



UNIVERSIDAD DE VALADOLID y CSIC

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología

Efectos del inhibidor de la ornitina descarboxilasa DFMO sobre el remodelado del Ca^{2+} intracelular en cáncer de colon

Memoria de trabajo de investigación tutelado para optar al Título de Máster en Investigación
Biomédica presentado por:

LUCÍA GONZÁLEZ GUTIÉRREZ

Directores

Dr. Carlos Villalobos Jorge

Dra. Lucía Núñez Llorente

Valladolid, Julio 2014

ÍNDICE

<u>ABREVIATURAS</u>	3
<u>INTRODUCCIÓN</u>	4
1.- Cáncer de colon.....	4
2.- DFMO como tratamiento quimiopreventivo.....	5
3.- Remodelación de calcio intracelular en cáncer de colon.....	6
<u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	12
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	13
1.- Materiales.....	13
2.- Cultivos celulares.....	14
3.- Imagen de fluorescencia de Ca ²⁺ citosólico por medio de Fura2/AM.....	14
4.- Extracción de ARNm y RT-PCR cuantitativa.....	16
5.- Extracción de proteínas y Western Blotting.....	17
<u>RESULTADOS</u>	19
1. Expresión de ornitina descarboxilasa (ODC) en células normales y tumorales	19
2. DFMO aumenta la liberación de Ca ²⁺ inducida por ionomicina en células HT29.....	19
3. DFMO modifica la entrada de Ca ²⁺ inducida por tapsigargina en células HT29.....	21
4. DFMO modifica la liberación y entrada de Ca ²⁺ inducida por CPA en células HT29.....	23
5. Efectos de DFMO sobre la expresión de genes implicados en la entrada de Ca ²⁺	25
<u>DISCUSIÓN</u>	26
<u>CONCLUSIONES</u>	28
<u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	29

Abreviaturas

AINEs	Anti-inflamatorios no esteroideos
ATP	Adenosin trifosfato
APC	Adenomatous polyposis coli
[Ca²⁺]_{cit}	Concentración de calcio libre citosólico
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CPA	Ácido ciclopiazónico
DFMO	L- α -difluorometilornitina
ECC o SOCE	Entrada capacitativa de calcio o entrada de calcio operada por depósitos
I_{CRAC}	Corriente activada por liberación de calcio
IP₃R	Receptor de Inositol 1,4,5-trifosfato
MEC	Medio externo completo
MP	Membrana plasmática
ODC	Ornitina descarboxilasa
PVDF	Membrana de polifluoruro de vinilideno
RE	Retículo endoplásmico
SOCs	Canales de calcio operados por depósitos
Stim	“Stromal Interacting molecule” en inglés
TTBS	Tween-TBS

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer de colon

El cáncer colorrectal tiene una alta incidencia en sociedades desarrolladas y envejecidas como es el caso de España, siendo la 2ª causa más frecuente de muerte por cáncer en nuestro entorno. Se ha descrito que un diagnóstico temprano del cáncer colorrectal aumenta considerablemente la supervivencia por cáncer. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos por el diagnóstico temprano mediante el cribado de la población a partir de los 50 años, un elevado porcentaje de pacientes fallece antes de los 5 años tras la cirugía por la aparición de recidivas. Actualmente la prevención del cáncer tras el diagnóstico temprano y la cirugía se limita a un seguimiento continuado del paciente. Sin embargo, en los últimos años se están llevando a cabo numerosos estudios básicos, epidemiológicos y clínicos que sugieren la posibilidad real de usar ciertos fármacos de uso común y toxicidad limitada que podrían ser muy eficaces en la quimioprevención del cáncer colorrectal (Jänne, 2000), un tipo de cáncer en el que las bases moleculares de la progresión natural han sido descritas en detalle (**Figura 1**). Por ejemplo, numerosas evidencias sugieren que aspirina y otros anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) podrían prevenir el cáncer de colon de modo eficaz, disminuyendo aproximadamente un 50% la aparición del cáncer colorrectal usando aspirina (Chan et al., 2012).

