

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EFFECTOS DE CALCITRIOL Y D,L-BUTIONINA-S,R-
SULFOXIMINA SOBRE LAS CÉLULAS CACO-2 EN CULTIVO**

por

Microbióloga Ana Cecilia Liaudat

Directora: Dra. Gabriela Picotto

Co-Directora: Prof. Dra. Nori Tolosa de Talamoni

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Metabolismo Fosfocálcico y
Vitamina D “Dr. Fernando Cañas”**

Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias Médicas

Universidad Nacional de Córdoba

Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA)

CONICET-UNC

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

2014

COMISIÓN ASESORA

Prof. Dr. Daniel Masco, Centro de Biología Celular y Molecular, Facultad de Cs. Exactas, Físicas y Naturales, Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIBYT). CONICET-Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.

Prof. Dra. María Angélica Perillo, Cátedra de Química Biológica, Departamento de Química, Facultad de Cs. Exactas, Físicas y Naturales, Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIBYT). CONICET-Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.

Dra. Gabriela Picotto, Lab. de Metabolismo Fosfocálcico y Vitamina D “Dr. Fernando Cañas”. Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Médicas. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA). CONICET-Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

Dedico esta Tesis

a mi FAMILIA

Agradecimientos

A Dios por regalarme la vida y la posibilidad de concretar este objetivo.

A mi Directora y Codirectora de Tesis Dras. Gabriela Picotto y Nori Tolosa de Talamoni por aceptarme en el laboratorio, por dirigir este trabajo, por brindarme sus enseñanzas, experiencias y confianza.

A los miembros de la Comisión Asesora, Dr. Daniel Mascó y Dra. María Angélica Perillo por sus aportes, seguimiento constante y evaluación crítica.

A la Dra. Nelia Gerez de Burgos, por permitirme comenzar a desarrollar este trabajo de Tesis Doctoral en la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular.

A mis compañeras de Laboratorio Dr. Fernando Cañas, Vanessa Areco, Ágata Carpentieri, Viviana Centeno, Gabriela Díaz de Barboza, Solange Guizzardi, Ana María Marchionatti, María Elena Peralta López, Adriana Pérez, María Angélica Rivoira y Valeria Rodríguez por todos los buenos momentos compartidos y ayuda permanente.

A mi amiga Luciana Bohl por todo este tiempo de trabajo en equipo, por su dedicación, esfuerzo y cariño.

A todos mis compañeros de Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular por su ayuda y buena predisposición.

A mi familia y a Lázaro, a quienes amo profundamente, por su apoyo incondicional.

A toda la “gente linda” que me abrieron las puertas de sus corazones y me acompañaron durante estos años en Córdoba.

A la Universidad Nacional de Córdoba, por permitir mi formación en el área de las Ciencias Biológicas.

Durante el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral se publicaron los siguientes artículos científicos:

- ✚ Oxidative Stress, Cell Cycle Arrest and Differentiation Contribute to the Antiproliferative Action of BSO and Calcitriol on Caco-2 Cells. Liaudat AC, Bohl LP, Tolosa de Talamoni NG, Maletto B, Pistoiresi-Palencia MC, Picotto G. *Anticancer Drugs*, en prensa, 2014.

- ✚ Buthionine Sulfoximine and 1,25-Dihydroxyvitamin D Induce Apoptosis in Breast Cancer Cells via Induction of Reactive Oxygen Species. L P. Bohl, A C. Liaudat, G Picotto, A M. Marchionatti, C J. Narvaez, J Welsh, V A. Rodriguez, N G. Tolosa de Talamoni. *Cancer Investigation*, 30:560-570, 2012.

- ✚ Molecular aspects of vitamin D anticancer activity. G Picotto, A C. Liaudat, L Bohl, N Tolosa de Talamoni. *Cancer Investigation*, 30:604-614, 2012.

El trabajo de esta **Tesis Doctoral** se realizó con aportes recibidos de la Secretaría de Ciencia y Tecnología (SECyT-UNC), Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Presidencia de la Nación) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y las becas de doctorado de FONCyT, SECyT, CONICET e Instituto Nacional del Cáncer.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	1
ABREVIATURAS	4
RESUMEN	8
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN.....	12
VITAMINA D	13
Síntesis, metabolismo y acción de la Vitamina D	13
Mecanismo de acción del calcitriol	15
Epidemiología del cáncer de colon	16
Acciones no clásicas de la vitamina D ₃	17
Vitamina D y Cáncer.....	18
Diferenciación celular y cáncer.....	19
Agentes oxidantes	20
Defensa celular contra el estrés oxidativo.....	22
Causas y consecuencias del daño producido por estrés oxidativo	25
Estructuras celulares blanco del ataque por las especies oxidantes	26
Procesos fisiológicos alterados por especies oxidantes.....	28
Bcl-2, molécula clave en la supervivencia celular y blanco terapéutico potencial .	30
Estrés oxidativo, ¿posible tratamiento contra el cáncer?	30
OBJETIVOS.....	33
OBJETIVO GLOBAL	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
I. Cultivo de células	36
II. Ensayo de densidad celular	36
III. Morfología celular	36
IV. Análisis del ciclo celular.....	36
V. Análisis de núcleos celulares en mitosis.....	37
Evaluación del estado redox celular	37

I. Análisis de los niveles de O_2^-	37
II. Preparación de extractos celulares	38
III. Cuantificación de GSH total	38
IV. Medición del sistema enzimático antioxidante	38
V. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial	39
Evaluación de eventos que intervienen en la muerte celular	39
I. Externalización de fosfatidilserina (FS)	39
II. Fragmentación de ADN	39
III. Expresión génica de <i>Bcl-2</i>	39
Evaluación de la diferenciación celular	41
I. Actividad enzimática	41
II. Análisis de los niveles de ARNm de Fosfatasa Alcalina por RT-PCR	41
Evaluación de la migración celular	42
VI. Ensayo de la herida	42
VII. Análisis estadístico	42
RESULTADOS	43
EFFECTOS DE CALCITRIOL Y BSO SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS CACO-2	44
Perfil temporal y de dosis	44
EFFECTO DE CALCITRIOL Y BSO SOBRE EL CICLO Y LA DIVISIÓN CELULAR DE LAS CÉLULAS CACO-2	51
EFFECTO DE CALCITRIOL Y BSO SOBRE EL ESTADO REDOX Y EL SISTEMA ENZIMÁTICO ANTIOXIDANTE DE LAS CÉLULAS CACO-2	54
EFFECTO DE CALCITRIOL Y BSO SOBRE EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL DE LAS CÉLULAS CACO-2	59
EFFECTO DE CALCITRIOL Y BSO SOBRE LA MUERTE CELULAR DE LAS CÉLULAS CACO-2	61
EFFECTOS DE CALCITRIOL Y BSO SOBRE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR DE LAS CÉLULAS CACO-2	65
EFFECTO DE CALCITRIOL Y BSO SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR DE LAS CÉLULAS CACO-2	67
EFFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR PROVOCADA POR BSO Y CALCITRIOL	69

EFECTO DE CALCITRIOL Y BSO SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE OTRAS LÍNEAS CELULARES EPITELIALES DE CÁNCER DE COLON, MAMA Y LARINGE	71
DISCUSIÓN	74
CONCLUSIÓN	82
BIBLIOGRAFÍA	84

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Fig. 1. Metabolismo de la vitamina D, síntesis y degradación de su metabolito más activo, el 1,25(OH) ₂ D ₃	14
Fig. 2. Estructura química de la molécula de calcitriol	16
Fig. 3. Síntesis del glutatión, enzimas intervinientes y reacción de óxido-reducción.....	23
Fig. 4. Estructura química de la molécula de Butionina Sulfoximina.....	32
Fig. 5. Perfil temporal del efecto de BSO y/o calcitriol sobre la proliferación celular ...	45
Fig. 6. Perfil de dosis de BSO sobre la proliferación celular en ausencia y presencia de calcitriol	46
Fig. 7. Perfil dosis de calcitriol sobre la proliferación celular en ausencia y presencia de BSO	47
Fig. 8. Perfil temporal de los efectos de calcitriol y BSO sobre la proliferación celular.	48
Fig. 9. Efecto de BSO y calcitriol sobre la proliferación celular.....	49
Fig. 10. Efecto de BSO y calcitriol sobre la morfología celular.	50
Tabla 1. Efecto de BSO y calcitriol sobre el ciclo celular.....	52
Fig. 11. Efecto de BSO y calcitriol sobre la división celular	53
Fig. 12. Efecto de BSO y calcitriol sobre el contenido de anión superóxido.....	54
Fig. 13. Efecto de BSO y calcitriol sobre los niveles de GSH intracelular.	56
Fig. 14. Efecto de BSO y calcitriol sobre la actividad de SOD.....	57
Fig. 15. Efecto de BSO y calcitriol sobre la actividad de CAT.....	58
Fig. 16. Efecto de calcitriol y de BSO sobre el potencial de membrana mitocondrial....	60
Fig. 17. Efecto de BSO y calcitriol sobre la externalización de fosfatidilserina.	62
Fig. 18. Efecto de BSO y calcitriol sobre la fragmentación del ADN nuclear	63

Fig. 19. Efecto de BSO y calcitriol sobre los niveles de ARNm del gen <i>Bcl-2</i>	64
Fig. 20. Efecto de BSO y calcitriol sobre la actividad de FAL.	65
Fig. 21. Efecto de BSO y calcitriol sobre los niveles de ARNm del gen <i>FAL</i>	66
Fig. 22. Efecto de BSO y calcitriol sobre la migración celular.	68
Fig. 23. Efecto del ácido ascórbico sobre la inhibición de la proliferación celular producida por BSO + calcitriol	70
Fig. 24. Efecto de BSO y calcitriol sobre la proliferación celular de células de cáncer de colon, mama y laringe.	72
Fig. 25. Resumen de los efectos del BSO + calcitriol sobre las células Caco-2	73

ABREVIATURAS

ADNc: ácido desoxirribonucleico copia.

ANOVA: análisis de la varianza.

ARNasa: enzima ribonucleasa.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ASB: albúmina sérica bovina.

AZA: azatriopina.

Bcl-2: proteína 2 de linfoma de células B.

BSO: DL-butionina-S,R-sulfoximina.

CAT: catalasa.

CB: calbindina.

CO₂: dióxido de carbono.

Ct: ciclo umbral.

D: 1,25(OH)₂D₃, calcitriol.

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenolindoldiclorhidrato.

DiOC₆: 3,3'ioduro de di-hexyloxacarbocianina.

DMEM: medio Eagle modificado de Dulbecco.

DTNB: ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico).

dUTP: 2'-deoxiuridina-5'-trifosfato.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

ERN: especies reactivas del nitrógeno.

ERO: especies reactivas del oxígeno.

FAL: fosfatasa alcalina.

FITC: isotiocianato de fluoresceína.

FS: fosfatidil serina.

Grx: glutarredoxina.

GSH: glutatión.

GSSG: glutatión oxidado.

H₂O₂: anión superóxido.

MEK: Proteínas kinasas activadas por mitógeno.

MEM: Medio Esencial Mínimo

MEN: menadiona.

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida.

NaF: fluoruro de sodio.

NBT: nitroazul de tetrazolio.

NOX: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa.

$\cdot\text{O}_2^-$: anión superóxido.

$\cdot\text{OH}$: radical oxidrilo.

ON: óxido nítrico.

PARP: proteína reparadora de daños producidos al ADN.

PBS: solución salina tamponada con fosfato.

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

pRb: proteína de retinoblastoma.

RT: transcripción reversa.

RVD: receptor de la vitamina D.

RXR: receptor del ácido retinoico.

SFB: suero fetal bovino.

SOD: superóxido dismutasa.

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta.

Trx: tiorredoxina.

TUNEL: marcación de los extremos libres del ADN con dUTP mediada por desoxi-transferasa terminal.

Vit C: vitamina C, ácido ascórbico.

$\Delta\psi_m$: potencial de membrana mitocondrial.

25(OH)D₃: calcidiol.

RESUMEN

Numerosos estudios epidemiológicos sugieren que la vitamina D y su metabolito activo, el 1,25(OH)₂D₃ o calcitriol, disminuyen el riesgo de contraer cáncer de colon. Por otro lado, la resistencia de los tumores a los diferentes tratamientos suele estar asociada a elevados niveles de glutatión. En consecuencia, la inclusión de drogas que disminuyen este tripéptido, tal como D,L-butionina-S,R-sulfoximina (BSO), aumentan la sensibilidad de las células tumorales a los tratamientos convencionales. El objetivo de este trabajo fue estudiar los mecanismos desencadenados por calcitriol y BSO sobre la proliferación de las células Caco-2 en cultivo. Los resultados muestran que el calcitriol y el BSO inhibieron la proliferación de todas las líneas celulares tumorales de origen epitelial evaluadas, efecto que fue más pronunciado con el tratamiento combinado. En las células Caco-2, el efecto antiproliferativo provocado por calcitriol + BSO está mediado por alteraciones del sistema redox celular, arresto del ciclo celular e inducción de la diferenciación celular. El agregado al medio de cultivo de ácido ascórbico, potente antioxidante, inhibió el efecto antiproliferativo producido por la combinación de drogas. En conclusión, BSO incrementa la inhibición de la proliferación celular producida por calcitriol y sensibiliza a las células Caco-2 a la muerte celular. El incremento de la diferenciación celular sugiere que el calcitriol induce un fenotipo celular menos agresivo.

ABSTRACT

Epidemiological studies suggest that vitamin D and its active metabolite 1,25(OH)₂D₃ or calcitriol, decrease colon cancer risk. Furthermore, the resistance of tumors to treatments is associated with high levels of glutathione (GSH). Consequently, the inclusion of drugs that decrease GSH as D,L-buthionine-S,R-sulfoximine (BSO), may increase cell sensitivity to conventional treatments. The aim of this study was to clarify the mechanisms triggered by calcitriol and BSO on Caco-2 cell proliferation. The results show that BSO and calcitriol inhibited cell proliferation of other epithelial cancer cell lines tested, and this effect was more pronounced with the combined treatment. Particularly, in Caco-2 cells, the antiproliferative effect caused by calcitriol *plus* BSO is produced by alterations in cellular redox system, cell cycle arrest and cell differentiation induction. The addition to the culture medium of ascorbic acid, a powerful antioxidant, inhibited the effect produced by the combined treatment. In conclusion, BSO increases the antiproliferative action produce by the combined treatment and sensitizes the Caco-2 cells to cell death. The increase in cell differentiation suggests that calcitriol induces a cellular phenotype less aggressive than that of the untreated cells.

INTRODUCCIÓN

VITAMINA D

El $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o calcitriol es el metabolito activo de mayor acción biológica de la vitamina D_3 . Su principal función es la regulación de la homeostasis del calcio y fósforo ejerciendo su acción a nivel de hueso, intestino, riñón y glándulas paratiroides (van Leeuwen y col., 2005). El calcitriol aumenta la absorción intestinal de estos iones para mantener sus concentraciones sanguíneas normales y proveer suficiente cantidad de minerales a los huesos y órganos que los requieren. Por otro lado, existen evidencias que sugieren que el $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ posee efectos antiproliferativos, pro-diferenciales, antiinflamatorios e inmunomoduladores, los cuales ponen de manifiesto el amplio abanico de acción de la vitamina D (Krishnan y col., 2011).

Síntesis, metabolismo y acción de la Vitamina D

En la naturaleza existen dos moléculas precursoras de la vitamina D, en organismos vegetales el ergosterol da origen a la vitamina D_2 y en tejidos animales el 7-deshidrocolesterol se transforma en vitamina D_3 . Ambos compuestos son pro hormonas sin actividad biológica que deben sufrir modificaciones químicas que los convierta en productos funcionales. Para satisfacer los requerimientos de vitamina D es necesario una buena ingestión y exposición del cuerpo a la luz solar. Cuando la piel es expuesta al sol, la radiación ultravioleta B activa la síntesis de colecalciferol a partir del 7-deshidrocolesterol en un proceso de conversión fotoquímica. La primera etapa en la activación de la vitamina D se cumple en el hígado, cuando por la acción de la enzima colecalciferol-25-hidroxilasa (*CYP27A1*) se genera $25(\text{OH})\text{D}_3$ (calcidiol). A pesar de que posee menor actividad biológica que el calcitriol, este metabolito es el indicador del estado nutricional de vitamina D debido a su prolongada vida media (2 - 3 semanas vs calcitriol 2 - 4 h). Luego el calcidiol es transportado por proteínas fijadoras de vitamina D hacia los riñones donde sufre otra hidroxilación por acción de la enzima 1α hidroxilasa (*CYP27B1*) y se transforma en el metabolito activo y de mayor acción biológica, el $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Deeb y col., 2007), ver Fig. 1.

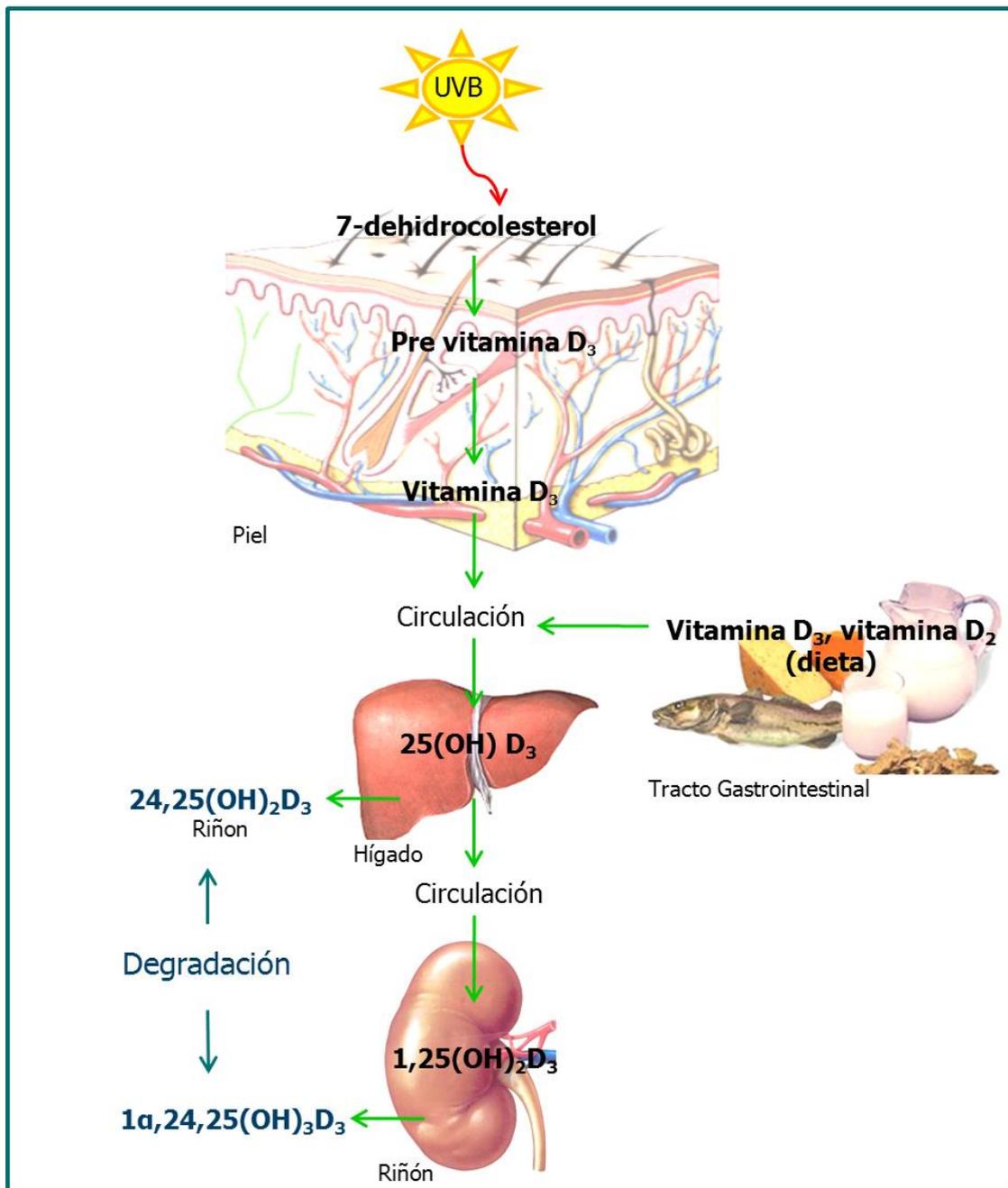


Fig. 1: Metabolismo de la vitamina D, síntesis y degradación de su metabolito más activo, el 1,25(OH)₂D₃. La síntesis del calcitriol comienza en la piel cuando el 7-deshidrocolesterol es convertido en pre vitamina D₃ por acción de los rayos UV-B. Posteriormente, la pre vitamina D₃ es transformada en vitamina D₃, por medio de cambios en la isomería de la molécula precursora. Debido a su naturaleza química esteroidea, la vitamina D₃ requiere de la unión a proteínas transportadoras presentes en el sistema circulatorio para ser distribuida a los diferentes tejidos. En el hígado, la vitamina D₃ es hidroxilada por la enzima 25-hidroxilasa y es transformada en 25(OH)D₃. Este último metabolito sufre una segunda hidroxilación en riñón, reacción que sintetiza el 1,25(OH)₂D₃, molécula de mayor actividad biológica derivada de la vitamina D. En

las etapas claves del catabolismo del esteroide participa la 24-hidroxilasa (*CYP24A1*) que transforma al $25(\text{OH})\text{D}_3$ y al $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ respectivamente, moléculas de menor actividad biológica.

Numerosos roles fisiológicos de la Vitamina D se han descrito en las últimas décadas. Stumpf y col. (1979), demostraron que células provenientes del corazón, estómago, páncreas, colon, cerebro, piel y gónadas, expresan el receptor nuclear de unión específica al $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, llamado receptor de vitamina D (RVD). Muchos de los tejidos que expresan el RVD, también poseen la enzima 1α hidroxilasa, encargada de convertir el $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en su metabolito activo.

Debido a su amplio rango de acción se vincula la deficiencia de vitamina D con la patogénesis y progresión de varias enfermedades, como hipertensión, esclerosis múltiple, diabetes, osteoporosis y cáncer (Cross, 2011). Estudios recientes realizados en distintas poblaciones, muestran relación inversa entre los niveles séricos del secoesteroide y el desarrollo de patologías como la enfermedad arterial periférica (Chua y col., 2011) y el cáncer de colon, próstata y mama (Garland y col., 2009). Debido a que también se han descrito efectos benéficos del calcitriol sobre el control de enfermedades relacionadas con el sistema cardiovascular e inmune (Raman y col., 2011), esta molécula se ha convertido en un metabolito de gran importancia para el desarrollo de nuevas terapias.

Mecanismo de acción del calcitriol

El $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ penetra la membrana plasmática sin necesidad de moléculas transportadoras gracias a sus propiedades liposolubles (Fig. 2). Una vez en el citoplasma, el calcitriol se une al RVD e induce en él un cambio conformacional que le permite unirse al receptor del ácido retinoico (RXR) y formar un heterodímero. Posteriormente, el complejo se asocia a moléculas coactivadoras, las cuales poseen capacidad de modificar la cromatina y atraer factores de transcripción al promotor de genes blanco. Estas regiones son llamadas elementos de respuesta a la vitamina D, lugar génico donde numerosos activadores y represores ejercen su función.

El calcitriol posee también efectos moduladores independientes de su receptor nuclear, ya que regula la expresión de varios genes que no poseen la secuencia de unión

a RVD en sus promotores (Deeb y col., 2007). Haciendo referencia a estas observaciones, Costa y col. (2009) describieron que la inhibición de la proliferación celular provocada por el calcitriol sobre células de cáncer de mama MCF-7 es independiente de la unión del $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a su receptor nuclear.

