénesis en el tumor (Hubbard *et al.*, 2010). Por otro lado, bajo altas tasas de proliferación y en respuesta a la consecuente baja de concentración de oxígeno en los tejidos, las células tumorales intentan restaurar la homeostasis a través de la activación de un sistema regulador central para la hipoxia, compuesto de factores inducibles por hipoxia (HIF). El factor de transcripción HIF-1 alfa además de intervenir en cambios metabólicos protumorales regula genes implicados en los procesos anteriores, promoviendo la expresión de VEGF (Cao *et al.*, 2009). Para investigar el rol de PTHrP (1-34) 10^{-8} M en la modulación de estos factores pro-angiogénicos se plantea el análisis

mediante RT-PCR del ARNm de MMP-9, HIF-1 alfa y VEGF para revelar si el análogo podría promover la transcripción de factores asociados a la angiogénesis mediante una acción paracrina.

Materiales y Métodos

Cultivo y tratamiento de las líneas celulares intestinales humanas células Caco-2 y HCT116

Las células de colon humano Caco2 y HCT 116 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE. UU.) se cultivaron a 37°C, bajo atmósfera de 5,5% de CO₂ 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), estreptomina (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^{-8} M) durante distintos tiempos. Esta dosis de exposición se seleccionó porque previamente se estudiaron los efectos de PTHrP (1-34) 10^{-8} mol / l en células Caco2 y células HCT 116 que expresan el receptor PTH / PTHrP.

Análisis de Western Blot

Las células se lavaron con PBS con NaF 25 mM y Na₃VO₄ 1 mM, y se lisaron en

buffer que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, KCl 3 mM, 1 mM EDTA, 1% de Tween-20, 1% de Nonidet P-40, 20 µg / ml de aprotinina, 20 µg / ml de leupeptina, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 25 mM de NaF y 1 mM de Na₃VO₄. Los lisados se incubaron en hielo durante 10 minutos, se agitaron en vórtex durante 45 s, y se mantuvieron en hielo durante otros 10 minutos. Después de la centrifugación a 14000 g y 4 ° C durante 15 minutos, el sobrenadante se recogió y las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford, 1976). Las proteínas de lisado disueltas se separaron (30 µg / carril) usando geles de SDS-poliacrilamida (8-10% de acrilamida) y electrotransferidas a membranas de PVDF. Después de bloquear con 5% de leche descremada en buffer TBS-T (Tris 50 mM, pH 7,2-7,4, NaCl 200 mM, Tween-20 al 0,1%), las membranas se incubaron durante la noche con la dilución apropiada de anticuerpo primario (CK 1:500; SPARC 1:500) en TBS-T con 2,5% de albumina bovina (BSA). Después del lavado, las membranas se incubaron con la dilución apropiada de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano en TBS-T con leche descremada al 1%. Finalmente fueron incubadas con un kit comercial de electroquimioluminiscencia (ECL) y expuestas a placas radiográficas GE Healthcare Amersham Hype-rfilm para

visualizar las proteínas de interés. Las bandas obtenidas fueron digitalizadas densitométricamente y cuantificadas usando el programa Image J.

Inmunocitoquímica

Las células sembradas sobre cubreobjetos y tratadas con la hormona 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 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 a los fluoróforos Cy3 (dilución 1:200) o Alexa Fluor 594 (dilución 1:200) durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Se efectuaron tres nuevos lavados con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. Los anticuerpos primarios y secundarios fueron preparados en PBS conteniendo 2 ó 5% de BSA. Se aplicó 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI), un fluoróforo que se une al ADN (dilución 1:500) durante los últimos 30 minutos de incubación con el 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 confocal láser de barrido (Leica TCS SP2 AOBS).

Aislamiento de ARN y síntesis de cDNA

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 (cantidad de ARN $\mu\text{g/ml} = 40 \times \text{DO } 260\text{nm} \times \text{factor de dilución}$). 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 retro-transcripción 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". El ADNc obtenido, correspondiente a cada condición, se almacenó a -20°C hasta su utilización.