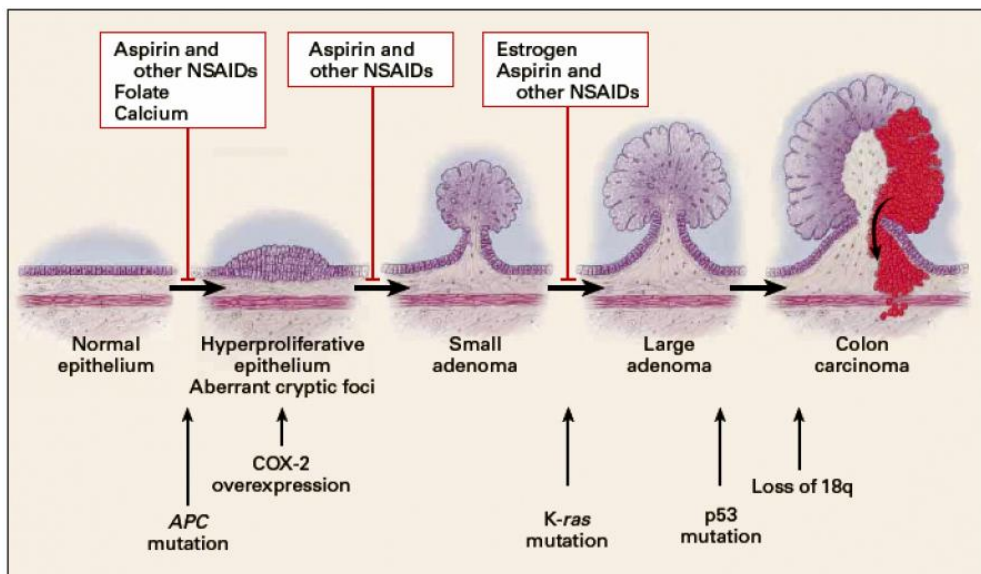


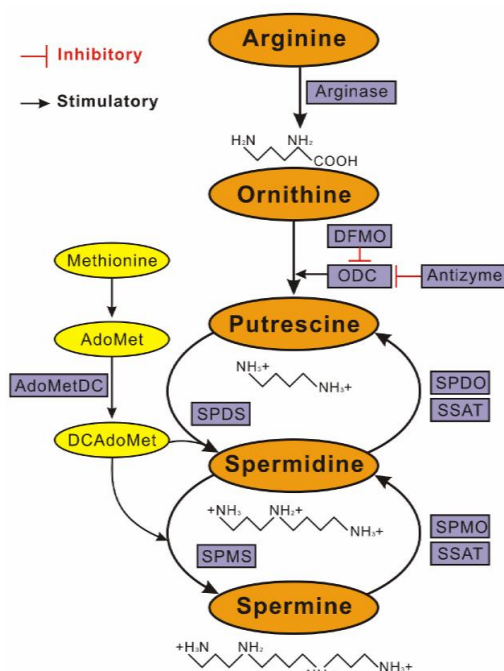
Figura 1. Esquema de la transformación del epitelio normal de colon en cáncer colorrectal.

Se sabe que la transformación del epitelio hiperproliferativo está asociada en muchos casos a mutaciones y/o defectos en el gen APC que conduce a la formación de criptas aberrantes, precursores de los pólipos intestinales. El proceso continúa con la formación de adenomas que pueden crecer en tamaño. Estos pasos parecen mediados por la actividad aberrante de algunos genes como COX-2, Ras y p53. El último paso es la formación de carcinomas con capacidad proliferativa y migratoria. En la parte superior se mencionan los pasos que podrían ser interferidos por diferentes candidatos quimiopreventivos (Jänne, 2000).