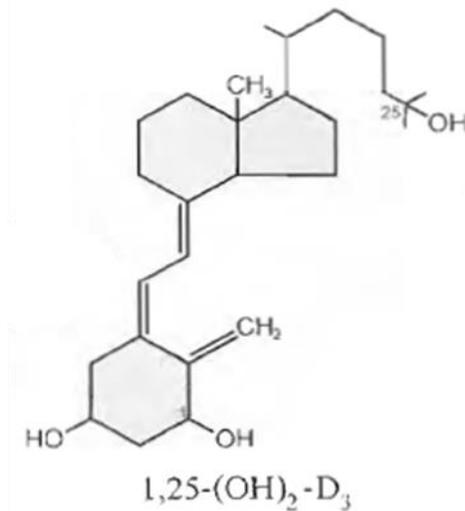


Fig. 2: Estructura química de la molécula de calcitriol.

Epidemiología del cáncer de colon

El cáncer colorrectal es una de las principales causas de muerte por tumores malignos en todo el mundo y su tratamiento quimioterapéutico es tema de intenso estudio (www.who.int, 2013). Como nuestro país no escapa a la realidad internacional, según datos proporcionados por el Ministerio de Salud de la Nación, esta enfermedad es la segunda causa de muerte por tumores malignos en ambos sexos (www.msal.gov.ar, 2013).

En las últimas décadas, el metabolito activo de la vitamina D_3 se ha utilizado en numerosos ensayos clínicos para el control de varios tipos de cáncer. Los estudios se efectuaron con diferentes esquemas y formas de administración, encontrándose en la mayoría de ellos, alteraciones en el metabolismo del calcio, puesto de manifiesto por hipercalcemia e hipercalciuria (www.clinicaltrials.gov, 2013). Es por ello que más recientemente, se han desarrollado análogos de la vitamina D que conservan las propiedades antiproliferativas y evitan sus efectos adversos.

Acciones no clásicas de la vitamina D₃

En los últimos años se han descrito numerosas acciones no clásicas de la vitamina D₃, entre ellas la modulación del crecimiento y adhesión celular, el arresto del ciclo celular, la inducción de diferenciación y muerte celular (apoptosis y autofagia) y la inhibición de la angiogénesis, entre otros (Chung y col., 2007). Los efectos antiproliferativos se observaron en diferentes tipos celulares tanto benignos como malignos. El-Domyati y col. (2007) describieron que personas enfermas de psoriasis tratadas con calcipotriol (análogo de la vitamina D₃) muestran disminución del crecimiento celular en las zonas hiperproliferativas, efecto que es dependiente de p53 y Bcl-2 (proteína 2 de linfoma de células B). El calcitriol, también afecta el crecimiento de células derivadas de tumores pancreáticos (Chiang y col., 2009), intestinales (Scaglione-Sewell, 2000), mama (Costa y col., 2009; Bohl y col., 2012), próstata (Chen y col., 2011) y piel (Ishibashi y col., 2012).

El arresto del ciclo celular provocado por este metabolito sobre células de cáncer de próstata, se debe al incremento de los inhibidores de kinasas dependientes de ciclina (p21^{waf/Cip1} y p27^{kip1}), a la disminución de la actividad de Kinasa 2 dependiente de ciclina y a la hipofosforilación de la proteína de retinoblastoma (pRb) (Krishnan y col., 2011). Estas modificaciones provocadas por el 1,25(OH)₂D₃ impiden el pasaje de fase G₁ a S del ciclo celular, proceso dependiente de TGF-β (Scaglione-Sewell y col., 2000). La diferenciación celular también es modificada por acción del calcitriol debido a que promueve la expresión de marcadores de diferenciación celular como la enzima fosfatasa alcalina y la proteína cadherina-E involucrada en la adhesión celular (Koren y col., 2006).

En cuanto a la muerte por apoptosis, el calcitriol induce clivaje de caspasa 3 (caspasa efectora), de PARP (proteína reparadora de daños producidos al ADN) y de MEK (Proteína kinasa kinasa activada por mitógeno, molécula promotora del crecimiento celular) en células derivadas de adenocarcinoma de próstata y de carcinoma escamoso (Trump y col., 2011). Estos hallazgos pre clínicos fueron los precursores del potencial uso del calcitriol y de sus moléculas derivadas para el tratamiento contra el cáncer.

Vitamina D y cáncer

La incidencia y el pronóstico de cáncer de colon están en estrecha relación con los niveles plasmáticos de 25(OH)D₃, metabolito indicador del estado nutricional de vitamina D. Estudios epidemiológicos sugieren que altas concentraciones de calcidiol están asociadas con menor riesgo de contraer cáncer de colon, ya que se ha estimado que un incremento en suero de 25 nmoles de 25(OH)D₃/l reduce la incidencia de esta enfermedad en un 17% y la mortalidad en un 29% (Moan y col., 2007). Holt y col. (2006), demostraron que el tratamiento con calcio + vitamina D de pacientes con adenomas rectales disminuyó la proliferación adenomatosa en comparación al grupo control. En este sentido, un aumento de 20 ng/ml en los niveles de 25(OH)D₃ reduce el riesgo de contraer cáncer de recto en un 59% y de colon en un 22% (Yin y col., 2009).

Con el objetivo de desarrollar tratamientos anticancerosos cada vez más selectivos, en los últimos años numerosos trabajos han profundizado los estudios sobre las posibles vías metabólicas que distinguen a una célula normal de una maligna. En este sentido, el tratamiento con calcitriol de fibroblastos asociados a cáncer de mama provoca una regulación negativa de genes relacionados con la proliferación. En cambio, en células de mama normal, el secoesteroide produjo regulación positiva de genes que intervienen en la detoxificación y protección contra estrés oxidativo (Campos y col. 2013). Similarmente, se observó efecto selectivo en células de cáncer de próstata debido a que el calcitriol protegió al fenotipo no maligno de la muerte celular producida por H₂O₂ mediante la inducción de la transcripción de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, enzima antioxidante. Sin embargo, en células de próstata malignas, el calcitriol actuó como molécula pro oxidante debido a que las respuestas de detoxificación en este tipo celular están alteradas. La dualidad existente en estos efectos puede deberse a que en células normales el calcitriol induce levemente estrés oxidativo, el cual estimula los mecanismos de detoxificación celular y prepara a las células para futuros daños producidos por agentes oxidantes (Bao y col. 2008).

Diferenciación celular y cáncer

La diferenciación celular se refiere al grado en el cual las células neoplásicas se asemejan a las normales, tanto morfológica como funcionalmente. La ausencia de diferenciación, también denominado anaplasia se considera un marcador de malignidad. Los tumores indiferenciados generalmente poseen un gran número de mitosis, reflejando así la mayor actividad proliferativa. Además de las anomalías citológicas, la orientación de las células está marcadamente alterada, ya que crecen de forma desorganizada. Otra característica es la formación de células tumorales de gran tamaño, algunas de las cuales poseen un núcleo polimórfico y otras, varios núcleos hipercromáticos grandes (Robbins y col., 2011).

Diversos eventos bioquímicos están involucrados en la diferenciación celular. Se ha comprobado que durante este proceso moléculas marcadoras como la enzima fosfatasa alcalina y sacarasa isomaltosa aumentan su actividad. Paralelamente también ocurren cambios morfológicos durante este proceso como el aumento en la cantidad de uniones estrechas, adherentes y desmosomas (Cosentino y col., 2010).

Las células Caco-2, derivadas de adenocarcinoma de colon humano, es una línea celular con capacidad de diferenciar espontáneamente en cultivo, mostrando características estructurales y bioquímicas similares a enterocitos maduros (Giuliano y col., 1991). Una vez alcanzada el estado de confluencia, la membrana celular presenta características de borde apical en cepillo expresando altos niveles de fosfatasa alcalina, sacarasa e isomaltasa, todas ellas enzimas marcadoras de diferenciación celular (Halline y col., 1994). Recientemente, un estudio realizado en células Caco-2 demostró que el aumento de la diferenciación está relacionado con el incremento en la expresión de moléculas proteicas involucradas en el metabolismo de lípidos, drogas y xenobióticos. De igual modo, proteínas asociadas con el crecimiento, la proliferación y la invasión celular se encuentran reguladas negativamente en las células con menor grado de anaplasia (Buhrke y col., 2011). Gauthier y col. (2001), demostraron que la sensibilidad de una variante de la línea Caco-2 (Caco-2/15, secretora de bajos niveles de factores de crecimiento) a la muerte celular programada está en relación directa con la diferenciación celular.

ESTRÉS Y DAÑO OXIDATIVO

En 1985, H. Sies propuso el concepto de “estrés oxidativo” y lo definió como el desbalance existente entre los agentes oxidantes y antioxidantes en comparación con una situación definida como normal (Boveris, 2005). A continuación se detallan las moléculas responsables de estimular el ambiente celular “oxidado” y las encargadas de proteger a las células de los daños ocasionados por los agentes oxidantes.

Agentes oxidantes

Especies reactivas del oxígeno (ERO)

Las especies reactivas del oxígeno y las del nitrógeno (ERN), poseen roles duales sobre la fisiología celular ya que tienen capacidad de estimular e inhibir procesos de importancia biológica. Dichos agentes pueden actuar también como segundos mensajeros formando parte de vías de señalización intracelular mediante la inducción y el mantenimiento del fenotipo celular canceroso. Por otro lado, están involucradas en la activación de la senescencia, en la muerte celular y en la regulación del desarrollo de células cancerosas actuando como especies antitumorales (Valko y col., 2006). Entre las ERO más importantes podemos destacar:

- Anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$): es la principal especie reactiva del oxígeno primaria, formada a partir de la reducción molecular simple del oxígeno. Entre el 1-5 % del total de oxígeno consumido por tejidos normales se puede transformar en $\cdot\text{O}_2^-$, siendo las mitocondrias el mayor sitio intracelular de producción de este anión bajo condiciones no inflamatorias. Otra característica a tener en cuenta de esta especie es que en pH fisiológicos, dismuta rápidamente a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) + O_2 y no atraviesa las membranas biológicas.
- Peróxido de hidrógeno: Los sistemas que producen $\cdot\text{O}_2^-$, también generan H_2O_2 . Esta molécula tiene habilidad para reaccionar con metales iónicos parcialmente reducidos como el hierro (Fe^{+2}) o el cobre. La reactividad del H_2O_2 es moderada debido a que no

reacciona espontáneamente con moléculas compuestas de carbonos centrales o tioles; sin embargo, se combina rápidamente con metales de transición y tiolatos (Koren y col., 2005).

- Radical oxidrilo ($\cdot\text{OH}$): intervienen en la modificación de varios procesos celulares como la inactivación de la enzima mitocondrial piruvato deshidrogenasa, la polimerización de la mucina gastrointestinal y la integridad del ADN.
- Ácido hipocloroso: es un agente con 100-1000 veces más toxicidad que $\cdot\text{O}_2$ y H_2O_2 debido a que su acción alcanza varios niveles. Por ejemplo, es capaz de inactivar enzimas esenciales, modificar sus actividades, oxidar grupos tioles de las membranas celulares, como así también alterar las propiedades adhesivas de algunos componentes de la matriz extracelular (Kruidenier y col, 2002).

Especies reactivas del nitrógeno

De manera similar a las ERO, las ERN incluyen a los compuestos óxido nítrico (ON) y peroxinitrito. En 1998, los científicos estadounidenses F. Munrad, L. Ignarro y R. Furchgott obtuvieron el premio Nobel de Medicina y Fisiología por el descubrimiento del ON como molécula señalizadora en el sistema cardiovascular (www.nobelprize.org). Esta especie es liposoluble y tiene alta capacidad de difundir desde el lugar de su síntesis hasta su sitio blanco. El ON está involucrado en múltiples procesos que incluyen desde la regulación de la vasodilatación hasta la inhibición del crecimiento tumoral (Burke y col., 2013).

El anión superóxido puede reaccionar con el óxido nítrico formando peroxinitrito, molécula con mayor capacidad de reacción y de producción de daño celular que su precursor nitrogenado. Mas aún, posee una vida media más prolongada y su paso a través de las membranas lipídicas es más rápido que la del ON (Kruidenier y col., 2002).

Defensa celular contra el estrés oxidativo

La defensa celular contra los agentes oxidantes está a cargo de moléculas no enzimáticas como el glutatión (GSH) y de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT).

■ Antioxidantes no enzimáticos

El intestino contiene y produce gran variedad de defensas antioxidantes que incluyen compuestos hidrosolubles como GSH, metalotioneína, vitamina C (ácido ascórbico), ácido úrico y moléculas liposolubles como α -tocofenol (vitamina E), bilirrubina y ubiquinona (coenzima Q₁₀ reducida).

- GSH: es una de las moléculas más importantes del sistema de defensa antioxidante. Químicamente es un tripéptido compuesto por glutamato, glicina y cisteína. Este último aminoácido le otorga la capacidad de defensa contra las especies oxidantes mediante el poder reductor del grupo sulfhidrilo que contiene su estructura. Además de ser sustrato de la enzima glutatión peroxidasa, secuestra ERO, peroxinitritos e hidroperóxidos lipídicos (Kruidenier y col., 2002). En el núcleo, el GSH está involucrado en el mantenimiento del estado redox de proteínas necesarias para la reparación y expresión del material genético. Participa también en el control del ciclo celular debido a que son necesarias adecuadas cantidades de GSH para el progreso de las distintas fases del ciclo celular. En el citoplasma, interviene en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática y participa en la regeneración de antioxidantes importantes como las vitaminas C y E (Valko y col., 2006). El GSH es el producto de síntesis de dos reacciones dependientes de ATP, el primer paso es catalizado por la enzima γ -glutamilcisteína ligasa y el segundo por la glutatión sintetasa (Fig. 3). El glutatión oxidado (GSSG) se reduce por acción de la enzima glutatión reductasa, que utiliza nicotinamina adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como coenzima.

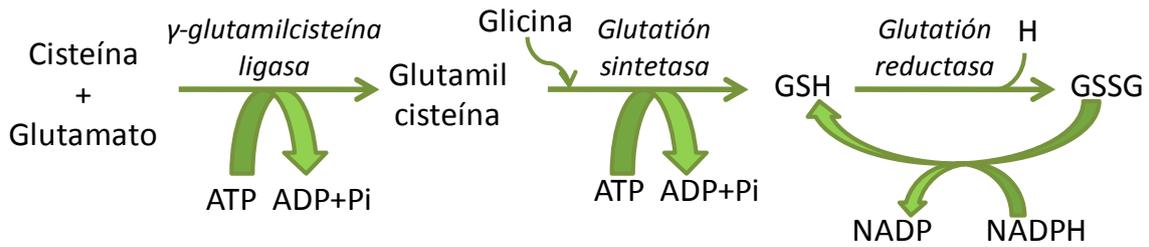


Fig. 3: Síntesis del glutatión, enzimas intervinientes y reacción de óxido-reducción.

- Vitaminas C y E: el ácido ascórbico (vit C) coopera con la vitamina E en la protección de las membranas celulares y de sus lipoproteínas contra los radicales libres. Ambos compuestos funcionan de manera coordinada, ya que la oxidación de la vitamina E por donación de un H a un radical peróxido, produce α tocoferol y este vuelve a su estado reducido por acción del ácido ascórbico (Valko y col., 2006).
- Metalotioneína: es una proteína rica en tioles con capacidad de unión a iones metálicos como el cobre o el zinc. Estas moléculas, que protegen a las células del daño producido por $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 y peroxinitritos, poseen expresión citoplasmática y nuclear (Díaz Vivancos y col., 2010).
- Tiorredoxina (Trx) y glutarredoxina (Grx): son proteínas pequeñas, que al igual que el GSH, poseen capacidad de defensa contra los agentes oxidantes. Ambas moléculas son dependientes de cisteína, reconocen a los grupos disulfuro (SO_3^{2-}) de las proteínas y los reducen con su consecuente oxidación. La diferencia que existe entre ellas radica en las moléculas encargadas de reducir su sitio catalítico, debido a que el agente reductor utilizado por la Trx es la selenoenzima tiorredoxina reductasa, mientras que la Grx requiere de GSH (Giles, 2006).

■ Enzimas antioxidantes

Las enzimas SOD y CAT son la principal defensa antioxidante de las células aerobias contra la toxicidad del oxígeno. El anión $\cdot\text{O}_2^-$ y el H_2O_2 reducen y oxidan respectivamente al hierro que se encuentra distribuido en los sistemas biológicos, generando radicales $\cdot\text{OH}$ como producto de la escisión del H_2O_2 . La formación de

elevadas cantidades de radicales oxidrilos produce anomalías en las biomoléculas celulares y, en consecuencia, fallas en sus funcionamientos (Boveris, 2005).

- Superóxido dismutasa: constituye una de las moléculas más importantes del sistema enzimático antioxidante. Su rol es catalizar rápidamente la reducción del radical superóxido a peróxido de hidrógeno:



En seres humanos, se identificaron 3 isoformas cada una con diferentes componentes y distribuciones. La SOD dependiente de cobre y zinc es el homodímero de mayor abundancia (70%). Se encuentra en varios tipos de epitelios y células fagocíticas y su ubicación es en citoplasma pero está ausente en mitocondrias. Aunque su afinidad por otros sustratos es menor, también puede interaccionar con H₂O₂ y peroxinitrito.

La segunda isoforma más abundante en las células, es la SOD dependiente de manganeso, enzima que se encuentra localizada exclusivamente en mitocondrias y constituye el 15 % de la actividad total de SOD. Interesantemente, se encontró que personas enfermas de cáncer gastrointestinal poseen esta enzima sobreexpresada, razón por la cual en la actualidad, se lo relaciona con mal pronóstico.

La SOD extracelular es la tercer isoforma más recientemente descrita. Es una proteína tetramérica dependiente de cobre y zinc con alta afinidad por los glicosaminoglicanos. Debido a que se encuentra en plasma sanguíneo y en tejido intersticial, está relacionada con la protección del tejido conectivo contra el estrés oxidativo (Kruidenier y col., 2002).

- Catalasa: Es una de las enzimas más eficientes del sistema antioxidante debido a que no es saturada por sustrato (cada CAT puede catalizar la conversión de 6×10^6 moléculas de H_2O_2 a H_2O por min.). Se encuentra principalmente en los peroxisomas (Wijeratne y col., 2005).



- Glutación peroxidasa: existen dos isoformas de la enzima, una dependiente de selenio (GPx) y otra independiente (glutación transferasa). Difieren entre si en la dependencia del mineral, en el número de subunidades y en la reacción que catalizan. Su localización predominante es el citoplasma. En los seres humanos se han descrito 4 isoformas de GPx, todas ellas actúan de manera conjunta con GSH en la conversión de $2 \text{H}_2\text{O}_2$ a $2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Aunque cataliza la misma reacción que CAT, GPx posee mayor afinidad por el sustrato, siendo la enzima antioxidante que mejor protege a las células contra bajos niveles de estrés oxidativo (Wijeratne y col., 2005).

Causas y consecuencias del daño producido por estrés oxidativo

Los principales sitios de producción de ERO son las cadenas transportadoras de electrones presentes en mitocondria y en retículo endoplásmico y el sistema nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NOX) ubicado en la membrana plasmática (Li y col., 2011). La cantidad de ERO producida por las células dependerá del potencial de membrana mitocondrial y del bloqueo de la cadena respiratoria (Giles, 2006). El estrés oxidativo puede producir alteraciones en las distintas biomoléculas y organelas provocando daños en su funcionamiento.

Estructuras celulares blanco del ataque por las especies oxidantes

✚ Material genético: nuclear y mitocondrial

El radical $\cdot\text{OH}$ reacciona con todos los componentes del ADN, dañando las bases púricas, pirimídicas y la molécula de desoxirribosa. Las modificaciones incluyen rupturas simples y dobles de la hebra de ADN, formación de entrecruzamientos inespecíficos y errores en la replicación celular, lo que provoca inestabilidad genómica. Exposiciones permanentes del material genético a estrés oxidativo desencadena mutaciones, envejecimiento y muerte celular. Se han identificados alteraciones en la expresión génica de las secuencias codificantes para los complejos mitocondriales I, III, IV y V producidas por EROs en células humanas de cáncer. Debido a que el 5 % del oxígeno consumido por una célula se transforma en especies reactivas y sumado a la capacidad limitada de reparación del ADN mitocondrial (no está protegido por histonas), estas organelas son uno de los principales blancos del daño ocasionado por los agentes oxidantes (Valko y col., 2006).

✚ Estructura lipídica

Los ácidos grasos poliinsaturados localizados dentro de la bicapa lipídica (fosfolípidos) son los blancos más sensibles al ataque de las ERO, debido a que son particularmente dañados por $\cdot\text{OH}$. Como resultado de la peroxidación producida, se altera la actividad de enzimas transmembrana, transportadores y receptores como así también la permeabilidad y selectividad de las membranas, provocando alteraciones en el volumen celular, en su homeostasis y en su metabolismo (Kruidenier y col., 2002).

✚ Proteínas

Constituyen el componente más abundante de las células y son importantes blancos de ataque por radicales libres. Más aún, pequeñas oxidaciones en proteínas simples pueden provocar grandes modificaciones en sus actividades biológicas. El proceso de oxidación proteica involucra la introducción de grupos funcionales nuevos como hidroxilos y carbonilos, lo que altera su función, recambio y degradación. La

nitración de los residuos tirosina es otra modificación permanente producida en las proteínas por acción de los agentes oxidantes (Kruidenier y col., 2002).

Mitocondrias

Son las organelas celulares encargadas de producir energía mediante fosforilación oxidativa a partir de sustratos carbonados. Asimismo, regulan diferentes procesos como la muerte celular programada (vía activada por alteraciones en la cadena transportadora de electrones), la producción de energía y el incremento del potencial redox celular. Por otra parte, el funcionamiento de estas organelas se modifica por los radicales libres. La formación de canales o poros en las membranas mitocondriales altera su morfología y funcionamiento, la producción de ERO aumenta y, en consecuencia, cambia el potencial de membrana y la producción de ATP. Debido a estas perturbaciones, las proteínas inductoras de muerte se activan y finalmente sobreviene la destrucción celular. Varias enfermedades están relacionadas con el mal funcionamiento de las mitocondrias, como por ejemplo, el glaucoma, la retinopatía diabética, la enfermedad de Parkinson y el Alzheimer entre otras (He y col., 2008). La activación de las proteínas Bax o Bak es un requisito para inducir la permeabilización de la membrana mitocondrial durante la vía intrínseca de la muerte celular por apoptosis. Dicho proceso es provocado por la ruptura de la unión de Bcl-2 (proteína anti-muerte) con Bax, Bak o proteínas de dominio BH-3, causando cambios conformacionales dentro de la membrana externa de la mitocondria que resultan en la formación de poros de transición mitocondrial (Vaquero y col., 2007).

Las ERO también pueden actuar como moléculas transmisoras de señales regulando múltiples vías y, dependiendo del tipo de célula y del ambiente en el cual se encuentran inmersas, en procesos antagónicos como la supervivencia o la muerte celular (Li y col., 2011).

Procesos fisiológicos alterados por especies oxidantes

Ciclo celular

Está comprendido por dos grandes etapas interconectadas entre sí, la interfase y la mitosis. Como resultado del paso de una célula por este proceso ocurre la división celular y la generación de dos células hijas. La interfase se encuentra dividida en diferentes fases, G₀, G₁, S y G₂. Las células que se encuentran quiescentes (G₀) pueden evolucionar al periodo G₁, evento que es dependiente de sustancias mitogénicas y que induce la estimulación de la síntesis de ADN (S). Una vez que los cromosomas se han duplicado correctamente, las células pueden avanzar hacia G₂, donde se prepara para entrar en la división celular (mitosis o meiosis). La progresión a través de las distintas fases del ciclo está bajo la regulación de mecanismos sensores o puntos de control. En enfermedades como el cáncer, donde la proliferación está descontrolada, la mayoría de los puntos de control están suprimidos o ausentes (Casimiro y col., 2012).