RT-PCR cuantitativa en tiempo real

La reacción de PCR se llevó a cabo en un

sistema de PCR en tiempo real (Applied Biosystems, modelo 7500). Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

5'-AGATGTG-GAGTGCCAGATGT-3'

(forward) y

5'-TAGACTGCTACCATCCGTCC-3'

(reverse) para MMP-7;

5'-CACCTCTGGACTTGCCTTTC-3'

(forward) y

5'-GGCTGCATCTCGAGACTTTT-3'

(reverse) para HIF-1 α ;

5'-TGCAGATTATGCGGATCAAACC-3'

(forward) y

5'-TGCATTACATTTGTTGTGCTGTAG-

3' (reverse) para VEGF;

5'-CCTTCACTTTCCTGGGTAAG-3'

(forward) y

5'-CCATTCACGTCGTCCTTATG-3'

(reverse) para MMP-9;

5'-ACCACAGTCCATGCCATCA-3'

(forward) y

5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

(reverse) para GAPDH. Las reacciones de PCR se prepararon utilizando SYBR Green master mix (Applied Biosystems). En hielo, se agregaron los siguientes: 5 μL de 2 \times SYBR verde 0,8 μL de cebador directo (400 nM), 0,8 μL de cebador reverse (400 nM), 2 μL de ADNc molde (10 ng), 1,4 μL de agua estéril. El ADNc de GAPDH se amplificó en paralelo para que todos los genes proporcionaran un control de PCR interno apropiado. Para cada experimento, una reacción no formulada, donde se agregó agua como

muestra, sirvió como control negativo. El número de ciclos (CT) para cada gen de interés (VEGF, HIF-1 α , MMP-9) se calculó a partir de triplicado de mediciones, Δ CT se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación: Δ CT = CT del gen de interés - CT GAPDH. Los niveles de ARNm se calcularon de acuerdo con el método 2- Δ CT.

Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó en planillas de cálculo Excel. Se utilizó el análisis t de student's para comparación de medias, obteniendo el grado de significancia de las diferencias, *p<0,01 altamente significativo, *p < 0,05 significativo.

Resultados y Discusión

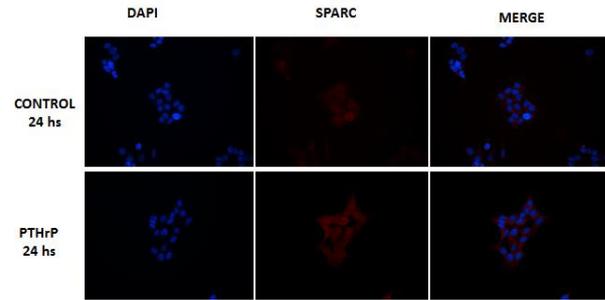
PTHrP modula factores que participan en la invasión y la transición epitelio-mesenquimática

Para el estudio de los tres marcadores de interés mencionados, las células derivadas de CCR fueron tratadas con o sin PTHrP 10⁻⁸ M a diferentes tiempos y luego se evaluaron sus niveles de expresión mediante las técnicas que seguidamente se describen. Mediante RT-qPCR se observó tanto en las células Caco-2 como HCT116 un aumento significativo de los niveles de ARNm de MMP-7 inducido por la hormona a las 20 horas de tratamiento (Fig.1a). Mediante la técnica de Western Blot se evidenció un aumento de la expresión proteica de

SPARC a las 24 horas del tratamiento con PTHrP (Fig.1b). Por inmunocitoquímica se observó un aumento en la intensidad de marcación de SPARC en las células expuestas a PTHrP respecto al control. Más allá de que esta proteína es secretada a la matriz extracelular, en la imagen se puede observar que se encuentra a nivel del citoplasma (Fig.1c). Como esta técnica se llevó a cabo en la línea celular HCT116, que es una línea más agresiva que la línea Caco-2, entonces luego se procedió a investigar si la agresividad de las líneas determinan la expresión diferencial de este marcador. Resultados preliminares sugieren que las células Caco-2 expresan un nivel casi indetectable de SPARC y no se identificaron cambios bajo el efecto de PTHrP, lo que coincide con lo hallado por otros trabajos (Kim et al., 2013). Por otro lado, se sabe que SPARC se sobreexpresa en tumores altamente metastásicos (Kim et al., 2013) mientras que es baja o indetectable en tipos menos metastásicos. Estudios recientes muestran que la expresión de SPARC en los tejidos de CCR es significativamente elevada en comparación con los tejidos colorrectales normales y el silenciamiento de SPARC en células de CCR podría disminuir la capacidad de invasión e inhibir la expresión de factores implicados en la TEM (Shen et al., 2016).