El cáncer colorrectal es una enfermedad generada por un tumor maligno procedente de las células de la mucosa intestinal y de sus glándulas en la que células malignas se localizan en la porción intermedia y más larga del intestino grueso. La aparición del cáncer de colon comienza con la transformación de células normales en células tumorales debido a cambios en su material genético que desemboca en una reprogramación celular, cuyas consecuencias son proliferación descontrolada, desregulación del metabolismo celular y desbalance entre proliferación y muerte celular. En concreto, en el cáncer colorrectal hay una hiperproliferación de las células epiteliales de las criptas intestinales resultando en un fenotipo epitelial aberrante con sobre-expresión de COX-2, entre otros genes. Este crecimiento desmesurado da como resultado la aparición de un pequeño adenoma cuyo crecimiento favorece la aparición de nuevas mutaciones o reforzamiento de las ya establecidas que si no se revierte, genera un gran adenoma. Si la proliferación desmesurada no remite, acaba provocando la aparición de adenocarcinoma de colon debido a mutaciones que inactivan la reparación génica, promueven la sobreexpresión de oncogenes y la supresión de los genes anti-tumorales. Pero sin duda, el gen de mayor implicación en la génesis del cáncer, incluido en el cáncer colorrectal, es el APC (“Adenomatous polyposis coli”). Se trata de un gen supresor de tumores que cuando sufre mutaciones que eliminan su función, las células sufren alteraciones que las inducen el cambio de células normales a tumorales. Por tanto, estas mutaciones están presentes desde el primer momento en toda célula cancerígena (Oshima et al., 1996).

2. DFMO como tratamiento quimiopreventivo

Pero los estudios no se limitan a los AINEs, sino que también se ha investigado sobre la implicación de las poliaminas en la proliferación celular, como el cáncer y enfermedades infecciosas. Las poliaminas naturales son sintetizadas por las células a partir de la ornitina mediante el enzima ornitina descarboxilasa (ODC) que genera putrescina. Este enzima se considera el paso limitante en la síntesis de poliaminas y se inhibe de modo irreversible (inhibición suicida) por DFMO. A partir de putrescina, se puede general espermidina y espermina, las otras dos poliaminas naturales (**Figura 2**).



Las poliaminas son policationes que se creen implicados en numerosas funciones celulares y fisiológicas. Por ejemplo, por su estructura química pueden unirse a los ácidos nucleicos u otros polianiones, con un papel estabilizante o como factores de crecimiento. De ahí que cada vez se les atribuya mayor importancia en la proliferación celular y por tanto se hayan convertido en una diana farmacológica en el desarrollo de nuevos compuestos quimioterapéuticos.

Figura 2. Ruta de síntesis de poliaminas naturales y su estructura química (Tomado de Gao et al., 2013).

Una de esas sustancias es el DFMO, sintetizado hace unos 35 años como posible agente quimiopreventivo o sustancia quimioterapéutica para enfermedades hiperproliferativas, como el cáncer, por su efecto irreversible de inhibición sobre el primer enzima en la síntesis de poliaminas, la ornitina descarboxilasa (ODC) (Frank L.M, et al., 1999). Recientemente, un ensayo clínico en cerca de 400 individuos con adenomas resecaos demostró que la combinación de DFMO y sulindac (un AINE), reducía notablemente (entre 70 y 95%) la aparición de otros adenomas, adenomas invasivos o adenomas múltiples (Meyskens et al., 2008; Sporn & Hong, 2008, revisado en Laukaitis y Gerner, 2011) (**Figura 3**). Sin embargo, la ausencia de conocimiento sobre el mecanismo de acción y la ausencia de ensayos clínicos apropiados derivan en que los protocolos no acaban de implementarse. Afortunadamente, en septiembre de 2013 comenzó un nuevo ensayo clínico de quimiopreención del cáncer colorrectal (S0820, Adenoma and Second Primary Prevention Trial, PACES Trial) en el que se va a evaluar el mismo tratamiento quimiopreventivo en más de 1000 pacientes operados de cáncer colorrectal con un elevado riesgo de padecer recidivas.