El rol de las ERO sobre el control del ciclo celular es controversial. Altos niveles de moléculas oxidantes provocan alteraciones en el ADN, arresto del ciclo celular e inhibición de la síntesis del material genético. Contrariamente, niveles moderados de ERO son necesarias para que una célula pase del estado quiescente (G₀) al proliferativo (G₁) (Días-Moralli y col., 2013). En base a las consideraciones previas numerosos trabajos demuestran modificaciones del ciclo celular producido por agentes oxidantes en células provenientes de distintos tejidos con transformaciones malignas. Odom y col. (2009) demostraron que diferentes fitoquímicos producen arresto del ciclo celular en fase G₂/M en células derivadas de carcinoma de colon humano, efecto que es revertido con el uso de N-acetilcisteína, conocido antioxidante. De manera similar, un trabajo realizado en células de cáncer de colon, páncreas, laringe y pulmón demuestra que el tratamiento con capillina, agente que depleciona GSH, induce arresto celular en fase S+G₂/M (Whelan y col., 2004).

Muerte celular

Existen varios mecanismos por los cuales una célula puede morir, entre los más estudiados se pueden citar a la apoptosis, la autofagia y la necrosis. La inducción de uno de ellos en particular depende de la habilidad celular para enfrentar las condiciones en las cuales está expuesta. El estrés oxidativo es el agente causal de varios tipos de muerte (Fulda y col., 2010).

La apoptosis se caracteriza por redondeamiento celular con reducción del volumen citoplasmático, deformación de la membrana plasmática (formación de ampollas), retracción de pseudópodos, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN. Las organelas y la membrana plasmática permanecen intactas hasta estadios avanzados de este proceso (Kroemer y col., 2005). En los mamíferos, la apoptosis puede iniciarse a partir de la activación de dos vías: la extrínseca o extracelular, en la cual intervienen los miembros de la superfamilia de receptores de muerte y la vía intrínseca, también llamada mitocondrial, que se activa en respuesta a estímulos externos o internos y en la que intervienen las proteínas de la familia Bcl-2. La activación de moléculas pro apoptóticas de dicha familia implica la alteración de la membrana mitocondrial y la consecuente salida de moléculas intramitocondriales hacia el citosol (Cuello Carrión y col., 2003).

La autofagia, termino griego derivado de “auto” (mismo) “fagia” (comer), es el mecanismo por el cual una célula degrada sus propios componentes y organelas degeneradas en sus lisosomas (Mizushima y col., 2008). En los últimos años, la autofagia emergió como un tipo de muerte celular programada que se distingue de la apoptosis porque posee diferentes características morfológicas y bioquímicas. Este mecanismo, que ocurre con la formación masiva de vacuolas dentro del citoplasma y sin condensación de la cromatina, comprende cinco etapas: iniciación o nucleación, elongación, cierre, maduración y degradación (Wu y col., 2011). Las vacuolas están cubiertas por dos membranas y su contenido intravesicular está compuesto por constituyentes citoplasmáticos en desuso (Burman y col., 2010). Las permeasas lisosomales liberan los productos degradados dentro del citosol para su futura utilización (Rabinowitz y col., 2010).

La apoptosis o muerte celular programada tipo I, se caracteriza por producir alteraciones de los elementos que forman parte del citoesqueleto en etapas tempranas, a diferencia de la integridad de las organelas que se preserva hasta el final del proceso. En

contraste, en la autofagia o muerte celular programada tipo II, la degradación de las organelas celulares y de las estructuras del citoesqueleto se realizan exactamente de manera opuesta a la apoptosis. Ambos tipos de muerte se caracterizan por la ausencia de respuesta inflamatoria (Levine y col., 2005).

Las células que mueren por necrosis se caracterizan por hinchamiento (swelling) citoplasmático, aumento de tamaño en algunas organelas (mitocondria, retículo endoplásmico, aparato de Golgi), ruptura de la membrana plasmática y moderada fragmentación nuclear (Kroemer y col., 2005).

Bcl-2, molécula clave en la supervivencia celular y blanco terapéutico potencial

Bcl-2 es una proteína ampliamente conocida por su rol antiapoptótico. Está encargada de prevenir la muerte celular por apoptosis mediante la inactivación del dímero Bax/Bak con la consecuente protección de la integridad de la membrana mitocondrial y la prevención de la liberación de factores apoptóticos al citoplasma (Plati y col., 2011). En los últimos años se ha descrito que Bcl-2 no sólo participa en la apoptosis sino que también previene la muerte celular por autofagia. El mecanismo de acción es mediante la unión a Beclina 1, este complejo disminuye la actividad de PI3 kinasa e inactiva la formación de los autofagolisosomas (Eskelinen y col., 2009). Debido a que Bcl-2 es un punto convergente entre ambos tipos de muerte, la resistencia que le otorga a varios tipos de tumores promueve su investigación como posible blanco terapéutico (Thomas y col., 2013).

Estrés oxidativo, ¿posible tratamiento contra el cáncer?

Como se describió anteriormente, las ERO producen alteraciones en las estructuras y organelas celulares que pueden inducir, dependiendo del grado de severidad del daño, alguna de las variantes de muerte celular. Numerosos estudios muestran relaciones directas entre estrés oxidativo, alteración mitocondrial, autofagia y apoptosis (Li y col., 2011; Lee y col., 2012; Mammucari y col., 2010).

La resistencia de los tumores a los diferentes tratamientos suele estar asociada con los niveles elevados de moléculas y enzimas antioxidantes que las células

neoplásicas sobreexpresan, siendo ésta una importante causa de falla de los tratamientos contra el cáncer (Chaiswing y col., 2011). La principal molécula reguladora del balance redox celular, como se describió previamente, es el GSH. Es por ello que, la inclusión de compuestos que deplecionan GSH, tales como menadiona (MEN), azatriopina (AZA) y D,L-butionina-S,R-sulfoximina (BSO) entre otras, podría aumentar la sensibilidad de las células neoplásicas a los tratamientos (Marchionatti y col., 2009; Chaiswing y col., 2011; Bohl y col., 2012). Dichos fármacos disminuyen el contenido de GSH por diversas vías. BSO es un aminoácido sintético que inhibe irreversiblemente la gamma-glutamylcisteína ligasa, enzima clave en la síntesis del tripéptido (Fig. 4, www.brenda-enzymes.org, 2013). En cuanto a MEN, es una quinona que interactúa con los grupos -SH del GSH y produce estrés oxidativo por aumento de los niveles de glutatión oxidado (GSSG) y generación de radicales libres (Turner y col., 1989). Recientemente se ha observado que esta molécula posee la capacidad de incorporarse a las membranas lipídicas, alterando su funcionamiento y, como consecuencia, la estimulación de la muerte celular (Monteiro y col., 2013). En referencia a AZA, esta droga consume GSH durante el paso de transformación a su metabolito activo, la 6-mercaptopurina, reacción catalizada por la glutatión-S-transferasa (Cara y col., 2004).

Debido a que la resistencia tumoral a los diferentes tratamientos quimioterapéuticos se asocia en parte con el alto contenido de GSH de las células tumorales, BSO es propuesto como droga anticancerosa (Fig. 4) (Chaiswing y col., 2011). Bayles y col. (1997) reportó que la administración de BSO en forma conjunta con melfalan a personas con cáncer, mayoritariamente de ovario y melanoma, produjo disminución notable de los niveles de GSH en células tumorales, siendo este efecto menos notorio en células de tejidos periféricos. Actualmente existen numerosos ensayos clínicos en los cuales el BSO es administrado en forma combinada con quimio y radioterapia en pacientes con cáncer. La mayoría de ellos están completos pero sin resultados concluyentes hasta el momento (www.clinicaltrials.gov, 2013).

Estudios *in vitro* realizados en nuestro laboratorio demostraron que BSO + calcitriol disminuyó la proliferación de células de cáncer de mama MCF-7 más marcadamente que los tratamientos individuales. Estos efectos son provocados por alteración en el estado redox celular y por inducción de muerte celular por apoptosis (Bohl y col., 2012).

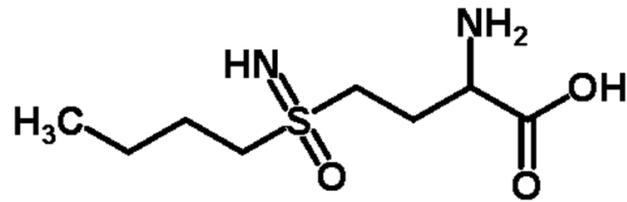


Fig. 4: Estructura química de la molécula de Butionina Sulfoximina

Otros estudios muestran que BSO aumenta la sensibilidad de células derivadas de carcinoma hepatocelular (HepG2) al ácido salicílico (Raza y col., 2012). Ensayos realizados *in vivo* muestran que el BSO es capaz de inhibir drásticamente los niveles de GSH en xenógrafos de células de cáncer colon humano implantados en ratas sin timo (Berger y col., 1994). En este mismo sentido, Hernandez-Breijo y col. (2011) demostraron que el tratamiento combinado de BSO + AZA indujo degradación del ADN y pérdida de la integridad de membrana mitocondrial en células cancerígenas hepáticas y colónicas estudiadas en ratas deprimidas inmunológicamente.

Dada la alta incidencia de cáncer de colon la búsqueda de tratamientos alternativos despierta gran interés desde el punto de vista sanitario y económico. La posibilidad de empleo de vitamina D como herramienta terapéutica, ha generado que muchos laboratorios investiguen los mecanismos moleculares de acción de sus metabolitos derivados, especialmente del calcitriol. Nuestro interés reside en tratar de dilucidar las bases moleculares del tratamiento conjunto del $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y de drogas que deplecionan GSH, que podrían potenciar el efecto de la primera.

En base a las consideraciones anteriores, se propone como **HIPÓTESIS** que el efecto antiproliferativo del calcitriol sobre las células de cáncer de colon Caco-2 podría aumentar mediante su uso combinado con BSO, droga que sensibiliza las células tumorales debido a que disminuye los niveles de GSH intracelular. Este efecto podría estar mediado por sobreproducción EROs y como respuesta compensatoria, las células podrían resistir incrementando sus defensas antioxidantes. El desequilibrio causado por el tratamiento combinado alteraría el estado redox celular y, finalmente, produciría la inhibición de la proliferación celular, objetivo primordial del tratamiento anticanceroso.

OBJETIVOS

OBJETIVO GLOBAL

Dilucidar los mecanismos desencadenados por calcitriol y BSO sobre la proliferación de las células tumorales intestinales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Evaluar el efecto del calcitriol y BSO en las células de cáncer de colon Caco-2 sobre:
 - ✚ La proliferación celular.
 - ✚ La distribución de las fases del ciclo celular.
 - ✚ La fragmentación del ADN y la externalización de la fosfatidilserina.
 - ✚ Los indicadores del estrés oxidativo y del sistema antioxidante.
 - ✚ La función mitocondrial.
 - ✚ La actividad de fosfatasa alcalina, molécula marcadora de la diferenciación celular.

- ❖ Dilucidar si el estrés oxidativo que pudiera desencadenar calcitriol + BSO sería bloqueado por un antioxidante.

- ❖ Medir el efecto antiproliferativo del calcitriol y BSO sobre otras líneas celulares epiteliales neoplásicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

- I. **Cultivo de células:** la línea celular Caco-2, derivada de adenocarcinoma de colon humano y Hep-2, originaria de carcinoma epidermal de laringe humano, se cultivaron a 37°C, bajo atmósfera de 5% de CO₂, en medio Medio Esencial Mínimo (MEM, Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, NATOCOR, Villa Carlot Paz, Córdoba, Argentina), penicilina 100 UI/mL y estreptomina 100 µg/mL. Las células HT-29 y MCF-7, derivadas de adenocarcinoma de colon y mama humanos respectivamente, se cultivaron en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco) con el agregado de SFB, penicilina y estreptomina en las mismas concentraciones que en las descritas previamente. El medio se renovó cada 48 h y las células se tripsinizaron cada 7 días. La densidad celular utilizada en todas las experiencias fue de 3000 células por cm². Para los experimentos, las células se trataron con calcitriol, BSO, calcitriol + BSO o etanol (vehículo) a distintas dosis y tiempos de exposición. La concentración de etanol que se le agregó a los controles en ningún caso excedió el 0,05%.

- II. **Ensayo de densidad celular:** se utilizó la técnica de violeta de cristal. Para ello, se sembraron las células en cajas de 24 pocillos y se efectuaron los distintos tratamientos. Posteriormente se fijaron con glutaraldehído (1%) durante 15 min, se incubaron con violeta de cristal (0,1%) 30 min, se lavaron y solubilizaron con Tritón X-100 (0,2%) por 30 min. Finalmente, se determinaron los valores de densidad óptica a 562 nm en un Multiscan FC (Thermo Science, Vantaa, Finlandia) (Narvaez y col., 2001).

- III. **Morfología celular:** se analizó por microscopía de contraste de fase utilizando un microscopio invertido Leica (Leica Microscopy and Scientific Instruments Group, Buffalo, NY, USA) (Marchionatti y col., 2009).

- IV. **Análisis del ciclo celular:** finalizado el tiempo de tratamiento, las monocapas celulares se lavaron 3 veces con PBS (pH 7,4) y se tripsinizaron durante 5 min a 37°C. Luego, las células se centrifugaron a 2.000 rpm durante 7 min a 4°C. Al precipitado se lo resuspendió en 3 ml de PBS con albúmina sérica bovina (ASB) 0,2% y posteriormente se cuantificó la densidad celular. Se transfirieron 1x10⁶ células de cada tratamiento a tubos estériles y se realizó una segunda

centrifugación en las mismas condiciones descritas anteriormente. Las células se suspendieron en PBS-EDTA 2 mM, se les agregó etanol absoluto frío y se incubaron durante 12 h a -20 °C. Luego de dos centrifugaciones a 2.000 rpm, durante 7 min a 4 °C y un lavado del precipitado con PBS-albúmina (0,2%), las células se incubaron durante 20 min en una solución de yoduro de propidio (5 µg/ml) y ARNasa (0,015 U/ml). Finalmente, las diferentes fases del ciclo celular se analizaron por citometría de flujo usando un citómetro de flujo BD FACSCanto™II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). El software que se utilizó para el análisis de los datos fue FACSDiva v6.1.2 (BD Biosciences) (Darzynkiewicz, 1994).

- V. **Análisis de núcleos celulares en mitosis:** la evaluación de la morfología nuclear se realizó mediante la tinción con 4,6-diamidino-2-fenolindol diclorhidrato (DAPI). Luego de los diferentes tratamientos, las células se fijaron con metanol absoluto a -20°C durante 12 h. Posteriormente, se permeabilizaron con Tritón al 0,1% y el ADN celular se tiñó con DAPI (1 µg/ml). La morfología nuclear se observó en un microscopio fluorescente Leica y la cuantificación se realizó mediante el conteo de núcleos con características mitóticas en relación a 200 núcleos totales (Nakanishi y col., 2011).

Evaluación del estado redox celular

- I. **Análisis de los niveles de $\cdot\text{O}_2^-$:** la concentración del anión $\cdot\text{O}_2^-$ en células controles y tratadas con las diferentes drogas se determinó por espectrofotometría según la técnica descrita por Serranger y col. (2007). Luego del periodo de tratamiento las células se lavaron dos veces con buffer Hanks (NaCl 137 mM, KCl 5,4 mM, Na_2HPO_4 0,25 mM, KH_2PO_4 0,44 mM, CaCl_2 1,3 mM, MgSO_4 1 mM, NaHCO_3 4,2 mM, glucose 6,24 mM, pH 7,4) y se incubaron con una solución de nitroazul de tetrazolio (NBT, 1 mg/ml) durante 1 hora. Los precipitados de formazan formados se disolvieron en dimetilsulfóxido y la reducción del NBT se cuantificó por espectrofotometría a 560 nm. Los valores obtenidos son indicadores directos de la concentración de $\cdot\text{O}_2^-$ en las muestras.

- II. **Preparación de extractos celulares:** Luego de los diferentes tratamientos, los cultivos celulares se lavaron 3 veces con PBS y se homogeneizaron con buffer de lisis (PMSF 1 mM, NaF 1 mM y Triton X-100 1%). Posteriormente, los homogeneizados se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min y el sobrenadante se conservó a -20°C. Las muestras se utilizaron para evaluar el contenido de GSH y las actividades enzimáticas. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante el uso de albúmina sérica bovina purificada como patrón estándar según el método de Bradford (1976).
- III. **Cuantificación de GSH total:** El contenido de GSH total de los homogeneizados provenientes de las células bajo los distintos tratamientos se analizó por espectrofotometría en presencia de ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH), ácido 5-sulfosalicílico y glutatión reductasa (Invitrogen). El GSH presente en las muestras es oxidado por el DTNB y reducido por la glutatión reductasa, enzima que utiliza NADPH como coenzima. Las determinaciones de la formación de 2-nitro-5-tiobenzoico se evaluó por espectrofotometría a una longitud de onda de 412 nm según el método enzimático de Anderson (1985). Los resultados se expresaron como nmoles/mg de proteína.
- IV. **Medición del sistema enzimático antioxidante:**

La actividad de SOD se determinó en una mezcla de reacción compuesta por EDTA 1 μ M buffer fosfato pH 7,8, metionina 13 mM, NBT 75 μ M y riboflavina 40 μ M. Dicha actividad enzimática se evaluó espectrofotométricamente a 560 nm y se define como la cantidad de enzima capaz de inhibir el 50% de reducción del NBT (competencia con $\cdot\text{O}_2^-$).

La actividad de CAT se analizó en buffer fosfato (pH 7,4) y H_2O_2 0,3 M. Las absorbencias se midieron a 240 nm, indicando el grado de descomposición del H_2O_2 , el cual es directamente proporcional a la actividad de la enzima (Marchionatti y col., 2009; Singh y col., 2005).

- V. **Evaluación del potencial de membrana mitocondrial:** con el objetivo de analizar el potencial de membrana mitocondrial en cultivos controles y tratados con las diferentes drogas, las células se suspendieron como se describió previamente en la técnica del ciclo celular. Para este análisis, se usaron suspensiones de células (2×10^5 células), las cuales se incubaron en presencia de 3,3' ioduro de di-hexyloxocarbocianina (DiOC₆) 60 nM a 37°C durante 15 min en la oscuridad (Marchionatti y col., 2008). Las intensidades de fluorescencia de las poblaciones celulares se evaluaron por citometría de flujo utilizando el programa FACSDiva v6.1.2 para su análisis.

Evaluación de eventos que intervienen en la muerte celular

- I. **Externalización de fosfatidilserina (FS):** Las células se resuspendieron en buffer de ligado (Hepes 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM, pH 7,4) y luego se trataron con Anexina V-FICT (0,01 µg/µL) en un buffer con ioduro de propidio (5 µg/ml) a 37°C durante 15 min (Narvaez y col., 2001). La externalización del fosfolípido se analizó por citometría de flujo (BD FACSCanto™ II) y los datos con el software FACSDiva v6.1.2.
- II. **Fragmentación de ADN:** se analizó mediante la técnica de TUNEL. Para ello, las células crecieron y se trataron con las diferentes drogas sobre portaobjetos. Luego se fijaron con solución de paraformaldehído 3% durante 72 h y con una mezcla de etanol:ácido acético (2:1) a 4°C durante 15 min. La peroxidasa endógena se bloqueó con una solución de H₂O₂ 1/10 comercial durante 5 min, a 4°C. Finalmente la fragmentación del ADN producida por nucleasas endógenas se detectó por inmunocitoquímica con un kit de detección de muerte celular *in situ* (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), que consiste en la marcación de cadenas rotas de ADN (tecnología Tunel: Terminal deoxinucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling).
- III. **Expresión génica de *Bcl-2*:** la expresión relativa del ARNm codificante para la proteína antiapoptótica Bcl-2 se realizó mediante PCR tiempo real usando el termociclador Quantitative PCR thermocycler Stratagene Mx 3005 (Agilent

Technologies Inc, Santa Clara, USA). Inicialmente, se aisló ARN total de las células controles y tratadas usando el reactivo de extracción TRIZOL (Invitrogen). Luego las muestras se disolvieron en cloroformo y se centrifugaron a 10.000 rpm a 4°C durante 15 min. El ARN presente en la fase acuosa se precipitó con isopropanol, se resuspendió en agua estéril y se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm, usando la relación 260/280 para el análisis del grado de pureza. Se transcribió 1 µg de ARN en forma reversa a ADN copia (ADNc) utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (400 U) en una reacción con First-Strand Buffer, deoxinucleótidos trifosfatos (2 nM), inhibidores de ARNasas (40 U) y cebadores al azar (500 ng) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Perez y col., 2010). La PCR en tiempo real se realizó en una reacción de un paso a partir del ADN copia previamente sintetizado. Cada tubo de amplificación contenía 10 µL de master mix SYBR Green qRT-PCR 2 x (Stratagene), 0,5 µL de cada cebador (10 pmol, sentido y antisentido) y 100 ngr de muestra de ADNc. La secuencia de los cebadores usados para *Bcl-2* fueron: 5'GAGCCACGACCCTTCTTAAGACAT3' (sentido) y 5'CAGGGGTCA ATTAATCCATGACAC3' (antisentido). Como control interno de carga se utilizó el gen *18S* ARN ribosomal humano, cuya secuencia de cebadores son: 5'GTAACCCGTTGAACCCCA3' (sentido), 5'CCATCCAATCGCTAGTAG3' (antisentido). Las condiciones de PCR que se utilizaron fueron: 1 ciclo a 95 °C por 15 min (calentamiento), 40 ciclos a 95 °C por 30 seg (desnaturalización), 55 °C durante 1 min (annealing/extensión), seguido de un paso final de 70°C durante 30 seg (enfriado). El software utilizado para evaluar los datos y calidad de las reacciones de amplificación fue el programa MxPro™ QPCR versión 3.20 (Stratagene. Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Los datos se analizaron usando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (análisis de la expresión génica relativa) (Livak y col., 2001). Los resultados se expresan como cambio en la inducción del ARN mensajero (ARNm) del gen *Bcl-2* normalizado a la expresión del ARNm codificante para la proteína 18S (referente endógeno) y relativo a las muestras controles.

Evaluación de la diferenciación celular

- I. **Actividad enzimática:** la actividad de FAL se midió por ensayo espectrofotométrico según una adaptación del método de Walter y Schütt (1974). Se usó p-nitrofenil fosfato (3 mM) como sustrato en un buffer con dietanolamina 0,5 M, pH 9,8. Cuando el p-nitrofenil fosfato fue hidrolizado por las enzimas FAL presentes en la muestra, se produjo p-nitro fenol, compuesto de color amarillo. La densidad óptica observada a 420 nm fue una medida indirecta de la actividad de enzima presente en la muestra (Marchionatti y col., 2003).

- II. **Análisis de los niveles de ARNm de Fosfatasa Alcalina por RT-PCR:** Se aisló el ARN total de células bajo los distintos tratamientos usando el reactivo TRIZOL (Invitrogen) y se transcribió a ADNc como se describe previamente. La amplificación del fragmento de gen que corresponde a FAL se realizó utilizando como molde el ADNc sintetizado y la enzima Taq ADN polimerasa Platinum (1,25 U) (Invitrogen) en una reacción con PCR Buffer Minus Mg y deoxinucleótidos trifosfatos (0,2 mM). La secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación del gen *FAL* es: 5'CCATTCCCACGTCTTCACATTTG3' (sentido), 5'ATTCTCTCGTTCACCGCCCAC3' (antisentido) y para el gen normalizador *18S*: 5'GTAACCCGTTGAACCCCA3' (sentido) y 5'CCATCCAATCGCTAGTAG3' (antisentido). El tamaño de los fragmentos amplificados para ambos genes son de 113 pb y 100 pb respectivamente. Las condiciones empleadas para la PCR fueron las siguientes: 40 ciclos de amplificación compuestos por diferentes condiciones: 95°C durante 45 seg, 55°C durante 1 min, 72°C 1 min y finalmente 72°C durante 10 min (Syng-Ai y col, 2004). Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% y posteriormente se cuantificaron las intensidades de las diferentes bandas utilizando el equipo EC3 Imaging System UVP (Cambriadge, UK) y el programa Vision Works LS UVP (Cambriadge, UK) para el análisis. Por último, se realizó la relación entre la intensidad media de las bandas de *FAL* y la intensidad media de las que corresponden al *18S*, parámetro que se valoró en unidades arbitrarias.