Posteriormente se continuará explorando

si en estas líneas tumorales intestinales SPARC está asociada a los complejos de adhesión focal regulada por integrina, en la cual vimos que PTHrP ejerce una regulación positiva sobre la expresión de FAK (resultados obtenidos durante mi tesina de grado). Este aspecto es parte de la colaboración activa que estamos desarrollando con el grupo de investigación del Laboratorio de Oncología Celular y Molecular (LOCyM), del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), de la Universidad de Chile.

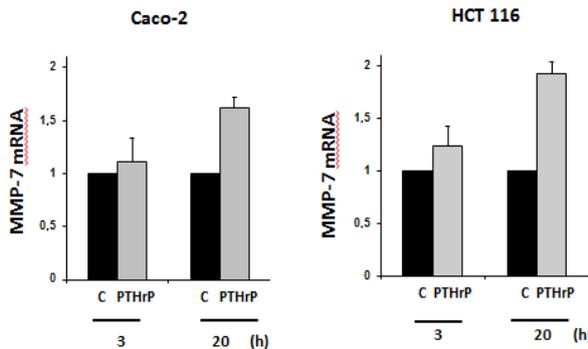


2a

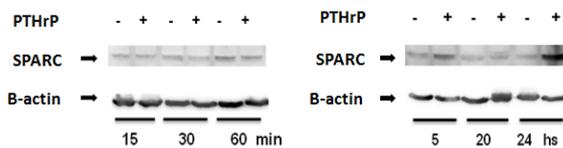
Figura 1. El tratamiento con PTHrP aumenta los niveles de ARNm de MMP-7 y la expresión proteica de SPARC en células de CCR, ambos factores implicados en la invasión tumoral. Las células se trataron con o sin PTHrP 10-8 mol / L y los marcadores de invasión celular se evaluaron analizando: los niveles de MMP-7 por RT-qPCR (a) y los niveles proteicos de SPARC por Western-blot (b) e inmunocitoquímica (c).

Como se mencionó, la invasión celular además involucra cambios drásticos en la morfología celular como la pérdida de interacciones célula-célula, de la polaridad ápico-basal y una drástica reorganización del citoesqueleto. Así, el cambio del fenotipo epitelial a mesenquimal se caracteriza por la aparición o la pérdida de un grupo de proteínas que han llegado a ser reconocidos como marcadores del proceso de TEM, siendo uno de ellos la disminución Citoqueratina 18 (CK-18) un filamento intermedio presente en células epiteliales. Mediante la técnica de Western blot se observó que el tratamiento con PTHrP tanto a las 5 como a las 24 horas en la línea celular HCT116

1a



1b



1c

disminuye los niveles proteicos de CK-18 con respecto al control (Fig.2a). Estos resultados fueron confirmados mediante inmunocitoquímica (Fig.2b). Resultados obtenidos en las células Caco-2 muestran esta misma disminución pero solo a las 24 hs de tratamiento con el péptido. La disparidad en este resultado entre estas dos líneas celulares remarca la diferencia fenotípica en ambas, específicamente en su agresividad.

PTHrP 10^{-8} mol / L y se evaluó la TEM analizando los niveles de proteína de CK-18 mediante (a) Western-blot y (b) inmunocitoquímica.