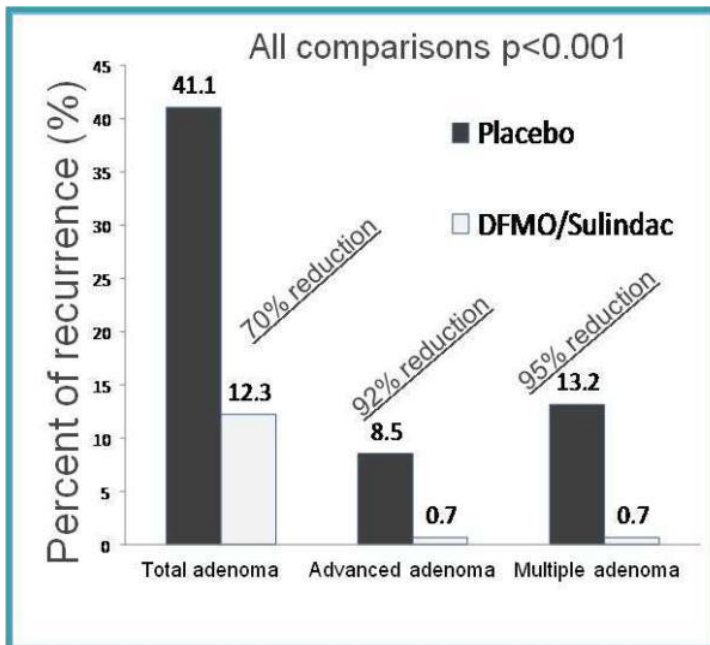


Figura 3. Resultados del ensayo clínico de quimiopreención por DFMO. Porcentaje de recurrencia de adenomas totales, adenomas avanzados y adenomas múltiples en pacientes a los que se han resecao adenomas previos y han tomado placebo o la combinación DFMO más sulindac diariamente durante un cierto periodo de tiempo (revisado en Laukaitis y Gerner, 2011).

3. Remodelación de calcio en cáncer de colon

Datos recientes de nuestro laboratorio (Sobradillo, Hernández-Morales et al., en revisión) sugieren la posibilidad de que, en el cáncer colorrectal, podría existir una remodelación importante de la homeostasis del calcio intracelular que podría contribuir de modo notable a las principales características de las células tumorales, incluyendo la proliferación excesiva, la migración e invasión celulares y la resistencia a la apoptosis y la muerte celular. A continuación se describen brevemente los elementos principales de la homeostasis del calcio intracelular como prólogo necesario para introducir las diferencias principales encontradas entre las células de mucosa intestinal NCM460 y las células de carcinoma de colon humano HT29.

Tanto las células normales como las tumorales presentan dos fuentes principales de Ca^{2+} , la extracelular y la existente en orgánulos intracelulares, siendo el reservorio más importante el retículo endoplásmico (RE). Existe un gradiente electroquímico debido a las diferencias de concentración entre el exterior y el interior celular (10000:1) que favorece la entrada de Ca^{2+} . El mantenimiento de este gradiente es fundamental para el correcto funcionamiento de múltiples procesos celulares, y este se consigue gracias a la existencia de un sistema de transporte activo que bombea Ca^{2+} al exterior celular y a la baja permeabilidad de la membrana plasmática (MP) a Ca^{2+} , obligando al uso de proteínas de transporte. De este modo, pequeñas variaciones en los flujos de Ca^{2+} pueden generar cambios importantes en la concentración de Ca^{2+} citosólica puede conllevar la alteración de gran cantidad de procesos celulares (Berridge, 1995). Además de los canales de Ca^{2+} presentes en la MP que permiten la entrada de este ión al interior celular, existen otros sistemas de transporte, que extraen Ca^{2+} al exterior celular o al interior de los orgánulos subcelulares. Este transporte al interior de los orgánulos, a excepción de la mitocondria, ocurre en contra de gradiente de modo que consume energía en forma de ATP (bombas) o aprovechan el gradiente de otros iones por medio de intercambiadores. Por tanto, las bombas y los intercambiadores son responsables del control de la homeostasis en reposo, y los canales de Ca^{2+} se encargan del control dinámico de la homeostasis de dicho ión. De esta manera, las señales intracelulares de Ca^{2+} se generan, más que por cambios en la actividad de las bombas, por cambios en la actividad de los canales, tanto los presentes en la MP como aquellos específicos de endomembranas (Montero et al., 2000; Chamero et al., 2002).