Evaluación de la migración celular

VI. **Ensayo de la herida:** Las células Caco-2 se cultivaron en placas de 24 pocillos y luego de 4 días en posconfluencia, se le realizó a la monocapa una herida con la punta de un tip estéril. Posteriormente, se les agregó medio con los distintos tratamientos. Se tomaron imágenes fotográficas a distintos tiempos y el ancho de las heridas, medida que indica la migración celular, se cuantificó utilizando el software Image J 1.45s (National Institutes of Health, Bethesda, USA) (Tang y col., 2013).

VII. **Análisis estadístico**

Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) a una vía seguido del test de Bonferroni que se empleó como test post-hoc. Se utilizó el software SPSS 8.0.0 como programa de análisis (SPSS Inc. Chicago, ILL, USA). Las diferencias entre grupos se consideraron significativas a $p < 0,05$.

RESULTADOS

EFFECTOS DE CALCITRIOL Y BSO SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS CACO-2

Perfil temporal y de dosis

Se evaluó el efecto de BSO, calcitriol y ambas drogas sobre la proliferación de las células Caco-2 en función del tiempo de tratamiento. Para ello, se emplearon las siguientes dosis: BSO 20 μM y calcitriol 100 nM. Estas concentraciones se eligieron debido a que estudios previos realizados en células de cáncer de mama MCF-7 (Marchionatti y col., 2009; Bohl y col., 2012,) y cáncer de colon PC/JW, HT-29 y SW620 (Díaz y col., 2000) mostraron disminución significativa de la proliferación celular con las mismas drogas y concentraciones. En nuestro estudio se observó disminución de la densidad celular a partir de las 72 h de exposición a los tres tratamientos realizados, no obstante la inhibición observada a las 96 h fue mayor (Fig. 5). Se analizó además, el efecto de distintas concentraciones de BSO sobre la proliferación de las células Caco-2 a las 96 h de tratamiento, manteniendo constante la dosis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (100 nM) (Fig. 6). La disminución de la densidad celular fue dependiente de la dosis de BSO y resultó ser diferente a las células controles a partir de 20 μM de concentración (BSO vs Control -D, 48 % de inhibición). De manera similar, se analizó el efecto del calcitriol sobre la proliferación celular manteniendo constante la dosis de BSO (50 μM , Fig. 7). Para ello las células Caco-2 se trataron con dosis crecientes de la hormona durante 96 h, tiempo en el cual previamente se demostró mayor efecto de los tratamientos. La disminución de la densidad celular producida por calcitriol se puso en evidencia a partir de 100 nM (D vs Control -BSO, 23 % de inhibición). Cuando las células se trataron con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en concentraciones de 150 y 200 nM, el efecto inhibitorio se potenció con el tratamiento combinado (calcitriol + BSO vs BSO y D).

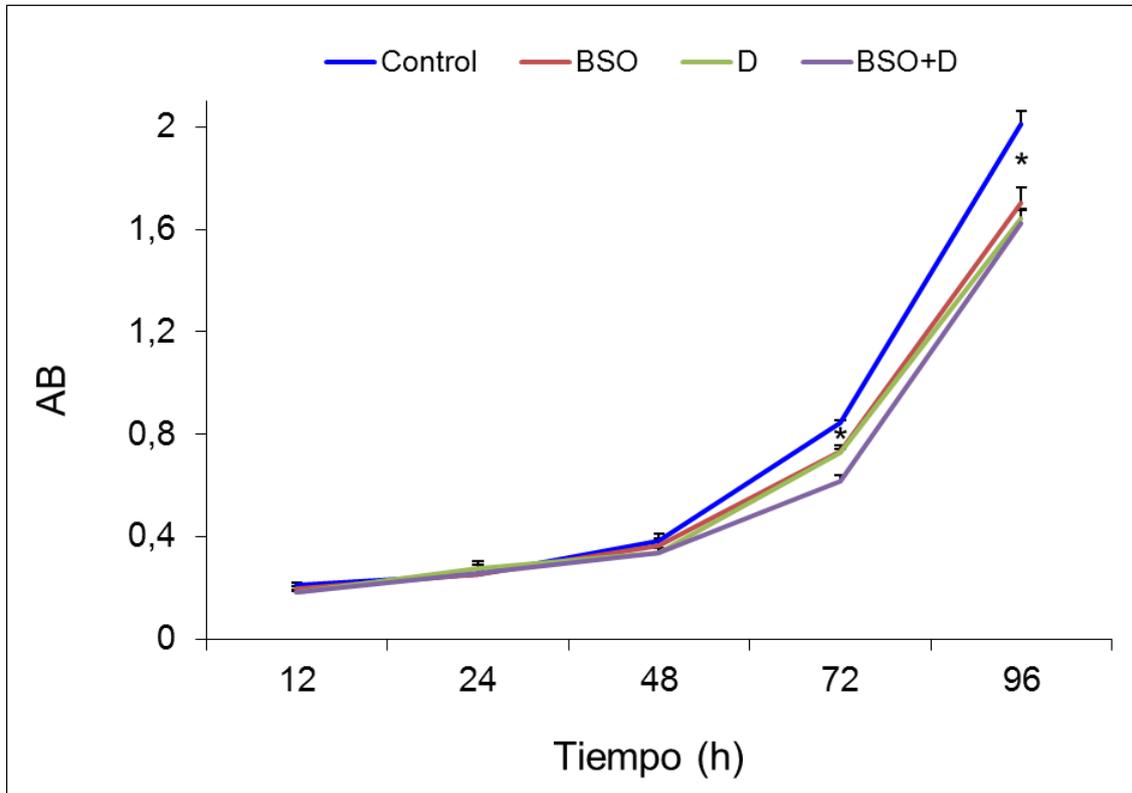


Fig. 5: Perfil temporal del efecto de BSO y/o calcitriol sobre la proliferación celular. Las células Caco-2 se trataron con BSO 20 μ M, calcitriol (D) 100 nM, BSO + calcitriol o etanol (vehículo) durante diferentes tiempos. La proliferación celular se determinó por la técnica de violeta de cristal. AB: absorbencia, parámetro indicativo de densidad celular. Los valores expresan las medias \pm error estándar y son representativos de 3 experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por sextuplicado. * $p < 0,05$ vs respectivos controles.

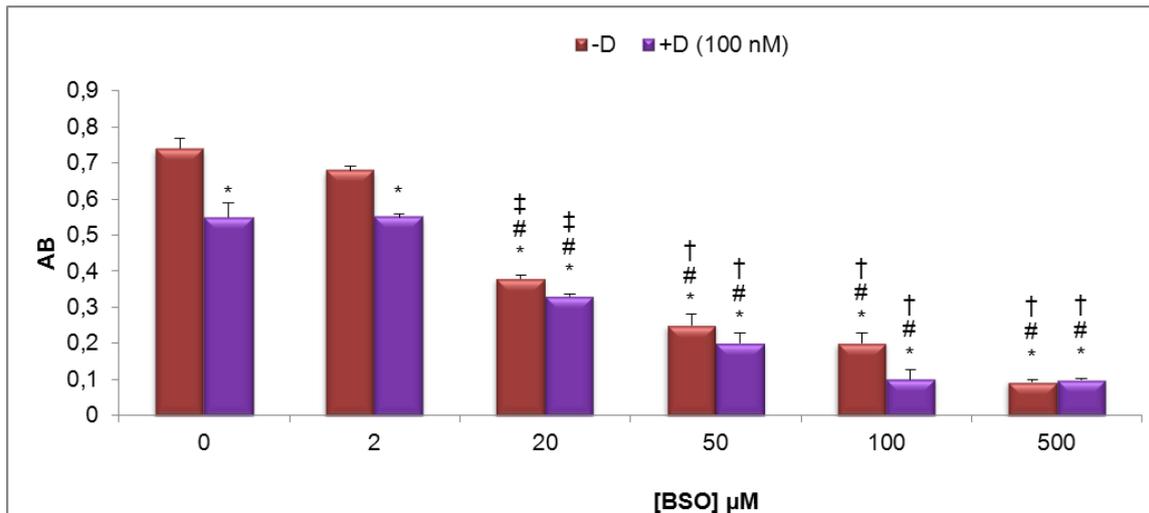


Fig. 6: Perfil de dosis de BSO sobre la proliferación celular en ausencia y presencia de calcitriol. Las células Caco-2 se trataron con diferentes dosis de BSO de manera simple y/o combinada con calcitriol (D) 100 nM durante 96 h. La proliferación se determinó por la técnica de violeta de cristal. Los valores representan las medias \pm error estándar de las absorbencias de 4 experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por sextuplicado. AB: absorbencia, parámetro indicativo de densidad celular. * $p < 0,05$ vs control, # $p < 0,05$ vs control + D, † $p < 0,05$ vs BSO 2 μM , ‡ $p < 0,05$ vs BSO 20 μM .

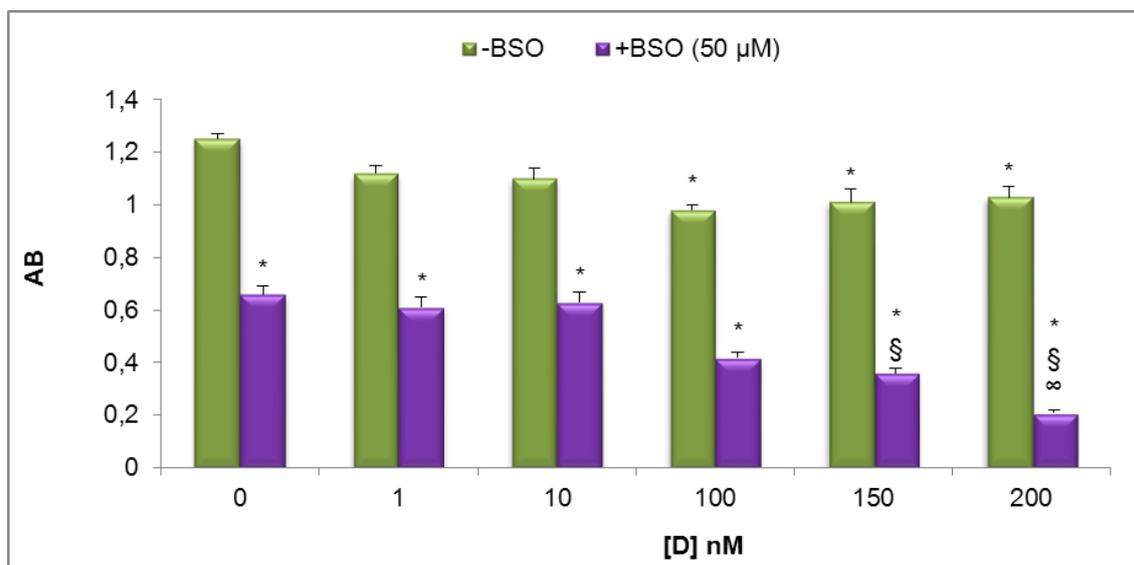


Fig. 7: Perfil de dosis de calcitriol sobre la proliferación celular en ausencia y presencia de BSO. Las células Caco-2 se trataron con diferentes dosis de calcitriol (D) de manera simple y/o combinada con BSO 50 μM durante 96 h. La proliferación se determinó por la técnica de violeta de cristal. Los valores representan las medias ± error estándar de las absorbancias de 4 experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por sextuplicado. AB: absorbancia, parámetro indicativo de densidad celular. *p < 0,05 vs control, §p < 0,05 vs BSO y BSO + D 1 nM, ∞p < 0,05 vs BSO + D 10 nM.

La elección de la dosis de trabajo para los siguientes experimentos se realizó teniendo en cuenta las siguientes consideraciones. Debido a que el tratamiento de las células Caco-2 con BSO 50 μM no alteró los niveles de glutatión total (datos no mostrados) se trabajó con una dosis mayor de BSO de 100 μM, concentración que sí modificó la cantidad intracelular del tripéptido. En cuanto a la cantidad de calcitriol empleada, se observó que 150 y 200 nM del esteroide potencia la inhibición de la proliferación producida por BSO, efecto no apreciable con dosis igual o menor de 100 nM (Fig. 7). Por estas razones, en los experimentos siguientes, las células Caco-2 se trataron con BSO 100 μM y calcitriol 200 nM de manera simple o conjunta.

Para evaluar los efectos de los tratamientos sobre la proliferación celular en el tiempo, se realizaron estudios comparativos a 6, 48 y 96 h de exposición. A las 6 h (Fig. 8), la densidad de las células no se modificó con ningún tratamiento. En cambio, a las 48 h, BSO y BSO + calcitriol redujeron la proliferación celular, efecto que resultó más pronunciado a las 96 h debido a que la densidad celular disminuyó con todos los tratamientos y en forma más marcada con la combinación de BSO + D ($^{\S}p < 0,05$ vs BSO y D).

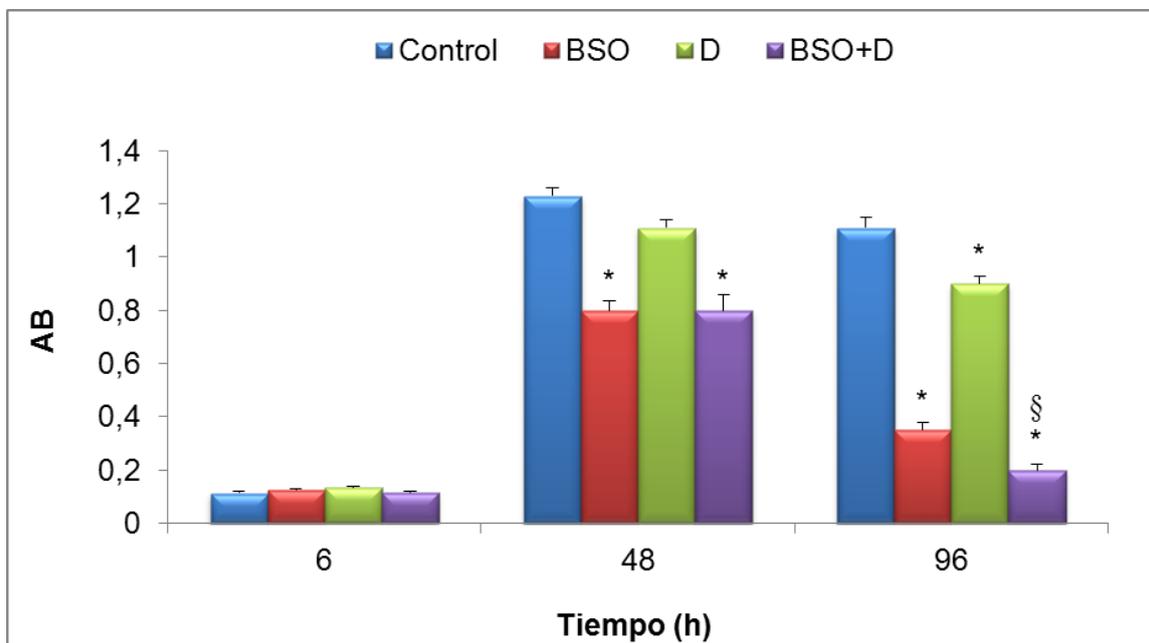


Fig. 8: Perfil temporal de los efectos de calcitriol y BSO sobre la proliferación celular. Las células Caco-2 se trataron con BSO 100 μ M, calcitriol (D) 200 nM, con ambas drogas en forma conjunta o etanol (vehículo) durante diferentes tiempos. La proliferación se determinó por la técnica de violeta de cristal. Los valores representan las medias \pm error estándar de las absorbencias de 3 experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por sextuplicado. AB: absorbencia, parámetro indicativo de densidad celular. * $p < 0,05$ vs respectivo control, $^{\S}p < 0,05$ vs tratamientos individuales (96 h) de BSO y D.

La tinción con DAPI, que marca núcleos, permitió observar que BSO y calcitriol disminuyen la proliferación celular, siendo el efecto más notorio con el tratamiento combinado (Fig. 9). Estos resultados confirman los resultados obtenidos con la técnica de violeta de cristal.

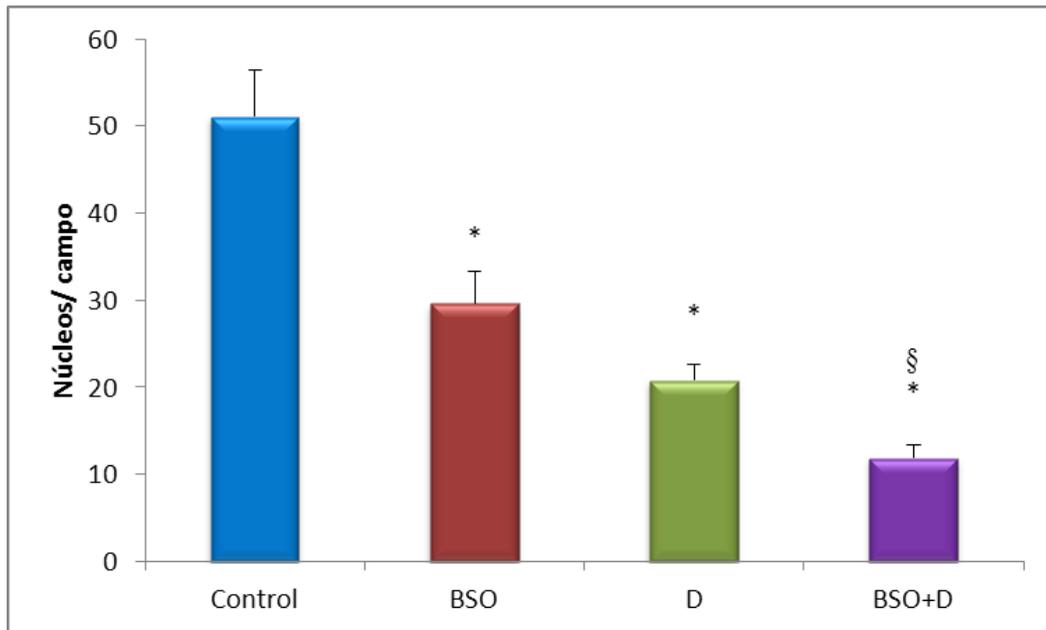


Fig. 9: Efecto de BSO y calcitriol sobre la proliferación celular. Las células Caco-2 se trataron con BSO 100 μ M, calcitriol (D) 200 nM, con ambas drogas o etanol (vehículo) durante 96 h. Los núcleos se cuantificaron por tinción con DAPI y observación por microscopía de fluorescencia. Los valores representan las medias \pm error estándar de la cantidad de núcleos totales por campo de 3 experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por triplicado. * $p < 0,05$ vs control, § $p < 0,05$ vs BSO y D.

En base a estos resultados, en los siguientes experimentos las células se trataron con BSO 100 μ M y calcitriol 200 nM.

Con el objetivo de dilucidar los mecanismos involucrados en el efecto antiproliferativo, se evaluó la morfología celular por microscopía de contraste de fases. La Fig. 10, muestra que BSO y calcitriol provocaron alteraciones en la morfología celular como se pone en evidencia por la disminución del tamaño individual y el redondeamiento citoplasmático (flechas rojas). Las modificaciones producidas por la combinación de BSO + calcitriol fueron más pronunciadas, al igual que el efecto antiproliferativo.

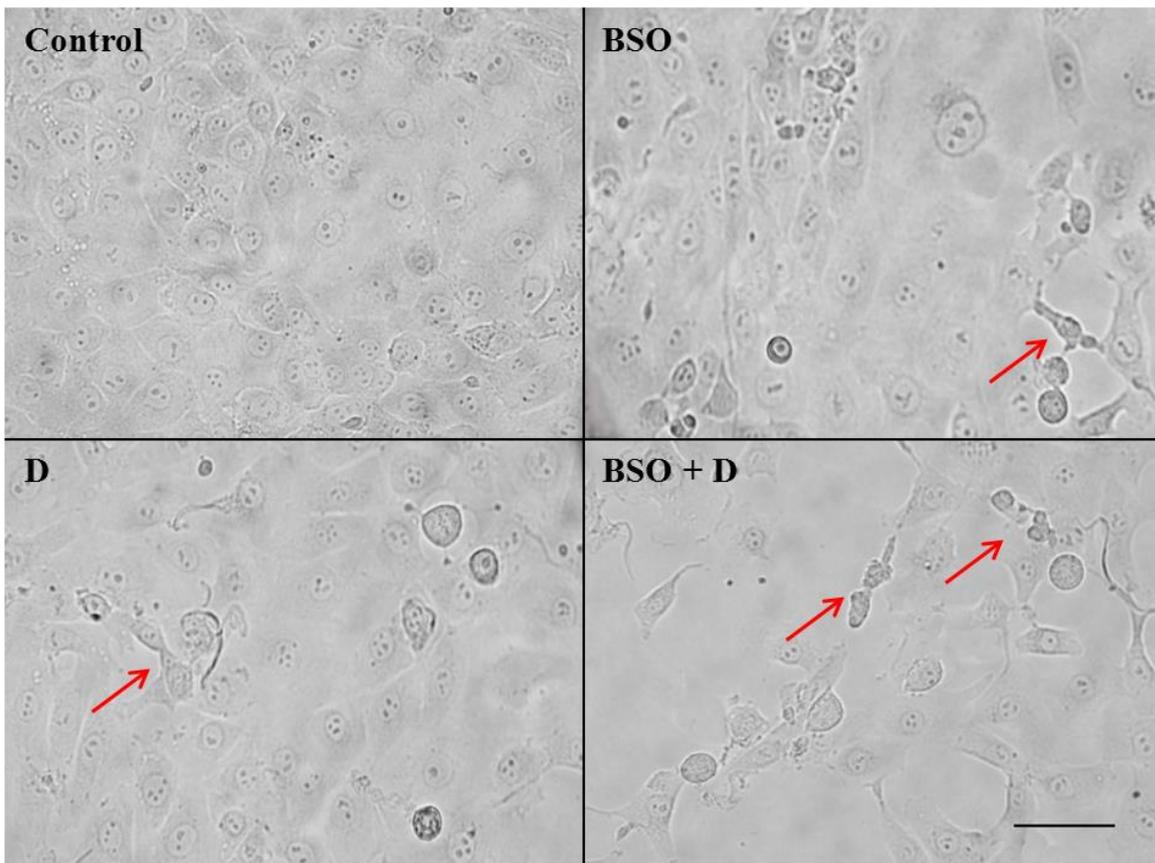


Fig. 10: Efecto de BSO y calcitriol sobre la morfología celular. Las células Caco-2 se trataron con BSO 100 μM , calcitriol (D) 200 nM, con ambas drogas o etanol (vehículo) durante 96 h. La morfología celular se evaluó por microscopía de contraste de fases. Las flechas rojas señalan alteraciones en la forma de las células. Amplificación de la imagen: 400X. La barra negra indica 100 μm .

EFFECTO DE CALCITRIOL Y BSO SOBRE EL CICLO Y LA DIVISIÓN CELULAR DE LAS CÉLULAS CACO-2

Se estudió el ciclo celular con el fin de analizar si el efecto antiproliferativo de las drogas está mediado por alteraciones en la distribución celular a lo largo de las diferentes fases (Tabla 1). Como el arresto del ciclo podría anteceder al efecto antiproliferativo (Bohl y col., 2012), se analizó el porcentaje de células en fase G₀/G₁, S y G₂/M a las 48 h de tratamiento. En este tiempo, la mayoría de las células controles y tratadas estaban en la fase G₀/G₁ (~70%) del ciclo celular. El tratamiento combinado aumentó significativamente el número de células en fase G₂/M, sin embargo, BSO y calcitriol empleados de manera individual no modificaron dicho proceso (Tabla 1 A). A las 96 h, las distintas drogas no produjeron variaciones en la distribución celular en ninguna etapa y, como consecuencia, el porcentaje de células en las fases S y G₂/M también permanecieron sin cambios (Tabla 1 B).