La disminución de CK-18 se ha encontrado como un marcador de la etapa inicial de la TEM interactuando con TGF- β , previo a la disminución de E-caderina en cáncer de mama (Jung et al., 2016). Resultados preliminares muestran que el análogo tiene un efecto sobre el marcador E-caderina el cual experimenta una disminución a las 5 hs de tratamiento con PTHrP 10^{-8} M lo que se corresponde a su vez con una disminución al mismo tiempo de tratamiento en la expresión de ZEB1. Zeb1 es un factor de estabilidad fenotípica y represor transcripcio-nal de E-caderina lo que plantea la posibilidad de que PTHrP regule el programa E-caderina-Zeb1, reconocido regulador central de TEM, y la necesidad de nuevos abordajes para revelar su total participación en este proceso.

PTHrP modula la transcripción de mediadores de la angiogénesis

Un mal pronóstico en la patología tumoral es la angiogénesis asociada al tumor lo que resulta en una mayor progresión de la enfermedad y la resistencia a los tratamientos. Diversos estudios señalan como los tejidos tumorales presentan una mayor vascularización en comparación con los tejidos normales y se está ampliamente reportado que este proceso

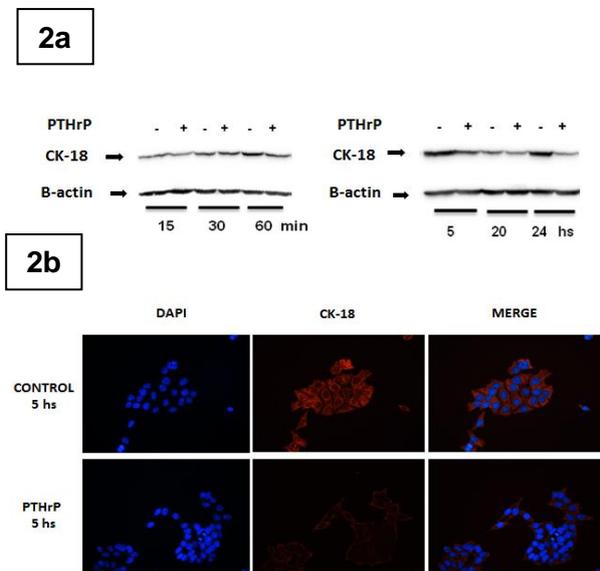


Figura 2. PTHrP modula la expresión proteica de CK-18, siendo su disminución asociada con el progreso del proceso TEM. Las células se trataron con o sin

provee de mayor aporte de nutrientes y oxígeno, además de facilitar la invasión de las células tumorales promoviendo la diseminación a órganos distantes. Sin embargo la inducción de este proceso en CCR no se encuentra completamente entendido (Cao et al., 2009; Hubbard et al., 2010). Mediante qRT-PCR se evidenció que el tratamiento con la hormona por 20 horas regula la expresión de VEGF en las células Caco-2 y HCT116. También se observó mediante la misma técnica que la hormona aumenta los niveles de ARNm de HIF-1 α y MMP-9 en estas células tumorales intestinales (Fig.3).

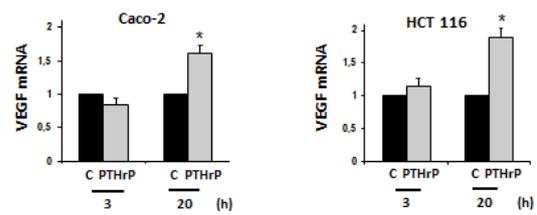
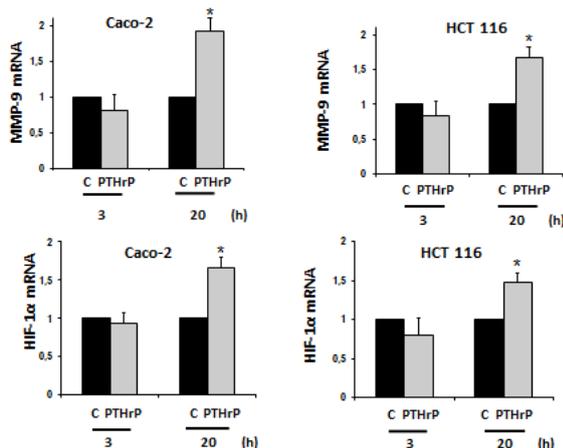


Figura 3. PTHrP aumenta los niveles de ARNm de MMP-9, HIF-1 α y VEGF, factores implicados en la angiogénesis. Las células se trataron con o sin PTHrP 10⁻⁸ mol / L y los niveles de estos factores pro-angiogénicos se analizaron mediante RT-qPCR.