Los canales de Ca^{2+} son proteínas integrales de membrana, ubicuas, que forman poros a través de los cuales se produce el flujo selectivo de Ca^{2+} a favor de gradiente electroquímico manteniendo la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. Estos canales se pueden clasificar en función de su localización subcelular o según su mecanismo de activación (“gating” en inglés), según el cual se dividen en 2 familias: canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCs) o canales de Ca^{2+} no operados por voltaje pero regulados por receptor (ROCs), segundos mensajeros (SMOCs) o depósitos (“Stores” en inglés, SOCs). Estos últimos son generalmente predominantes en células no excitables aunque también están presentes en las células excitables. Otros tipo de canales que permiten cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ son los que se encuentran en el RE como el IP_3R y el receptor de rianodina (RyR), ambos implicados en la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares en respuesta a determinadas señales celulares. Por último, el uniportador de Ca^{2+} localizado en la membrana interna de la mitocondria también colabora en el mantenimiento de los niveles basales de Ca^{2+} (Kirichok et al., 2007).

Los sistemas de extrusión de Ca^{2+} mediante transporte activo primario son las bombas tipo SERCA (“Sarcoplasmic and Endoplasmic Reticulum Calcio ATPase” en inglés). Estas bombean Ca^{2+} desde el citosol al interior del RE con una afinidad de ($K_{50} = 0.1\mu\text{M}$) (Yano et al., 2004). Esta bomba puede modificar su tasa de transporte en respuesta a elevaciones de la concentración de calcio citosólico y ajustar los valores basales en reposo. Existen inhibidores selectivos como la tapsigargina (sustancia de origen vegetal que se une con alta afinidad e inhibe irreversiblemente todas las SERCA), el ácido ciclopiazónico (CPA) y 2,5-di-(ter-butil)-1,4-benzohidroquinona (TBH), ambas de menor afinidad pero de carácter reversible. Estos antagonistas son utilizados frecuentemente para depletar los depósitos intracelulares de Ca^{2+} (Takemura et al., 1989).

En este trabajo nos centramos en los canales de Ca^{2+} operados por depósito (SOCs). Estos son canales de Ca^{2+} que forman una vía de entrada de Ca^{2+} a través de la MP, activada tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} (**Figura 4**). Este mecanismo denominado entrada capacitativa de Ca^{2+} o entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (ECC o SOCE, “Store Operated Ca^{2+} Entry” en inglés) (Putney, 1986), es un mecanismo ubicuo de entrada de Ca^{2+} muy relevante en células no excitables, aunque también está presente en células excitables (Parekh y Putney, 2005) (Villalobos y García-Sancho, 1995). A partir del replanteamiento de la hipótesis de Putney (Putney, 1990), el desarrollo de sondas fluorescentes para medir la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en tiempo real, el descubrimiento de taspigargina como inhibidor específico de la bomba SERCA del RE (Grynkiewicz, Poenie y Tsien, 1985) (Takemura et al, 1989) y las técnicas electrofisiológicas de patch clamp revelaron una pequeña corriente selectiva a Ca^{2+} activada por vaciamiento de los depósitos: I_{CRAC} (“ Ca^{2+} Release Activates Current” en inglés) (Hoth y Penner, 1992) y una corriente I_{SOC} (“Store Operated Current” en inglés) también activada por el vaciamiento de los depósitos, sugiriendo la posible participación de distintos tipos de canales (Parekh y Putney, 2005). Esta ruta de entrada de Ca^{2+} regula muchas funciones celulares, entre ellas la proliferación celular. Durante dos décadas, las bases moleculares de la entrada capacitativa de Ca^{2+} y su mecanismo de activación permanecieron desconocidas. Sin embargo, su intenso escrutinio permitió identificar una nueva superfamilia de canales catiónicos, los canales TRP (del inglés “Transient Receptor Potencial”) de enorme importancia fisiopatológica.