Para evaluar si el arresto del ciclo celular producido por ambas drogas podría estar relacionado con cambios en el número de células en mitosis, etapa final del proceso antes mencionado, el porcentaje de células en división se analizó por tinción nuclear con DAPI. La cantidad de núcleos en mitosis disminuyó con los tratamientos siendo este efecto únicamente significativo cuando el calcitriol se administró en combinación con BSO (96 h, Fig. 11). Estos datos sugieren que la alteración del número de células en mitosis podría ser una consecuencia de la modificación del ciclo celular observado con el tratamiento combinado a tiempos menores de exposición a las drogas.

Tabla 1: Efecto de BSO y calcitriol sobre el ciclo celular**A**

Tratamientos	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
CONTROL	76,6 ± 2,2	5,7 ± 1,2	17,8 ± 0,9
BSO	71,2 ± 2,6	7,5 ± 2,1	21,3 ± 1,3
D	74,0 ± 1,7	5,5 ± 1,7	20,2 ± 1,0
BSO + D	65,8 ± 3,5*	7,0 ± 1,8	27,0 ± 1,7*

B

Tratamientos	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
CONTROL	83,5 ± 1,2	3,8 ± 1,3	12,6 ± 2,0
BSO	83,0 ± 1,6	3,8 ± 1,2	13,2 ± 2,8
D	78,9 ± 2,2	6,3 ± 2,9	14,8 ± 3,2
BSO + D	78,6 ± 1,1	5,6 ± 2,0	15,8 ± 3,1

Las células Caco-2 se trataron con BSO 100 µM, calcitriol (D) 200 nM, con ambas drogas de manera combinada o etanol (vehículo) durante 48 (A) y 96 (B) h. Los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular se determinaron por citometría de flujo. Los datos representan los porcentajes de células en las fases G₀/G₁, S y G₂/M del ciclo celular. Los valores indican las medias ± error estándar de tres experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por triplicado. *p<0,05 vs respectivo control.

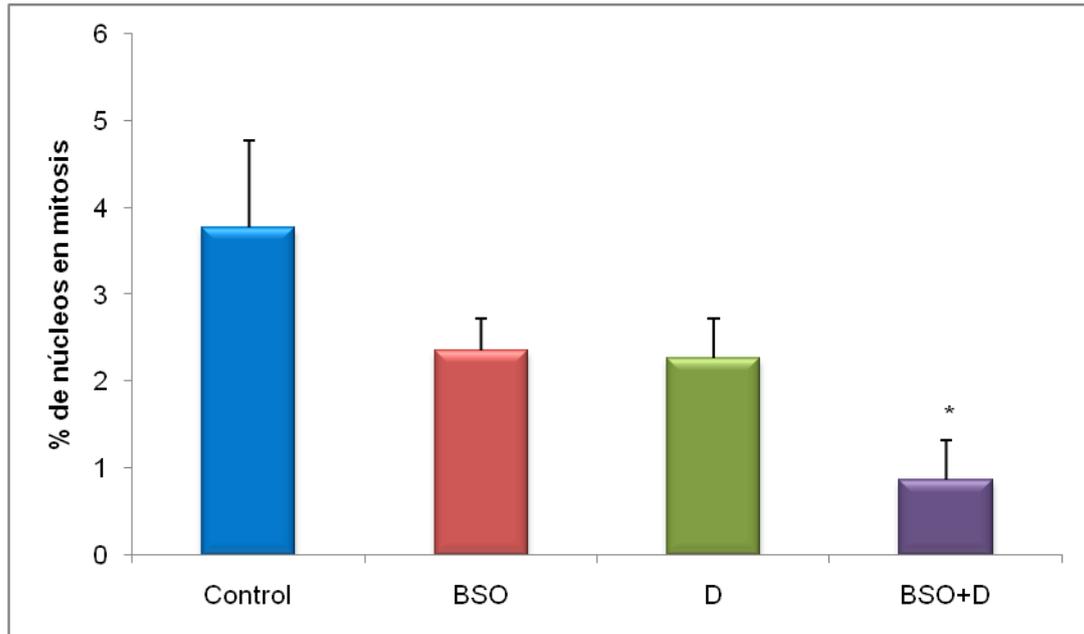


Fig. 11: Efecto de BSO y calcitriol sobre la división celular. Las células Caco-2 se trataron con BSO 100 μ M, calcitriol (D) 200 nM, con ambas drogas de manera combinada o vehículo durante 96 h. El porcentaje de núcleos en mitosis se analizó por tinción con DAPI y se cuantificó por observación al microscopio de fluorescencia. Los datos representan los porcentajes de células en división mitótica indicados por las medias \pm error estándar de tres experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por cuadruplicado. * $p < 0,05$ vs control.

EFFECTO DE CALCITRIOL Y BSO SOBRE EL ESTADO REDOX Y EL SISTEMA ENZIMÁTICO ANTIOXIDANTE DE LAS CÉLULAS CACO-2

Se evaluaron los niveles del anión superóxido como molécula representativa de las ERO en células controles o bajo tratamiento con las diferentes drogas. Como se observa en la Fig. 12, la concentración del $\cdot\text{O}_2^-$ aumentó con BSO y con BSO + calcitriol.

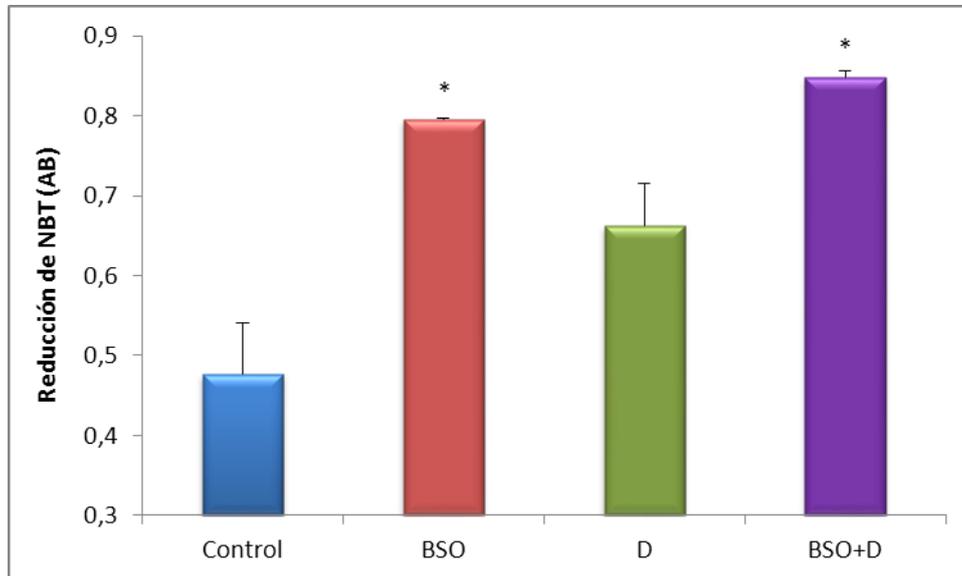


Fig. 12: Efecto de BSO y calcitriol sobre el contenido de anión superóxido. Las células Caco-2 se trataron con BSO 100 μM , calcitriol (D) 200 nM, ambas drogas o etanol (vehículo, 0,05%) durante 96 h. Los niveles de $\cdot\text{O}_2^-$ se evaluaron por espectrofotometría. AB: absorbencia, parámetro indicativo de reducción del NBT a formazán por acción del anión $\cdot\text{O}_2^-$. Los valores representan las medias \pm error estándar de 3 experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por triplicado. * $p < 0,05$ vs control.

La alteración en los niveles de $\cdot\text{O}_2$ podría modificar el sistema antioxidante como mecanismo compensatorio. Con el fin de dilucidarlo, se evaluaron los niveles de GSH y las actividades de las enzimas CAT y SOD como parámetros representativos importantes del sistema antioxidante celular. Para ello, las células se trataron con BSO 100 μM , con calcitriol 200 nM o con la combinación de ambas durante 6, 48 y 96 h.

Como se observa en la Fig. 13, la concentración de GSH disminuyó en las células tratadas con BSO y con las drogas combinadas a las 6 y 48 h de tratamiento en comparación con sus respectivos controles. A las 96 h, los niveles de GSH retornaron a los valores controles. La actividad de SOD no se modificó con los distintos tratamientos en ningún tiempo de estudio (Fig. 14). La actividad de CAT aumentó en células tratadas con BSO + calcitriol durante 96 h mientras que, a tiempos menores de tratamiento (6 y 48 h), la actividad enzimática no se modificó (Fig. 15).

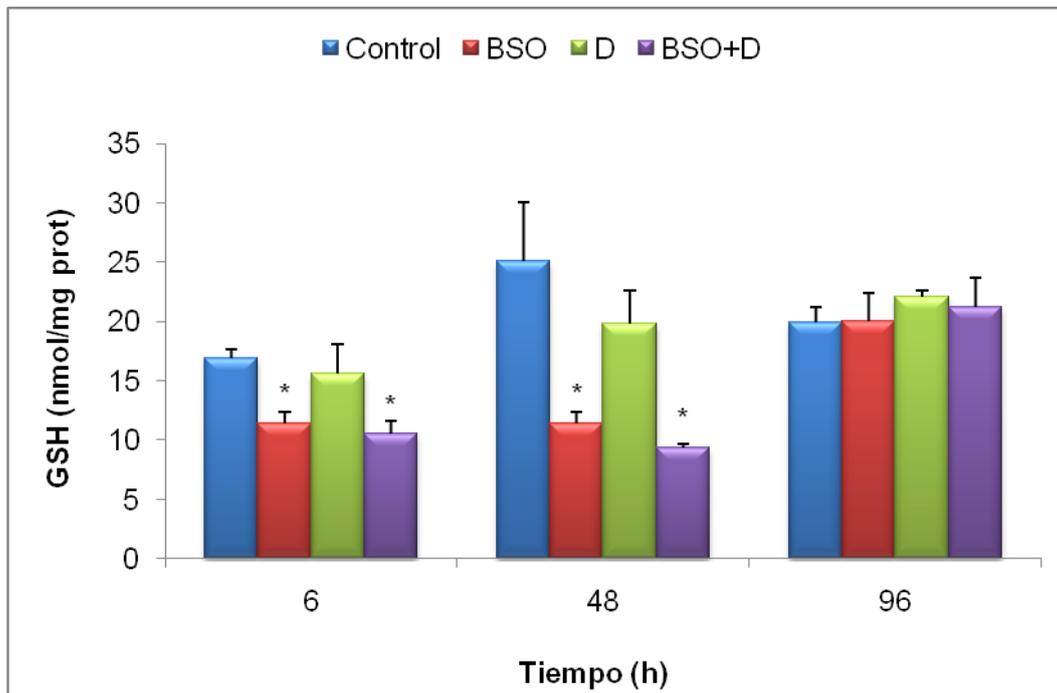


Fig. 13: Efecto de BSO y calcitriol sobre los niveles de GSH intracelular. El contenido de GSH se evaluó en células Caco-2 tratadas con BSO 100 μ M, calcitriol (D) 200 nM o ambas drogas durante los tiempos indicados por espectrofotometría según se describe en Materiales y Métodos. Como control se utilizaron células tratadas con etanol (vehículo) en una concentración menor al 0,05%. Los valores representan las medias \pm error estándar de 3 experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por triplicado. * $p < 0,05$ vs sus respectivos controles.

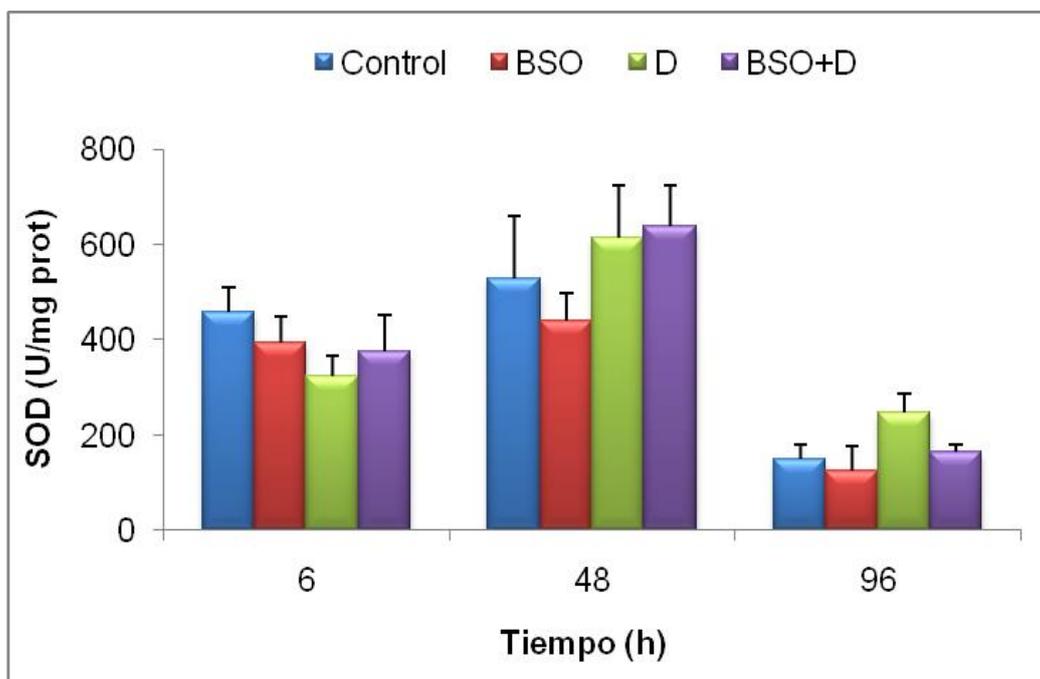


Fig. 14: Efecto de BSO y calcitriol sobre la actividad de SOD. Se evaluó la actividad de SOD en células Caco-2 tratadas con BSO 100 μ M, calcitriol (D) 200 nM o ambas drogas durante los tiempos indicados por espectrofotometría según se describe en Materiales y Métodos. Como control se utilizaron células tratadas con etanol (vehículo) en una concentración menor al 0,05%. Los valores representan las medias \pm error estándar de 4 experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por triplicado.

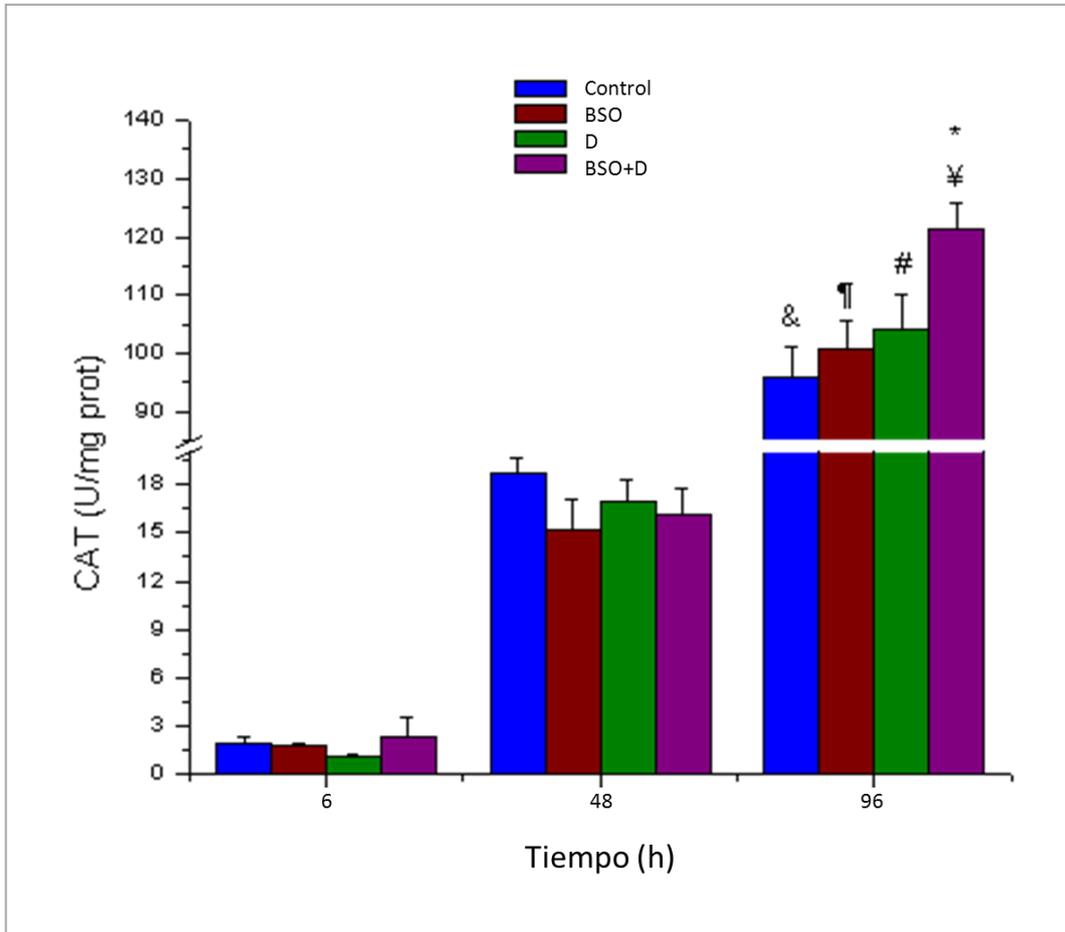


Fig. 15: Efecto de BSO y calcitriol sobre la actividad de CAT. Se evaluó la actividad de CAT en células Caco-2 tratadas con BSO 100 μ M, calcitriol (D) 200 nM o ambas drogas durante los tiempos indicados por espectrofotometría, según se describe en Materiales y Métodos. Como controles se utilizaron células tratadas con etanol (vehículo) en una concentración menor al 0,05%. Los valores representan las medias \pm error estándar de 4 experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por triplicado. * $p < 0,05$ vs control 96 h, & $p < 0,05$ vs control 6 h, ¶ $p < 0,05$ vs BSO 6 h, # $p < 0,05$ vs D 6 h, ¥ $p < 0,05$ vs BSO + D 6 h.

EFFECTO DE CALCITRIOL Y BSO SOBRE EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL DE LAS CÉLULAS CACO-2

Los cambios observados en los niveles de GSH, de $\cdot\text{O}_2^-$ y en la actividad de CAT sugieren una posible alteración funcional en las mitocondrias de las células Caco-2 debido a los tratamientos. Mediante la tinción con DiOC₆, se evaluó el potencial de membrana mitocondrial de las células tratadas con BSO 100 μM , calcitriol 200 nM y con ambas drogas combinadas durante 48 y 96 h. El DiOC₆ es un colorante catiónico y lipofílico que posee afinidad por las cargas negativas presentes en la matriz mitocondrial y fluoresce en su máxima intensidad cuando las mitocondrias funcionan normalmente (Johnson y col., 1981). Como se observa en la Fig. 16, el porcentaje de células con menor potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) aumentó a las 48 h con BSO, calcitriol y el tratamiento combinado (Fig. 16 A). Estas alteraciones producidas por los tratamientos de calcitriol y BSO + calcitriol se mantuvieron a las 96 h (Fig. 16 B).

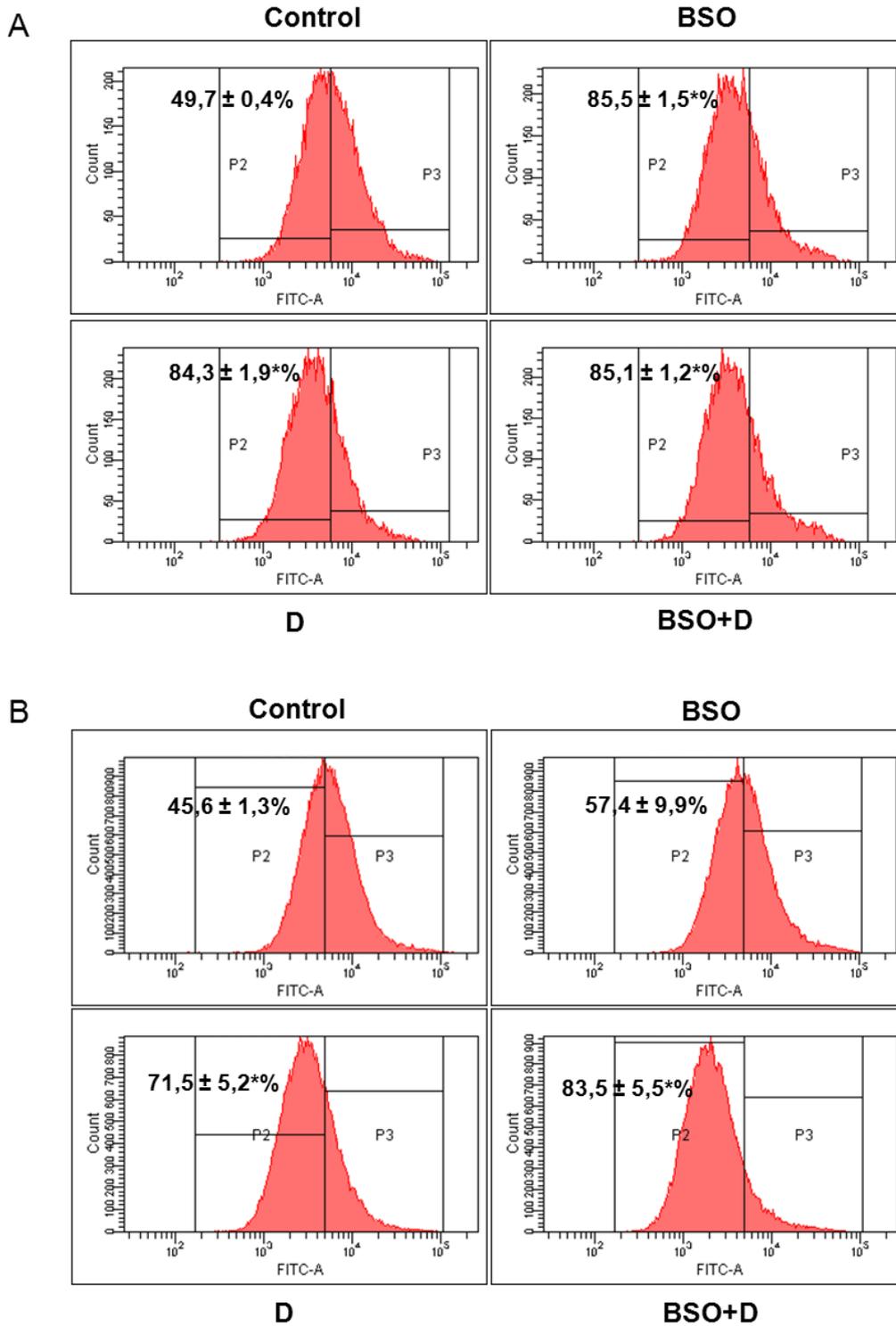


Fig. 16: Efecto de calcitriol y de BSO sobre el potencial de membrana mitocondrial. Las células se trataron con BSO 100 μ M y/o calcitriol (D) 200 nM durante 48 (A) y 96 h (B) y el $\Delta\Psi_m$ se determinó por citometría de flujo como se describe en Materiales y Métodos. Los histogramas son representativos de tres experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por duplicado. * $p < 0,05$ vs respectivos controles.

EFEECTO DE CALCITRIOL Y BSO SOBRE LA MUERTE CELULAR DE LAS CÉLULAS CACO-2

Con el fin de dilucidar si las alteraciones en la proliferación celular estaban mediadas por inducción de la muerte celular, se evaluó este proceso mediante la determinación de la externalización de la PS (anexina V) y la fragmentación de ADN.