Se ha visto que PTHrP (1-36) promueve la expresión del gen de VEGF en osteoblastos (Es-brit et al., 2000) y que VEGF podría actuar como mediador de algunas de las acciones de PTHrP en estas células (de Gortazaret al., 2010). Otro estudio resalta que PTHrP (1-36) induce la expresión de VEGF y de su receptor en la fibrogénesis de células renales (Ardura et al., 2008). Como se observa, PTHrP incrementa la transcripción de HIF-1 alfa a las 20 hs de tratamiento, que como se mencionó es un factor que induce la expresión de VEGF como respuesta a la hipoxia. Sin embargo, el efecto observado en este trabajo sugiere también una posible participación de la hormona en este proceso a través de la inducción de la expresión de VEGF en similar magnitud por parte de las células de ambas líneas tumorales derivadas de CCR, lo que plantea la necesidad de profundizar en los aspectos que orquestan el proceso angiogénico

3



modulado por PTHrP.

Conclusiones

Considerando los resultados previos de que PTHrP 10⁻⁸ M activa las vías de señalización de las MAPK y PI3K / Akt, y modula la migración celular en las líneas celulares tumorales intestinales humanas Caco-2 y HCT116, se procedió a abordar su potencial como regulador de factores involucrados en la invasión y la angiogénesis, dos eventos para los cuales las células adoptan capacidad migratoria. En función de los objetivos de este trabajo se encontró que el tratamiento con PTHrP 10⁻⁸ M exógeno aumenta la transcripción de MMP-7 y la expresión proteica de SPARC a las 20 y 24 hs respectivamente. Además, la hormona disminuye la expresión proteica del marcador epitelial CK-18 y aumenta la transcripción de los factores pro-angiogénicos MMP-9, HIF-1 alfa y VEGF. De esta forma el estudio de la actividad pleiotrópica de PTHrP en las distintas etapas del cáncer colorrectal es un objetivo de investigación cuyo desarrollo probablemente arroje nuevas perspectivas en la terapéutica de la enfermedad.

Bibliografía

Araujo, RF., Lira, GA., Vilaca, JA., Guedes, HG., Leitao, MC., Lucena, HF. y Ramos CC. (2015). Prognostic and diagnostic implications of MMP-2, MMP-9,

and VEGF- α expressions in colorectal cancer. *Pathol Res Pract.* 211(1), 71-77.

Ardura, JA., Berruguete, R., Rámila, D., Alvarez-Arroyo, MV. y Esbrit P. (2008). Parathyroid hormone-related protein interacts with vascular endothelial growth factor to promote fibrogenesis in the obstructed mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 295(2), F415-25

Ardura, JA., Rayego-Mateos, S., Rámila, D., Ruiz-Ortega, M. y Esbrit P. (2010). Parathyroid hormone-related protein promotes epithelial-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol.* 21(2), 237-248.

Brabletz, T., Jung, A., Dag, S., Hlubek, F., y Kirchner T. (1999). beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol.* 155(4), 1033-1038.

Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248.

Calvo, N., Carriere, P., Martin, MJ. y Gentili, C. (2017). RSK activation via ERK modulates human colon cancer cells response to PTHrP. *J Mol Endocrinol.* 59(1), 13-27.

Calvo, N., German, O., Russo de Boland, A. y Gentili C. (2009). Pro-apoptotic

effects of parathyroid hormone in intestinal cells. *Biochem Cell Biol.* 87(2), 389-400.

Calvo, N., Martin, MJ., Russo de Boland A. y 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.