La traslocación de PS hacia la superficie externa de la membrana plasmática es una señal de apoptosis. Las células tratadas con BSO 100 μ M, calcitriol 200 nM o con ambos compuestos no mostraron diferencias de marcación positiva para anexina V en comparación con los controles a las 6, 24 y 48 h de exposición. Similarmente, los distintos tratamientos no alteraron la externalización del fosfolípido a las 96 h (control: $1,45 \pm 0,88$ %, BSO: $1,07 \pm 0,87$ %, D: $0,78 \pm 0,69$ %, BSO+D: $1,03 \pm 0,36$ %; Fig. 17).

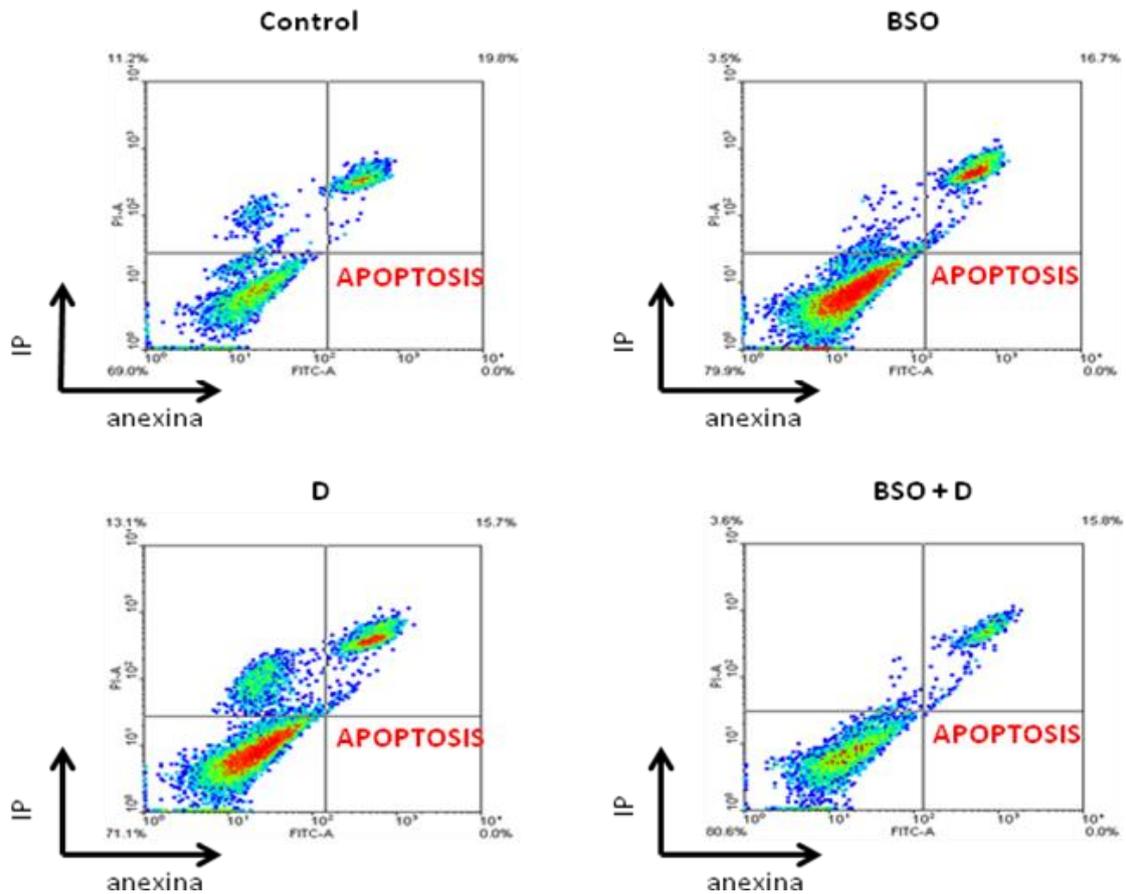


Fig. 17: Efecto de BSO y calcitriol sobre la externalización de FS. Las células Caco-2 se trataron con BSO 100 μ M, calcitriol (D) 200 nM, con ambas drogas de manera combinada y/o etanol (vehículo) durante 96 h. La externalización de fosfatidil serina se evaluó por citometría de flujo. Los gráficos son representativos de tres experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por duplicado.

Sin embargo, cuando se evaluó la muerte celular mediante la técnica de TUNEL se observó que el porcentaje de células con el ADN fragmentado (TUNEL positivas) aumentó con BSO y calcitriol. El efecto producido por el tratamiento combinado fue más pronunciado que el observado con BSO y calcitriol administrados de manera simple (Fig. 18). Estos resultados sugieren que ambas drogas y su combinación incrementarían la muerte celular mediante fragmentación del ADN por nucleasas endógenas.

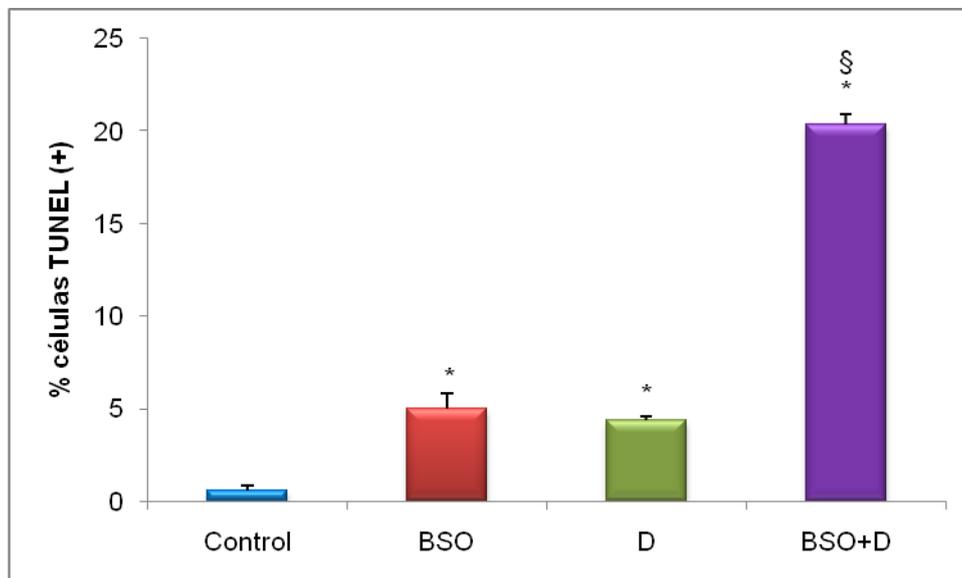


Fig. 18: Efecto de BSO y calcitriol sobre la fragmentación del ADN nuclear. Las células Caco-2 se trataron con BSO 100 μ M, calcitriol (D) 200 nM, con ambas drogas o etanol (vehículo) durante 96 h y la fragmentación del ADN se analizó por la técnica inmunocitoquímica de TUNEL. Los porcentajes representan las medias \pm error estándar de los núcleos TUNEL positivos en relación a núcleos totales (600) de tres experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por duplicado. * $p < 0,05$ vs control, § $p < 0,05$ vs BSO y D.

Bcl-2 es una oncoproteína encargada de regular negativamente la muerte celular por apoptosis y por autofagia (Patingre y col., 2006). Las células tratadas con BSO 100 μM y BSO + $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (200 nM) durante 96 h mostraron una disminución significativa de la expresión relativa del ARNm de *Bcl-2* (Fig. 19). El tratamiento con calcitriol administrado en forma individual no alteró la expresión de este gen.

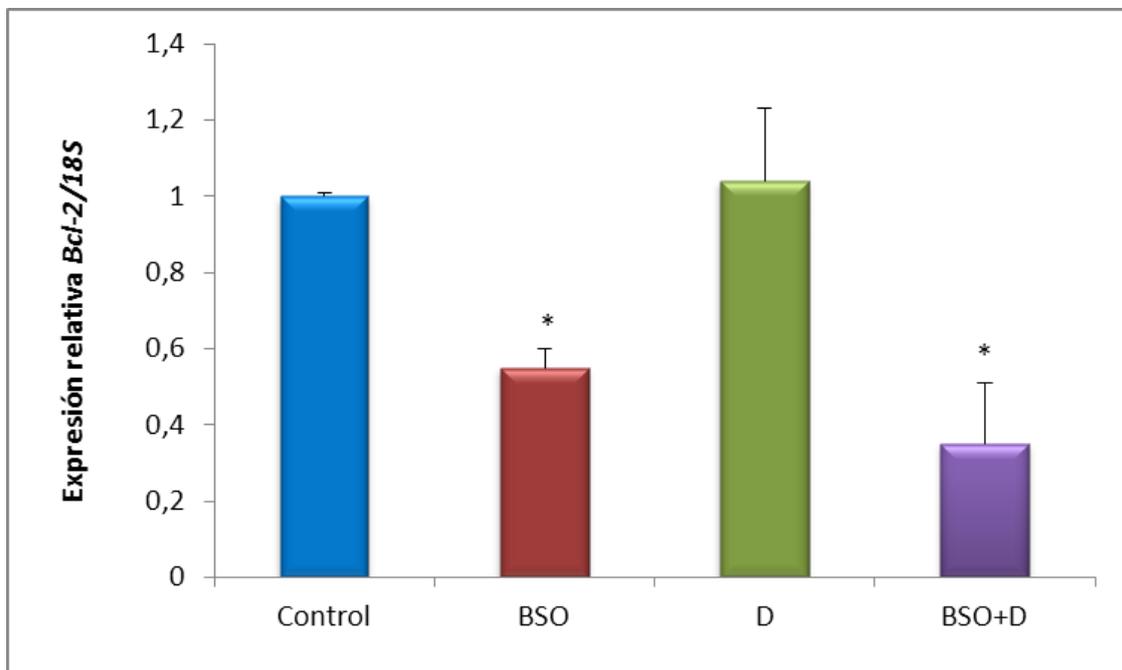


Fig. 19: Efecto de BSO y calcitriol sobre los niveles de ARNm del gen *Bcl-2*. Las células Caco-2 se trataron con BSO 100 μM , calcitriol (D) 200 nM, ambas drogas de manera combinada o etanol (vehículo) durante 96 h y la expresión génica de *Bcl-2* se evaluó por PCR en tiempo real. Los valores corresponden a las medias \pm error estándar de la expresión del gen *Bcl-2* normalizada a la del gen *18S* relativa al grupo Control (valor media de Ct de las muestras tratadas con vehículo). Los valores provienen de 3 experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por duplicado. * $p < 0,05$ vs control.

EFFECTOS DE CALCITRIOL Y BSO SOBRE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR DE LAS CÉLULAS CACO-2

La actividad de FAL, enzima marcadora de diferenciación celular, no se modificó con las distintas drogas a las 6 y 48 h de tratamiento. En cambio, a las 96 h la actividad de esta enzima aumentó en las células tratadas con calcitriol y con BSO + calcitriol (Fig. 20).

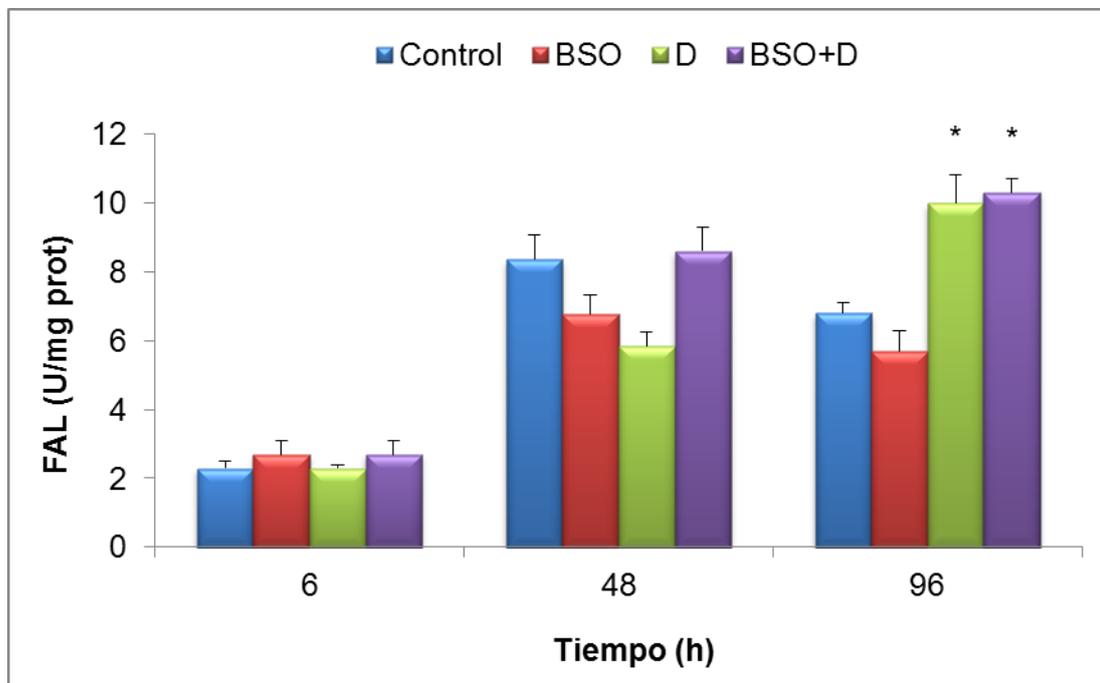
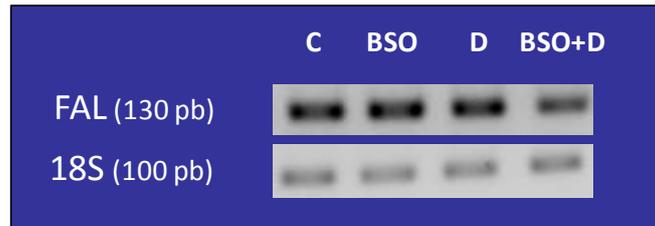


Fig. 20: Efecto de BSO y calcitriol sobre la actividad de FAL. Las células Caco-2 se trataron con BSO 100 μ M, calcitriol (D) 200 nM, con ambas drogas o etanol (vehículo) durante 6, 48 y 96 h. Los valores de la actividad enzimática se expresan como medias \pm error estándar y corresponden a 4 experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por triplicado. * $p < 0,05$ vs control 96 h.

Se evaluó también por RT-PCR la expresión génica de FAL en células tratadas con BSO y/o calcitriol durante 96 h. Los tratamientos individuales no modificaron los niveles de ARN mensajero en comparación con los de las células controles. Sin embargo, la combinación de BSO + calcitriol produjo disminución significativa en la expresión de este gen (Fig. 21).

A



B

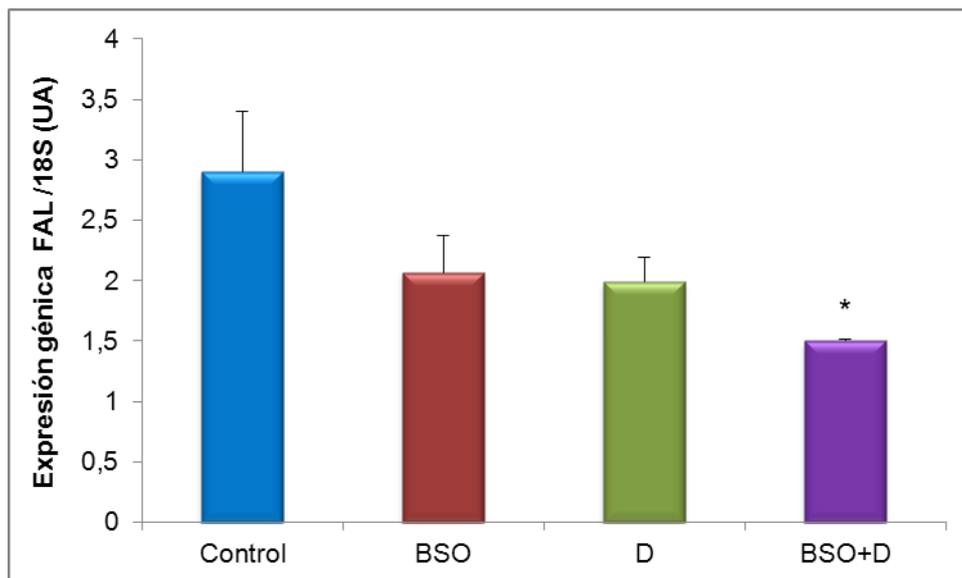


Fig. 21: Efecto de BSO y calcitriol sobre los niveles de ARNm del gen de FAL. Las células Caco-2 se trataron con BSO 100 μ M, calcitriol (D) 200 nM, ambas drogas conjuntas o etanol (vehículo) durante 96 h. A: la expresión del gen de FAL de células bajo los distintos tratamientos se evaluó por RT-PCR. B: Las bandas de PCR se cuantificaron por densitometría y los valores se normalizaron a la expresión del gen ribosomal 18S. * $p < 0.05$ vs control, BSO y D. Los valores corresponden a cuatro experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por duplicado.

EFFECTO DE CALCITRIOL Y BSO SOBRE LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS CACO-2

La migración de las células Caco-2 bajo los distintos tratamientos se evaluó mediante el ensayo de la “herida”. Esta técnica tiene como propósito el estudio de la migración celular y se basa en la observación del comportamiento de una monocapa confluyente de células a las que previamente se le ha realizado una interrupción de la confluencia (Rodríguez y col., 2005). Como muestra la Fig. 22 A, las células tratadas con BSO, calcitriol y BSO + calcitriol durante 6 h muestran mayor ancho de la herida que las células controles. Las cuantificaciones se realizaron mediante el programa Image J y se detallan en la Fig. 22 B.

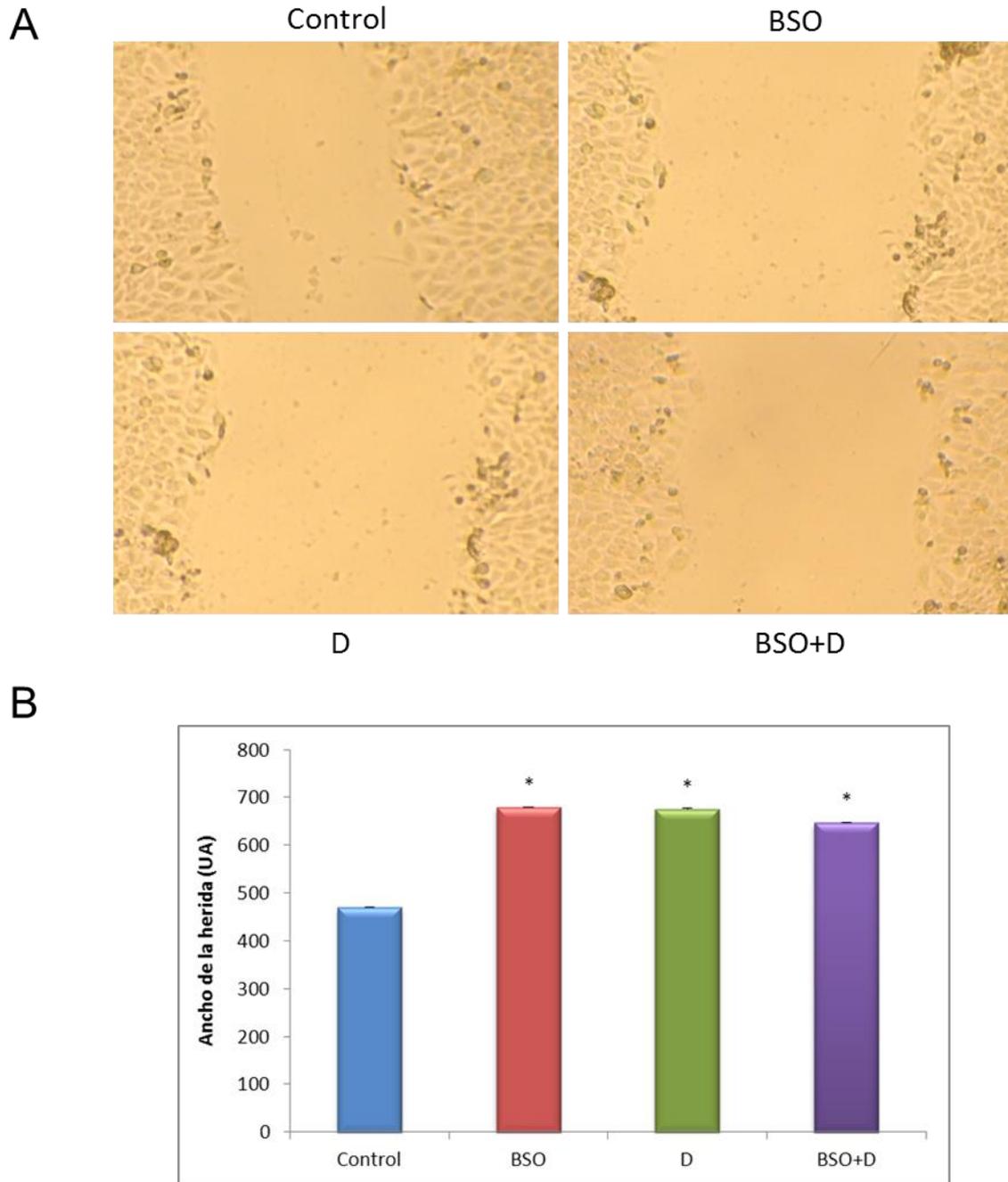


Fig. 22: Efecto de BSO y calcitriol sobre la migración celular. Las células Caco-2 se trataron con BSO 100 μ M, calcitriol (D) 200 nM, ambas drogas de manera combinada o etanol (vehículo) durante 6 h y la migración celular se analizó por el ensayo de la “herida”. A: imágenes del ancho de las heridas de las células bajo los distintos tratamientos, B: la cuantificación del ancho de las mismas se realizó mediante el programa ImageJ y se expresó como unidades arbitrarias (UA). Los valores corresponden a tres experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por sextuplicado. Amplificación de la Imagen: 150X. * $p < 0.05$ vs control.

EFFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR PROVOCADA POR BSO Y CALCITRIOL

Como se observó en experimentos anteriores, el tratamiento combinado de BSO + calcitriol (96 h) inhibió notablemente la proliferación de las células Caco-2, efecto causado al menos en parte por alteración del sistema redox celular. Para demostrar que el estrés oxidativo está involucrado en la inhibición de la proliferación, las células se trataron con BSO 100 μ M + calcitriol 200 nM en forma simple o combinada con el antioxidante ácido ascórbico 100 μ M. La dosis de vit C utilizada en este estudio se encuentra dentro del rango normal en plasma sanguíneo humano (Finglas y col., 1993). La Fig. 23 muestra que el tratamiento con vit C no modifica la proliferación celular. Sin embargo, el agregado de ácido ascórbico al tratamiento de BSO + D protege parcialmente a las células del efecto antiproliferativo causado por el tratamiento conjunto. De esta manera, se comprueba que, al impedirse el estrés oxidativo por acción del ácido ascórbico, el efecto antiproliferativo de BSO + D es significativamente menor.

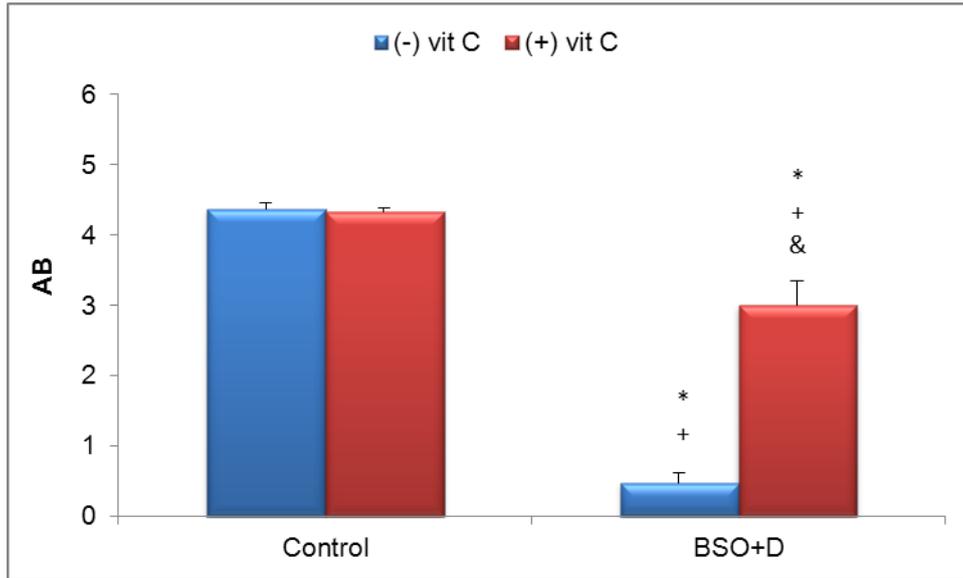


Fig. 23: Efecto del ácido ascórbico sobre la inhibición de la proliferación celular producida por BSO + calcitriol. Las células Caco-2 se trataron con BSO 100 μ M + calcitriol (D) 200 nM y/o ácido ascórbico (vit C) 100 μ M durante 96 h. Los valores representan las medias \pm error estándar de las absorbencias, parámetro indicativo de densidad celular y, corresponden a cuatro experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por sextuplicado. AB: absorbencia. * $p < 0,05$ vs control (-) vit C, + $p < 0,05$ vs control (+) vit C, & $p < 0,05$ vs BSO+D (-) vit C.

EFFECTO DE CALCITRIOL Y BSO SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE OTRAS LÍNEAS CELULARES EPITELIALES DE CÁNCER DE COLON, MAMA Y LARINGE

Para comprobar si los tratamientos con BSO y/o calcitriol utilizados en las células Caco-2 (BSO 100 μ M y D 200 nM, 96 h) afectan la proliferación de diferentes tipos de cánceres epiteliales, se evaluó la densidad de células derivadas de adenocarcinoma de colon (HT-29), mama (MCF-7) y de carcinoma de laringe (Hep-2). La Fig. 24 muestra que el tratamiento con BSO disminuyó la proliferación de las células HT-29, MCF-7 y Hep-2, efecto que resultó ser menos pronunciado que el observado en las células Caco-2. Por el contrario, la acción antiproliferativa producida por calcitriol (D) sobre las células epiteliales evaluadas fue mayor que en las Caco-2. La combinación de BSO + D produjo efecto más pronunciado que los tratamientos individuales en todos los tipos celulares.

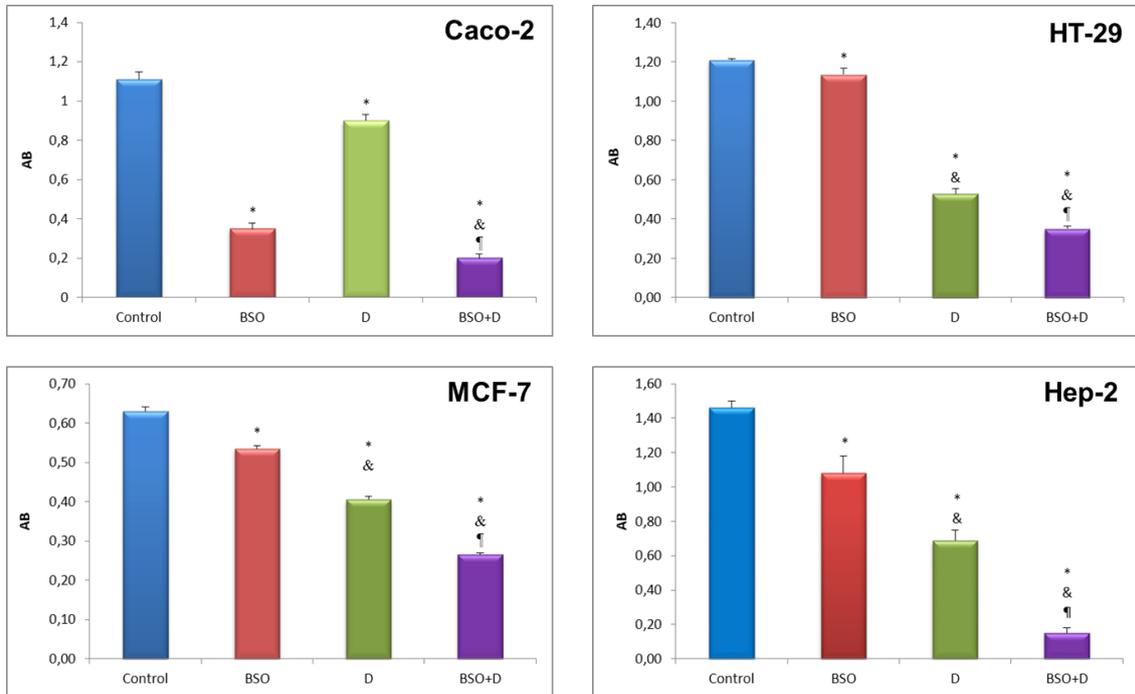


Fig. 24: Efecto de BSO y calcitriol sobre la proliferación de células de cáncer de colon, mama y laringe. Las células HT-29, MCF-7 y Hep-2 derivadas de cáncer de colon, mama y laringe respectivamente, se trataron con BSO 100 μ M, calcitriol (D) 200 nM o con ambas drogas de manera combinada durante 96 h. Los valores representan las medias \pm error estándar de las absorbancias y corresponden a cuatro experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por sextuplicado. AB: absorbancia, parámetro indicativo de densidad celular. * $p < 0,05$ vs control, & $p < 0,05$ vs BSO, † $p < 0,05$ vs D.

RESUMEN DE LOS EFECTOS PRODUCIDOS POR BSO Y CALCITRIOL SOBRE LAS CÉLULAS CACO-2

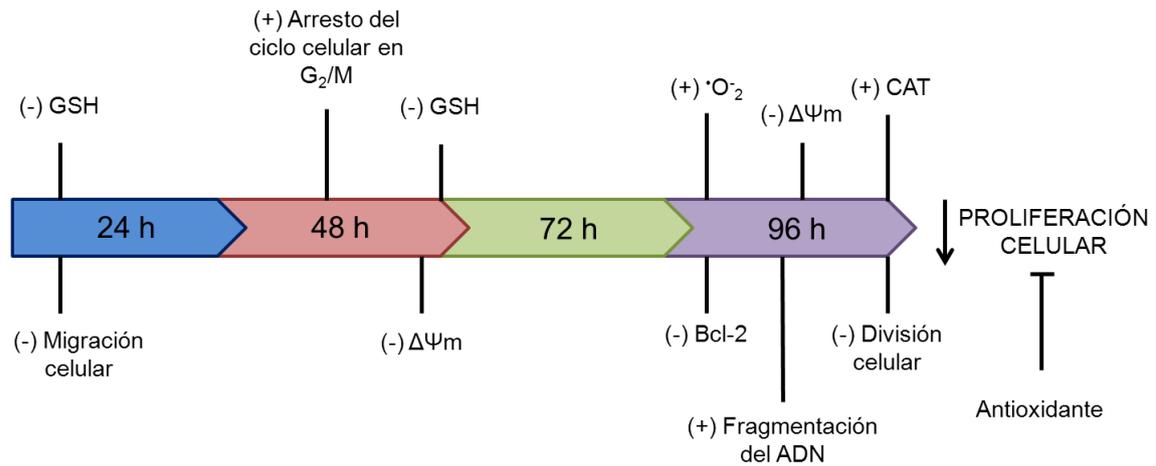


Fig. 25: Efectos del BSO + calcitriol sobre las células Caco-2. Las células se trataron con BSO 100 μM + calcitriol 200 nM durante diferentes tiempos. Línea que representa los eventos celulares que preceden a la acción antiproliferativa del tratamiento combinado.

DISCUSIÓN

El presente trabajo demuestra que tanto el BSO, inhibidor de la síntesis de GSH, como el calcitriol, metabolito activo de la vitamina D, producen acción antiproliferativa sobre las células de cáncer de colon Caco-2. El tratamiento conjunto de BSO y calcitriol incrementa la inhibición de la proliferación celular por encima de los efectos individuales de cada una de las drogas, siendo los mismos dependientes de la dosis y del tiempo de exposición. La acción antiproliferativa de BSO y calcitriol comienzan a las 48 y 72 h respectivamente, mientras que la potenciación por el tratamiento combinado se produce a las 96 h. Con el propósito de dilucidar los mecanismos que participan en la acción antiproliferativa producida por BSO y calcitriol sobre las células Caco-2, evaluamos el efecto de las drogas sobre la división y ciclo celular y ciertos parámetros representativos del estado redox, de la diferenciación y, finalmente, de la muerte celular.

El BSO es una droga inhibidora de la síntesis de GSH y ha sido probada para el tratamiento contra el cáncer con el fin de aumentar la sensibilidad de las células tumorales resistentes a las terapias convencionales (Bailey y col., 1998). La acción antiproliferativa de BSO a las 96 h se acompaña con alteración de la morfología celular, disminución en la expresión génica de Bcl-2, incremento en la producción de $\cdot\text{O}_2$ y en la fragmentación del ADN. A tiempos menores de tratamiento, el BSO produce depleción de GSH, que se inicia a las 6 h, continúa a las 48 h y retorna a los valores controles a las 96 h. BSO altera el potencial de membrana mitocondrial a las 48 h, posiblemente como consecuencia de la disminución de los niveles de GSH. Pese a que la depleción de GSH podría modificar la respuesta del sistema enzimático antioxidante, no se observa alteración de los parámetros analizados.

El efecto antiproliferativo producido por el calcitriol está mediado por disminución en el potencial de membrana mitocondrial, aumento en la fragmentación del ADN y en la actividad de FAL. Estas alteraciones podrían ser una expresión de estrés oxidativo, muerte y diferenciación celular respectivamente, ya que se conoce que el esteroide está involucrado en estos procesos (Halline y col., 1994; Bohl y col., 2012). A diferencia del BSO, el calcitriol no produce alteraciones en los niveles de GSH y de $\cdot\text{O}_2$. Similarmente, Koren y col. (2000) encontraron que células derivadas de cáncer de mama tratadas con calcitriol durante 48 h no presentaron modificaciones en los niveles

intracelulares del tripeptido. En cuanto al contenido de ERO, el tratamiento con el secoesteroide de células del sistema inmune (dendríticas y linfocitos T) tampoco alteró el contenido de las especies oxidantes (Ferreira y col., 2013).

A las 96 h del tratamiento de las células Caco-2 con BSO y calcitriol se observa pronunciada alteración de la morfología celular, disminución en la división celular (mitosis) y aumento en la actividad de FAL. El estado redox de las células tratadas con ambas drogas también se modifica, como se pone en evidencia por el aumento en los niveles de $\cdot O_2$, en la actividad de CAT y disminución del potencial de membrana mitocondrial. A tiempos menores, el tratamiento combinado induce arresto del ciclo celular en fase G₂/M. En conjunto, estos datos sugieren que BSO + calcitriol producen disminución de la proliferación celular vía inducción de estrés oxidativo, arresto del ciclo celular y diferenciación celular.

Nuestros datos muestran que el calcitriol reduce la proliferación de las células Caco-2 en un 20% y confirman el efecto inhibitorio del secoesteroide en esta línea celular demostrado previamente por Chen y col. (2002). Si bien una de las funciones más caracterizada de 1,25(OH)₂D₃ es el aumento de la absorción intestinal de calcio y fósforo, la inhibición de la proliferación se considera una acción “no clásica”. Este efecto es más pronunciado en las células MCF-7, Hep-2 y HT-29 ya que disminuye la proliferación celular en un 40 %, 50% y 60%, respectivamente. En contraste, el efecto antiproliferativo del BSO es más marcado en las células Caco-2 (60%) que en las células HT-29 (6%), MCF-7 (15%) y Hep-2 (25%). Aunque la sensibilidad de las células epiteliales a las drogas sea diferente, la inhibición de la proliferación producida por BSO en combinación con calcitriol es mayor a los tratamientos individuales en todos los tipos celulares. Estos resultados sugieren que los tratamientos con BSO, calcitriol y BSO + calcitriol son efectivos para inhibir la proliferación de células cancerosas derivadas de diferentes tipos de tejidos.

Actualmente numerosos trabajos demuestran que el estado redox es un importante factor en la determinación de la sensibilidad celular a la quimioterapia. Un estudio llevado a cabo por Hanot y col. (2012) demuestra que las células que sobreexpresan GSH son más resistentes a los tratamientos terapéuticos que las que poseen niveles más bajos del tripeptido. Estos autores también observan que la terapia

combinada con agentes que deplecionan GSH y radioterapia aumenta el daño al ADN. En este sentido, Maeda y col. (2004) demostraron que el BSO aumenta el efecto antiproliferativo del trióxido de arsénico en células derivadas de cáncer de próstata, mama, pulmón, intestino, útero, vejiga y riñón. Similarmente, el pretratamiento de células HepG2 con BSO aumenta la citotoxicidad producida por el ácido acetilsalicílico y en consecuencia, la muerte celular (Raza y col., 2012).

El GSH y las enzimas SOD y CAT son moléculas representativas e importantes del sistema antioxidante celular (Kruidenier y col, 2002). Por otra parte, el estrés oxidativo provoca daños sobre la función mitocondrial y la integridad del ADN (Taha y col., 2010). El tratamiento combinado de BSO + calcitriol aumenta la actividad de la enzima CAT y disminuye los niveles de GSH total, datos que sugieren que las células tratadas con la combinación de drogas son más sensibles a la muerte celular debido a que se altera su sistema antioxidante. La protección producida por el ácido ascórbico sobre el efecto antiproliferativo causado por BSO + calcitriol en las células Caco-2 comprueba que la disminución de la densidad celular está mediada, al menos en parte, por alteración del sistema redox celular. El mecanismo por el cual la vitamina C actúa como potente agente antioxidante es a través del restablecimiento de los niveles de glutatión reducido (Zhang y col., 2010). Sin embargo, no se descarta que otros mecanismos moleculares puedan estar involucrados ya que la inhibición de la vitamina C es parcial.

En relación con el ciclo celular, a tiempos menores de tratamiento, BSO + calcitriol inducen acumulación de las células en fase G₂/M. Dicho evento podría ser uno de los mecanismos responsables de la pronunciada disminución de la proliferación de las células bajo el tratamiento combinado debido a que se encuentra en relación directa con la disminución de la división celular. Similarmente, Odom y col. (2009) demostraron que la alteración en los niveles de GSH produce arresto del ciclo celular en fase G₂/M en células de cáncer de colon HT-29 y que este efecto puede ser prevenido con el agregado de N-acetilcisteína, molécula precursora del GSH. La misma relación encontró el grupo de Whelan y col. (2004) en células Hep-2 derivadas de cáncer de laringe tratadas con capillina en combinación con BSO.

A las 96 h, ninguno de los tratamientos produce modificaciones en la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular. Si bien está descrito que el calcitriol arresta el ciclo celular en fase G_0/G_1 en células MCF-7 (Bohl y col., 2012), el tratamiento con el secoesteroide no modifica la distribución de las células Caco-2 en ninguno de los tiempos evaluados. Scaglione-Sewell y col. (2000) tampoco hallaron alteraciones del ciclo celular en las Caco-2 tratadas con calcitriol durante 3-4 días. Un posible mecanismo que puede explicar la modificación del ciclo celular observada a las 48 h con tratamiento combinado, es el descrito por Díaz Vivancos y col. (2010) e involucra al GSH como molécula clave. Estos autores proponen la necesidad de un ambiente celular levemente oxidado para el pasaje de una célula desde la fase G_1 a la S. En cambio, se requiere de un estado general más reducido para avanzar desde G_2 a M. Estos hallazgos apoyan los resultados obtenidos en nuestro trabajo, ya que la combinación de BSO + calcitriol produce depleción del tripéptido y el posterior arresto del ciclo celular en fase G_2/M .

El arresto del ciclo celular está íntimamente relacionado con el proceso de diferenciación celular (Wang y col., 2005). El tratamiento con BSO + calcitriol induce arresto del ciclo celular y posteriormente aumenta la actividad de FAL, enzima marcadora de diferenciación celular. La alteración del ciclo en cualquiera de sus etapas es necesaria para que una célula se diferencie pero no es suficiente para que el fenotipo se mantenga (Myster y col., 2000). Por esta razón, la inducción de la diferenciación celular que ejerce el calcitriol administrado de manera simple sobre las células Caco-2 es un efecto importante para el mantenimiento de este estado. Cuando la diferenciación celular es inducida, se producen cambios celulares a nivel proteómico que regulan negativamente la expresión de proteínas relacionadas con la proliferación, crecimiento y evolución del fenotipo canceroso. En consecuencia, se promueve el desarrollo de un tipo celular menos agresivo y más sensible a los tratamientos que el de las células indiferenciadas (Buhrke y col., 2011). Más aún, un estudio realizado en células Caco-2 muestra que la estimulación de la diferenciación celular regula negativamente los genes involucrados en el splicing alternativo, la traducción, el plegado y la degradación proteica (Mariadason y col., 2002). Los efectos pro-diferenciales del calcitriol se han demostrados en enterocitos (Fedirko y col., 2009), osteoblastos (Woeckel y col., 2010), monocitos (Di Rosa y col., 2012), adipocitos (Mimitphong y col., 2012), keratinocitos (Rid y col., 2013) y mioblastos (Girgis y col., 2013).

La alteración del estado redox celular está relacionada con la inducción del proceso de diferenciación. Lopez-Posadas y col. (2011) demostraron que el tratamiento de células intestinales con H_2O_2 produce cambios en la glicosilación de FAL y aumento en la actividad de esta enzima. Sin embargo, el incremento de la actividad de FAL de las células Caco-2 tratadas con calcitriol, no se acompaña con aumento en su expresión génica. Por el contrario, los niveles de ARNm de FAL en células tratadas con BSO + calcitriol son menores que los valores controles. La aparente dicotomía que sugiere este resultado podría deberse a la existencia de modificaciones postraduccionales que regularían la actividad de esta enzima (Limaye y col., 2003). Tal vez, el estrés oxidativo generado por el tratamiento combinado esté afectando la expresión no sólo del gen de FAL sino también de otros genes (Morel y col., 1999). Recientemente, un estudio realizado en células óseas tratadas con trióxido de arsénico pone en evidencia que esta droga disminuye la expresión del gen de FAL por alteración del estado redox celular (Hu y col., 2012).

En los últimos años se ha profundizado el estudio de las ERO como posibles blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer. El conocimiento de que la sobreproducción de radicales libres genera daños en los componentes celulares (Valko y col., 2006) y que el nivel de ERO es superior en células cancerosas que en normales (Liou y col., 2010), ha promovido el desarrollo de nuevas terapias antitumorales basadas en la modificación del estado redox celular (Sosa y col., 2013). El principal sitio celular de producción de ERO es la cadena respiratoria (Poyton y col., 2009). Nuestro trabajo muestra que el tratamiento combinado de BSO + calcitriol induce disminución del potencial de membrana mitocondrial, incremento de los niveles de $\cdot O_2$ y de fragmentación del ADN, esta última por encima de los tratamientos individuales. Estas alteraciones podrían ser las causas que promueven la activación de diferentes mecanismos de muerte celular (Kim y col., 2006).

El tratamiento combinado induce disminución en la expresión génica de Bcl-2 y aumento en la fragmentación del material genético nuclear. Si bien ambos procesos están relacionados con la muerte celular por apoptosis, las células Caco-2 no muestran cambios morfológicos ni bioquímicos compatibles con dicho proceso. Bcl-2 es una molécula que forma parte de la familia de proteínas que participan en la inhibición de la apoptosis pero también se encuentra involucrada en la regulación negativa de la muerte

celular por autofagia a través de la inactivación de Beclina 1 (Maiuri y col., 2010). En este mismo sentido, Levine y col. (2005) han reportado que la fragmentación del ADN ocurre como un evento tardío en la autofagia.

La diseminación metastásica de los tumores primarios está directamente relacionada con la supervivencia del paciente y su desarrollo representa el 90 % de las muertes producidas por cáncer (Arlt y col., 2009). La principal complicación que posee el cáncer colorrectal es la invasión celular a otros tejidos y la consecuente formación de estructuras tumorales, generalmente en el hígado (Young y col., 2013). El ensayo de la herida muestra que la migración de las células Caco-2 es más lenta con los tratamientos de BSO, calcitriol y BSO + calcitriol y sugiere que las drogas no sólo inhiben la proliferación celular, sino que también alteran la capacidad de invasión de las células neoplásicas.

En el presente trabajo se describe que el efecto antiproliferativo de la combinación de BSO + calcitriol sobre las células Caco-2 en cultivo está mediado por alteraciones en el estado redox celular. Sin embargo, el mecanismo por el cual ambas drogas están actuando es aún desconocido. Posiblemente la molécula nexo responsable del efecto sinérgico de BSO y calcitriol sea AP-1, factor de transcripción inducido por calcitriol y ERO cuya función es regular la proliferación, diferenciación y muerte celular (Chen y col., 1999; Korbecki y col., 2013). En este sentido, Shukla y col. (2004) demostraron que la capacidad de unión de AP-1 al ADN es dependiente de los niveles de GSH intracelular.

La combinación de estrés oxidativo y diferenciación celular podría aumentar la sensibilidad de las células a la muerte (Buhrke y col., 2011). Estudios realizados en células de cáncer de distintos órganos sugieren que la administración de drogas oxidantes en forma combinada con otros fármacos promueve muerte celular por aumento de los niveles de oxidantes endógenos (Marchionatti y col., 2009) y por disminución de las defensas antioxidante celulares (Zhao y col., 2012). Actualmente, numerosos estudios demuestran que el estado redox es un importante aspecto a tener en cuenta en la determinación de la sensibilidad celular a la quimioterapia (Maeda y col., 2004; Buhrke y col., 2011).

En conclusión, este trabajo de investigación demuestra que el efecto antiproliferativo causado por BSO y calcitriol es mediado por alteración en el estado redox celular y por inducción de la diferenciación celular. Al mismo tiempo manifiesta que la utilización de esta combinación de drogas como agentes antitumorales es extensivo a diferentes cánceres epiteliales ya que la administración de BSO y calcitriol en forma simple o combinada disminuye la proliferación celular en otras líneas de células epiteliales cancerosas. Futuros estudios *in vivo* podrían corroborar que los efectos observados *in vitro* con el tratamiento combinado de BSO y calcitriol producen inhibición de la proliferación de células neoplásicas intestinales, constituyéndose una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de cáncer de colon.

CONCLUSIÓN

Tanto BSO como calcitriol inhiben la proliferación de las células Caco-2, efecto que se potencia con el tratamiento combinado. El mecanismo antiproliferativo está mediado por estrés oxidativo, que se pone en evidencia por la depleción de GSH, el aumento de los niveles de $\cdot\text{O}_2$ y la disminución del potencial de membrana mitocondrial. Como respuesta compensatoria al estrés oxidativo se produce aumento en la actividad de catalasa, la cual no puede contrarrestar el efecto antiproliferativo producido por los tratamientos. El ácido ascórbico, potente antioxidante, protege del efecto antiproliferativo producido por BSO + calcitriol y prueba que la inhibición de la proliferación celular es producida, al menos en parte, por alteración del estado redox celular. BSO en combinación con calcitriol induce arresto del ciclo celular y, en consecuencia, disminución del número de células en fase de mitosis. La fragmentación del ADN y la disminución de la expresión génica de *Bcl-2* producida por las drogas podrían ser una expresión de muerte celular debido a que ambos eventos son compartidos por la autofagia y la apoptosis. BSO y calcitriol, empleados de manera simple o combinada no solo inhiben la proliferación de las células Caco-2 sino que también inducen disminución en la migración celular. El efecto antiproliferativo de los tratamientos también se observa en células HT-29, Hep-2 y MCF-7. En resumen, el arresto del ciclo y la inducción de la diferenciación celular son mecanismos que, en combinación con la alteración del estado redox celular, podrían estar involucrados en el incremento de la sensibilidad a la muerte de las células Caco-2.