Cao, D., Hou, M., Guan, Y., Jiang, M., Yang, Y. y Gou H. (2009). Expression of HIF-1 α and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications. *BMC Cancer.* 9,432.

Chou, YS. y Yang, MH. (2015). Epithelial-mesenchymal transition-related factors in solid tumor and hematological malignancy. *J Chin Med Assoc.* 78, 438.

deGortazar, AR., Alonso ,V., Alvarez-Arroyo, MV. Y Esbrit P.(2006). Transient exposure to PTHrP (107-139) exerts anabolic effects through vascular endothelial growth factor receptor 2 in human osteoblastic cells in vitro. *Calcif Tissue Int.* 79(5),360-369.

Esbrit, P., Alvarez-Arroyo, MV., De Miguel, F., Martin, O., Martinez, ME., y Caramelo C. (2000). C-terminal parathyroid hormone-related protein increases vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells. *J Am*

SocNephrol. 11(6),1085-92.

He, S., Xue, M2., Liu, C3., Xie, F1. y Bai, L4. (2018). Parathyroid Hormone-Like Hormone Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Intestinal Epithelial Cells by Activating the Runt-Related Transcription Factor 2. *Am J Pathol.* 188(6), 1374-1388.

Hubbard, J. y Grothey, A. (2010). Antiangiogenesis agents in colorectal cancer. *Curr Opin Oncol.* 22(4), 374-80

Jung, H., Kim, B., Moon, BI., Oh, ES. (2016). Cytokeratin 18 is necessary for initiation of TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in breast epithelial cells. *Mol Cell Biochem.* 423(1-2), 21-28.

Kim, JY., Jeong, D., Ahn, TS., Kim, HJ., Park, DS., Park, SY., y Bae, SB. (2013). Expression of Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine in the Stroma of a Colorectal Carcinoma is Associated With Patient Prognosis. *Ann Coloproctol.* 29(3), 93-9

Lezcano, V., Gentili, C. y Russo de Boland, A. (2013). Role of PTHrP in human intestinal Caco-2 cell response to oxidative stress. *BiochimBiophysActa.* 1833(12), 2834-2843.

Maioli, E., Fortino, V., Torricelli, C., Arezzini, B. y Gardi, C. (2002). Effect of parathyroid hormone-related protein on

fibroblast proliferation and collagen metabolism in human skin. *ExpDermatol.* 11(4), 302-310.

Martin, MJ., Calvo, N., Russo de Boland, A. y Gentili, C. (2014). Molecular mechanisms associated with PTHrP-induced proliferation of colon cancer cells. *J Cell Biochem.* 115(12), 2133-2145.

McCauley, L. y Martin, J. (2012). Twenty-five years of PTHrP progress: from cancer hormone to multifunctional cytokine. *J Bone Miner Res.* 27(6), 1231-1239.

Ongkeko, WM., Burton, D., Kiang, A., Abhold, E., Kuo, SZ., Rahimy, E.,... Deftos, LJ. (2014). Parathyroid hormone related-protein promotes epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer. *PLoSOne.* 9(1), e85803.

Serrano-Gomez, SJ., Maziveyi, M., y Alahari, SK. (2016). Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Mol Cancer.* 15,18.

Sever, R. y Brugge, JS. (2015). Signal transduction in cancer. *Cold Spring HarbPerspect Med.* 5 (4).

Shen, C., Yan, T., Chen, H., Fang, J. y Hong, J. (2016). Expression of SPARC in colorectal cancer and mechanisms of its effects on cancer cell invasion. *Journal of Shanghai Jiaotong University.* 36(8), 1127-1134.

Soki NF., En Park, S. y McCauley, KL. (2012). The multifaceted actions of PTHrP in skeletal metastasis. *Future Oncol.* 8(7), 803-817.

Watson, PH., Fraher, LJ., Hendy, GN., Chung, UI., Kiesel, M., Natale, BV. yHodsman, AB. (2000). Nuclear localization of the type 1 PTH/PTHrP receptor in rat tissues. *J BoneMiner Res.* 15(6), 1033-1044.

Agradecimientos

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), Argentina.