BIBLIOGRAFÍA

Anderson M.E., Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* (1985) 113: 548-555.

Arlt F., Stein U. Colon cancer metastasis: MACC1 and Met as metastatic pacemakers. *Int J Biochem Cell Biol* (2009) 41: 2356-2359.

Bailey H.H., L-S,R-buthionine sulfoximine: historical development and clinical issues. *Chem Biol Interact* (1998) 112: 239-254.

Bao B.Y., Ting H.J., Hsu J.W., Lee Y.F. Protective role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. *Int J Cancer*. (2008) 122: 2699-2706.

Berger S.J., Gosky D., Zborowska E., Willson J.K., Berger N.A. Sensitive enzymatic cycling assay for glutathione: measurements of glutathione content and its modulation by buthionine sulfoximine in vivo and in vitro in human colon cancer. *Cancer Res* (1994) 54: 4077-4083.

Bohl L.P., Liaudat A.C., Picotto G., Marchionatti A.M., Narvaez C.J., Welsh J., Rodriguez V.A., Tolosa de Talamoni N.G. Buthionine sulfoximine and 1,25-dihydroxyvitamin D induce apoptosis in breast cancer cells via induction of reactive oxygen species. *Cancer Invest* (2012) 30: 560-570.

Boveris A. La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. *Academia Iberoamericana de Farmacia* (2005) 46: 85-95.

Bradford M. A dye binding assay for protein. *Anal. Biochem* (1976) 72: 248-254.

Buhrke T., Lengler I., Lampen A. Analysis of proteomic changes induced upon cellular differentiation of the human intestinal cell line Caco-2. *Dev Growth Differ* (2011) 53: 411-426.

Burke A.J., Sullivan F.J., Giles F.J., Glynn S.A. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis* (2013) 34: 503-512.

Burman C., Ktistakis N.T., Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Letters* (2010) 584: 1302-1312.

Campos L.T., Brentani H., Roela R.A., Katayama M.L., Lima L., Rolim C.F., Milani C., Folgueira M.A., Brentani M.M. Differences in transcriptional effects of $1\alpha,25$ dihydroxyvitamin D₃ on fibroblasts associated to breast carcinomas and from paired normal breast tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2013) 133: 12-24.

Casimiro M.C., Crosariol M., Loro E., Li Z., Pestell R.G. Cyclins and cell cycle control in cancer and disease. *Genes Cancer* (2012) 3: 649-657.

Cara C.J., Pena A.S., Sans M., Rodrigo L., Guerrero-Esteo M., Hinojosa J., García-Paredes J., Guijarro L.G. Reviewing the mechanism of action of thiopurine drugs: towards a new paradigm in clinical practice. *Med Sci Monit* (2004) 10: 26-30.

Chaiswing L., Zhong W., Oberley T.D. Distinct Redox Profiles of Selected Human Prostate Carcinoma Cell Lines: Implications for Rational Design of Redox Therapy. *Cancers* (2011) 3: 3557-3584.

Chen A., Davis B.H., Bissonnette M., Scaglione-Sewell B., Brasitus T.A. $1,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ stimulates activator protein-1-dependent Caco-2 cell differentiation. *J Biol Chem* (1999) 274: 35505-35513.

Chen A., Davis B.H., Sitrin M.D., Brasitus T.A., Bissonnette M. Transforming growth factor-beta 1 signaling contributes to Caco-2 cell growth inhibition induced by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2002) 283: G864-G874.

Chen T.C., Kittaka A. Novel vitamin d analogs for prostate cancer therapy. *ISRN Urol* (2011) 301490: 19-22.

Chiang K.C., Chen T.C. Vitamin D for the prevention and treatment of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* (2009) 15: 3349-3354.

Chua G.T., Chan Y.C., Cheng S.W. Vitamin D status and peripheral arterial disease: evidence so far. *Vasc Health Risk Manag* (2011) 7: 671-675.

Chung I., Yu W.D., Karpf A.R., Flynn G., Bernardi R.J., Modzelewski R.A., Johnson C.S., Trump D.L. Anti-proliferative effects of calcitriol on endothelial cells derived from two different microenvironments. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2007) 103: 768-770.

Cosentino S., Gravaghi C., Donetti E., Donida B.M., Lombardi G., Bedoni M., Fiorilli A., Tettamanti G., Ferraretto A. Caseinphosphopeptide-induced calcium uptake in human intestinal cell lines HT-29 and Caco2 is correlated to cellular differentiation. *J Nutr Biochem* (2010) 21: 247-254.

Costa J.L., Eijk P.P., van de Wiel M.A., ten Berge D., Schmitt F., Narvaez C.J., Welsh J., Ylstra B. Anti-proliferative action of vitamin D in MCF7 is still active after siRNA-VDR knock-down. *BMC Genomics* (2009) 10: 499.

Cross H.S., Vitamin D: synthesis and catabolism considerations for cancer causation and therapy, en *Vitamin D and Cancer*, Springer Science: Nueva York. (2011) 1-24.

Cuello Carrión D., Ciocca D., Apoptosis y Cáncer, in *Apoptosis y Cáncer*, B. RD and S. OG. Dunken: Capital Federal, Buenos Aires, Argentina. (2003) 265-278.

Darzynkiewicz Z. *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. Celis JE, Academic Press, Inc: San Diego, CA (1994) 261.

Deeb K.K., Trump D.L., Johnson C.S. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* (2007) 7: 684-700.

Di Rosa M., Malaguarnera G., De Gregorio C., Palumbo M., Nunnari G., Malaguarnera L. Immuno-modulatory effects of vitamin D3 in human monocyte and macrophages. *Cell Immunol* (2012) 280: 36-43.

Diaz G.D., Paraskeva C., Thomas M.G., Binderup L., Hague A. Apoptosis is induced by the active metabolite of vitamin D3 and its analogue EB1089 in colorectal adenoma and carcinoma cells: possible implications for prevention and therapy. *Cancer Res* (2000) 60: 2304-2312.

Diaz Vivancos P., Wolff T., Markovic J., Pallardó F.V., Foyer C.H. A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochem J* (2010) 431: 169-178.

Diaz-Moralli S., Tarrado-Castellarnau M., Miranda A., Cascante M. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol Ther* (2013) 138: 255-271.

El-Domyati M., Barakat M, Abdel-Razek R, El-Din Anbar T. Apoptosis, P53 and Bcl-2 expression in response to topical calcipotriol therapy for psoriasis. *Int J Dermatol* (2007) 46: 468-474.

Eskelinen E.L. and Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta* (2009) 4: 664-673.

Fedirko V., Bostick R.M., Flanders W.D., Long Q., Sidelnikov E., Shaukat A., Daniel C.R., Rutherford R.E., Woodard J.J. Effects of vitamin D and calcium on proliferation and differentiation in normal colon mucosa: a randomized clinical trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2009) 18: 2933-2941.

Ferreira G.B., Overbergh L., Verstuyf A., Mathieu C. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ and its analogs as modulators of human dendritic cells: a comparison dose-titration study. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2013) 136: 160-165.

Finglas P.M., Baily A., Walker A., Loughridge J.M., Wright A.J., Southon S. Vitamin C intake and plasma ascorbic acid concentration in adolescents. *Br. J. Nutr* (1993) 69: 563-576.

Fulda S., Gorman A.M., Hori O., Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol* (2010) 2010: 214074.

Garland C.F., Gorham E.D., Mohr S.B., Garland F.C. Vitamin D for cancer prevention: global perspective. *Ann Epidemiol* (2009) 19: 468-483.

Gauthier R., Harnois C., Drolet J.F., Reed J.C., Vézina A., Vachon P.H. Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* (2001) 280: C1540-1554.

Giles G.I. The redox regulation of thiol dependent signaling pathways in cancer. *Curr Pharm Des* (2006) 12: 4427-4443.

Girgis C.M., Clifton-Bligh R.J., Hamrick M.W., Holick M.F., Gunton J.E. The roles of vitamin D in skeletal muscle: form, function, and metabolism. *Endocr Rev* (2013) 34: 33-83.

Giuliano A.R., Franceschi R.T., Wood, R.J. Characterization of the vitamin D receptor from the Caco-2 human colon carcinoma cell line: effect of cellular differentiation. *Arch Biochem Biophys* (1991) 285: 261-269.

Halline A.G., Davidson N.O., Skarosi S.F., Sitrin M.D., Tietze C., Alpers D.H., Brasitus T.A. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on proliferation and differentiation of Caco-2 cells. *Endocrinology* (1994) 134: 1710-1717.

Hanot M., Boivin A., Malésys C., Beuve M., Colliaux A., Foray N., Douki T., Ardail D., Rodriguez-Lafrasse C. Glutathione depletion and carbon ion radiation potentiate clustered DNA lesions, cell death and prevent chromosomal changes in cancer cells progeny. *PLoS One* (2012) 7: e44367.

He Y., Ge J., Tombran-Tink J. Mitochondrial defects and dysfunction in calcium regulation in glaucomatous trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2008) 49: 4912-4922.

Hernandez-Breijo B., Monserrat J., Ramírez-Rubio S., Cuevas E.P., Vara D., Díaz-Laviada I., Fernández-Moreno M.D., Román I.D., Gisbert J.P., Guijarro L.G. Preclinical evaluation of azathioprine plus buthionine sulfoximine in the treatment of human hepatocarcinoma and colon carcinoma. *World J Gastroenterol* (2011) 17: 3899-3911.

Holt P.R., Bresalier R.S., Ma C.K., Liu K.F., Lipkin M., Byrd J.C., Yang K. Calcium plus vitamin D alters preneoplastic features of colorectal adenomas and rectal mucosa. *Cancer* (2006) 106: 287-296.

Hu Y.C., Cheng H.L., Hsieh B.S., Huang L.W., Huang T.C., Chang K.L. Arsenic trioxide affects bone remodeling by effects on osteoblast differentiation and function. *Bone* (2012) 50: 1406-1415.

Ishibashi M., Arai M., Tanaka S., Onda K., Hirano T. Antiproliferative and apoptosis-inducing effects of lipophilic vitamins on human melanoma A375 cells in vitro. *Biol Pharm Bull* (2012) 35: 10-17.

Johnson L.V., Walsh M.L., Bockus B.J. Chen LB Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *J Cell Biol.* (1981) 88: 526-535.

Kim R., Emi M., Tanabe K., Murakami S., Uchida Y., Arihiro K. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J Pathol* (2006) 208: 319-326.

Korbecki J., Baranowska-Bosiacka I., Gutowska I., Chlubek D. The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. *J Physiol Pharmacol* (2013) 64: 409-421.

Koren R., Ravid A., Vitamin D and cellular response to oxidative stress, in *Vitamin D*, D. Feldman, El sevier: Burlington, MA, USA. (2005) 761-770.

Koren R., Rucker D., Kotestiano O., Liberman U.A., Ravid A. Synergistic anticancer activity of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and immune cytokines: the involvement of reactive oxygen species. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2000) 73: 105-112.

Koren R., Wacksberg S., Weitsman G.E., Ravid A. Calcitriol sensitizes colon cancer cells to H₂O₂-induced cytotoxicity while inhibiting caspase activation. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2006) 101: 151-160.

Krishnan A.V., Feldman D., Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2011) 51: 311-336.

Kroemer G., El-Deiry W.S., Golstein P., Peter M.E., Vaux D., Vandenabeele P., Zhivotovsky B., Blagosklonny M.V., Malorni W., Knight R.A., Piacentini M., Nagata

S., Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* (2005) 12: 1463-1467.

Kruidenier L., Verspaget H., Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther* (2002) 16: 1997-2015.

Lee J., Giordano S., Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J* (2012) 441: 523-540.

Levine B., Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* (2005) 115: 2679-2688.

Li Z.Y., Yang Y., Ming M., Liu B. Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* (2011) 414: 5-8.

Limaye P.V., Raghuram N., Sivakami S. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* (2003) 243: 147-152.

Liou G.Y., Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* (2010) 44: 479-96.

Livak K., Schmittgen T. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods* (2001) 25: 402-408.

Lopez-Posadas R., Gonzalez R., Ballester I., Martinez-Moya P., Romero-Calvo I., Suarez M.D, Zarzuelo A., Martínez-Augustin O., Sánchez de Medina F. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is activated in enterocytes by oxidative stress via changes in glycosylation. *Inflamm Bowel Dis* (2011) 17: 543-556.

Maeda H., Hori S., Ohizumi H., Segawa T., Kakehi Y., Ogawa O., Kakizuka A. Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of arsenic trioxide and L-buthionine-sulfoximine. *Cell Death Differ* (2004) 11: 737-746.

Maiuri M.C., Criollo A., Kroemer G. Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome. *EMBO J* (2010) 29: 515-6.

Mammucari C., Rizzuto R. Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging. *Mech Ageing Dev* (2010) 131: 536-543.

Marchionatti A.M., Díaz de Barboza G.E., Centeno V.A., Alisio A.E., Tolosa de Talamoni N.G. Effects of a single dose of menadione on the intestinal calcium absorption and associated variables. *J Nutr Biochem* (2003) 14: 466-472.

Marchionatti A.M., Perez A.V., Diaz de Barboza G.E., Pereira B.M., Tolosa de Talamoni N.G. Mitochondrial dysfunction is responsible for the intestinal calcium absorption inhibition induced by menadione. *Biochim Biophys Acta* (2008) 2: 101-107.

Marchionatti A.M., Picotto G., Narvaez C.J., Welsh J., Tolosa de Talamoni N.G. Antiproliferative action of menadione and 1,25(OH)₂D₃ on breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2009) 113: 227-232.

Mariadason J.M., Arango D., Corner G.A., Arañes M.J., Hotchkiss K.A., Yang W., Augenlicht L.H. A gene expression profile that defines colon cell maturation in vitro. *Cancer Res* (2002) 62: 4791-4804.

Mizushima N., Levine B., Cuervo A.M., Klionsky D.J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* (2008) 451: 1069-1075.

Moan J., Porojnicu A., Lagunova Z., Berg J.P., Dahlback A. Colon cancer: prognosis for different latitudes, age groups and seasons in Norway. *J Photochem Photobiol B* (2007) 89: 148-155.

Monteiro J.P., Martins A.F., Nunes C., Morais C.M., Lúcio M., Reis S., Pinheiro T.J., Geraldes C.F., Oliveira P.J., Jurado A.S. A biophysical approach to menadione membrane interactions: Relevance for menadione-induced mitochondria dysfunction and related deleterious/therapeutic effects. *Biochim Biophys Acta* (2013) 13: 1899-1908.

Morel Y., Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* (1999) 3: 481-496.

Myster D.L., Duronio R.J. To differentiate or not to differentiate? *Curr Biol* (2000) 10: R302-R304.

Nakanishi Y., Shiraha H., Nishina S., Tanaka S., Matsubara M., Horiguchi S., Iwamuro M., Takaoka N., Uemura M., Kuwaki K., Hagihara H., Toshimori J., Ohnishi H., Takaki A., Nakamura S., Kobayashi Y., Nouse K., Yagi T., Yamamoto K. Loss of runt-related transcription factor 3 expression leads hepatocellular carcinoma cells to escape apoptosis. *BMC Cancer* (2011) 11: 3.

Narvaez C.J., Welsh J. Role of mitochondria and caspases in vitamin D-mediated apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem* (2001) 276: 9101-9107.

Nimitphong H., Holick M.F., Fried S.K., Lee M.J. 25-hydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ promote the differentiation of human subcutaneous preadipocytes. *PLoS One* (2012) 7: e52171.

Odom R.Y., Dansby M.Y., Rollins-Hairston A.M., Jackson K.M., Kirilin W.G. Phytochemical induction of cell cycle arrest by glutathione oxidation and reversal by N-acetylcysteine in human colon carcinoma cells. *Nutr Cancer* (2009) 61: 332-339.

Pattingre S., Levine B., Bcl-2 Inhibition of Autophagy: A New Route to Cancer? *Cancer Res* (2006) 66: 2885-2888.

Perez A., Centeno V.A, Tolosa de Talamoni N.G. Molecular mechanisms involved in the enhancement of mitochondrial malate dehydrogenase activity by calcitriol in chick intestine. *J Nutr Biochem* (2010) 21: 1232-1237.

Plati J., Bucur O., and Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol* (2011) 3: 279-296.

Poyton R.O., Ball K.A., Castello P.R. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab* (2009) 20: 332-340.

Rabinowitz J.D., White E. Autophagy and Metabolism. *Science* (2010) 330: 1344-1348.
Raman M., Milestone A.N., Walters J.R., Hart A.L., Ghosh S., Vitamin D and gastrointestinal diseases: inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Therap Adv Gastroenterol* (2011) 4: 49-62.

Raza H., John A. Implications of altered glutathione metabolism in aspirin-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in HepG2 cells. *PLoS One* (2012) 7: 30.

Rid R., Onder K., Trost A., Bauer J., Hintner H., Ritter M., Jakab M., Costa I., Reischl W., Richter K., MacDonald S., Jendrach M., Bereiter-Hahn J., Breitenbach M. H₂O₂-dependent translocation of TCTP into the nucleus enables its interaction with VDR in human keratinocytes: TCTP as a further module in calcitriol signalling. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2010) 118: 29-40.

Robbins y Cotran, Neoplasias, Patología estructural y funcional. 8^a ed., Barcelona, España: Elsevier (2011) 262-265.

Rodriguez L.G., Wu X., Guan J. Wound-Healing Assay, Cell Migration, *Methods in Molecular Biology*TM (2005) 294: 23-29

Scaglione-Sewell B.A., Bissonnette M., Skarosi S., Abraham C., Brasitus T.A. A vitamin D₃ analog induces a G1-phase arrest in Caco-2 cells by inhibiting cdk2 and cdk6: roles of cyclin E, p21Waf1, and p27Kip1. *Endocrinology* (2000) 141: 3931-3939.

Serrander L., Cartier L., Bedard K., Banfi B., Lardy B., Plastre O., Sienkiewicz A., Fórró L., Schlegel W., Krause K.H. NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem J* (2007) 406: 105-114.

Shukla A., Flanders T., Lounsbury K.M., Mossman B.T. The gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione regulate asbestos-induced expression of activator protein-1 family members and activity. *Cancer Res* (2004) 64: 7780-7786.

Singh R., Singh R.K., Tripathi A.K., Cornélissen G., Schwartzkopff O., Otsuka K., Halberg F. Chronomics of circulating plasma lipid peroxides and anti-oxidant enzymes

and other related molecules in cirrhosis of liver. In the memory of late Shri Chetan Singh. *Biomed Pharmacother* (2005) 59: S229-S235.

Sosa V., Moliné T., Somoza R., Paciucci R., Kondoh H., LLeonart M.E. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev* (2013) 12: 376-390.

Stumpf W.E., Sar M., Reid F.A., Tanaka Y., DeLuca H.F. Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science* (1979) 206: 1188-1190.

Syng-Ai C., Kumari A.L., Khar A. Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2. *Mol Cancer Ther* (2004) 3: 1101-1108.

Taha R., Seidman E., Mailhot G., Boudreau F., Gendron F.P., Beaulieu J.F., Ménard D., Delvin E., Amre D., Levy E. Oxidative stress and mitochondrial functions in the intestinal Caco-2/15 cell line. *PLoS One* (2010) 5: 0011817.

Tang X.P., Tang G.D., Fang C.Y., Liang Z.H., Zhang L.Y. Effects of ginsenoside Rh2 on growth and migration of pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol* (2013) 19: 1582-1592.

Thomas S., Quinn B.A., Das S.K., Dash R., Emdad L., Dasgupta S., Wang X.Y., Dent P., Reed J.C., Pellecchia M., Sarkar D., Fisher P.B. Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* (2013) 17: 61-75.

Trump D.L., Muindi J., Johnson C-S., Hershberger P.A. Clinical development of calcitriol and calcitriol analogs in oncology: Progress and considerations for future development, in *Vitamin D and Cancer*, Springer Science: Nueva York (2011) 1741-1749.

Turner M.J., Bozarth C.H., Strauss K.E. Evidence for intracellular superoxide formation following the exposure of guinea pig enterocytes to bleomycin. *Biochem Pharmacol* (1989) 38: 85-90.

Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* (2006) 160: 1-40.

van Leeuwen J., Pols H., Vitamin D: Cancer and Differentiation, Vitamin D, D. Feldman, Elsevier Inc (2005) 1571-1586.

Vaquero E.C., Rickmann M., Molero X. Tocotrienols: balancing the mitochondrial crosstalk between apoptosis and autophagy. *Autophagy* (2007) 3: 652-654.

Walter K., Schutt C. Acid and alkaline phosphatase in serum (two-point method). Bermeyer H.U, New York: Academic Press (1974) 856-860.

Wang Q., Salman H., Danilenko M., Studzinski G.P. Cooperation between antioxidants and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in induction of leukemia HL60 cell differentiation through the JNK/AP-1/Egr-1 pathway. *J Cell Physiol* (2005) 204: 964-974.

Whelan L.C., Ryan M.F. Effects of the polyacetylene capillin on human tumour cell lines. *Anticancer Res* (2004) 24: 2281-2286.

Wijeratne S., Cuppett S., Schlegel V., Hidrogen peroxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in caco-2 human colon cell. *J Agric Food Chem* (2005) 53: 8768-8774.

Woeckel V.J., Alves R.D., Swagemakers S.M., Eijken M., Chiba H., van der Eerden B.C., van Leeuwen J.P. 1Alpha,25-(OH)₂D₃ acts in the early phase of osteoblast differentiation to enhance mineralization via accelerated production of mature matrix vesicles. *J Cell Physiol* (2010) 225: 593-600.

Wu S., Sun J. Vitamin D, vitamin D receptor, and macroautophagy in inflammation and infection. *Discov Med* (2011) 11: 325-335.

Yin L., Grandi N., Raum E., Haug U., Arndt V., Brenner H. Meta-analysis: longitudinal studies of serum vitamin D and colorectal cancer risk. *Aliment Pharmacol Ther* (2009) 30: 113-125.

Yin L., Grandi N., Raum E., Haug U., Arndt V., Brenner H. Meta-analysis: longitudinal studies of serum vitamin D and colorectal cancer risk. *Aliment Pharmacol Ther* (2009) 30: 113-125.

Young M., Ordonez L., Clarke A.R. What are the best routes to effectively model human colorectal cancer? *Mol Oncol* (2013) 7: 178-189.

Zhang B., Wang X., Nazarali A.J. Ascorbic acid reverses valproic acid-induced inhibition of *hoxa2* and maintains glutathione homeostasis in mouse embryos in culture. *Cell Mol Neurobiol* (2010) 30: 137-148.

Zhao Y.F., Zhang C., Suo Y.R. MMPT as a reactive oxygen species generator induces apoptosis via the depletion of intracellular GSH contents in A549 cells. *Eur J Pharmacol* (2012) 688: 6-13.

REFERENCIAS DE PÁGINAS WEB

National Cancer Institute, Buthionine Sulfoximine, <http://cancer.gov/drugdictionary>, consulta 05-12.

Clinicaltrials.gov, BSO+Cancer, <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=bso+cancer>, consulta 09-13.

Brenda data base, Buthionine Sulfoximine, <http://www.brenda-enzymes.org>, consulta 10-2013.

Nobelprize.org, All Nobel Prizes in Physiology or Medicine, http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/, consulta 05-2012.

Organización Mundial de la Salud, Cáncer, <http://www.who.int>, nota descriptiva n^o 297, consulta 02-2013.

Ministerio de Salud de la República Argentina, Cáncer colorrectal, <http://www.msal.gov.ar/>, consulta 02-2013.