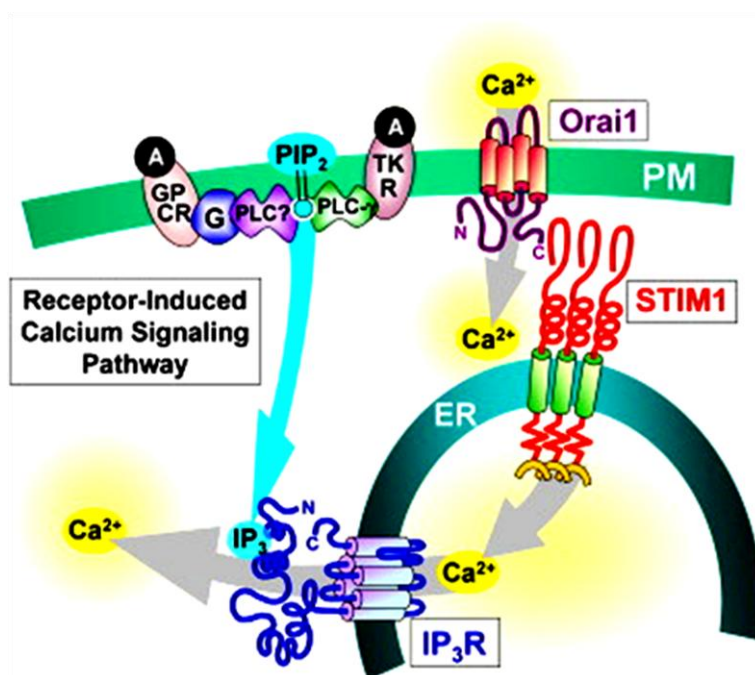


Figura 4. Bases Moleculares de la Entrada Capacitativa de Calcio. La activación por un agonista de los receptores acoplados a proteínas G o con actividad tirosinaquinasa activan a la PLC, generándose IP₃ y activando a su receptor IP₃R que induce liberación de Ca²⁺ del RE. El ión que estaba unido reversiblemente al motivo mano-EF de S1, se disocia provocando la oligomerización de S1 dentro del RE hacia áreas cercanas a los canales O1 de la MP. La interacción de ambas proteínas activa canales de Ca²⁺ y la entrada del ión al interior celular rellena los depósitos que revierte el proceso (modificado de Fernanda R. C Giachini et al. 2001; Hewavitharana et al., 2007).

Recientemente, con el descubrimiento de los sensores de Ca^{2+} del RE Stim (del inglés “stromal interacting molecule”) y los canales de la familia Orai, se han sentado las bases moleculares de la entrada capacitativa de Ca^{2+} . Se acepta que el vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} es sentido por el sitio de unión a Ca^{2+} intraluminal del sensor Stim1 localizado en la membrana del RE que tiende entonces a oligomerizar. Ello favorece su acumulación e interacción con proteínas Orai1 localizadas en la membrana plasmática. Producto de esta interacción es la apertura de canales de Ca^{2+} , el aumento de la entrada de Ca^{2+} y el aumento mantenido de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ que permite el relleno de los depósitos y finaliza o revierte todos los pasos anteriores (**Figura 4**). No se conoce muy bien el papel de las otras isoformas incluyendo Orai2 y Orai3, hasta el momento menos estudiadas. Existe otra isoforma de la familia Stim, Stim2, cuya contribución a la ECC es controvertida. Las investigaciones realizadas hasta el momento sobre Stim2, sugieren una función principal como molécula reguladora para estabilizar los niveles basales de Ca^{2+} en el citoplasma y en el RE.

Nuestro grupo está investigando la remodelación de Ca^{2+} que presentan las células tumorales respecto a las normales y la contribución del Ca^{2+} intracelular al mecanismo de quimioprevención del cáncer colorrectal por medio de la aspirina y otros AINEs (Núñez et al., 2006; Valero et al., 2008). Nuestros resultados, aún sin publicar (Sobradillo, Hernández-Morales et al., en revisión) muestran que la entrada capacitativa de Ca^{2+} aumenta dramáticamente en las células tumorales de carcinoma de colon, respecto a la entrada observada en células de mucosa intestinal humana (**Figura 5**). Resultados similares se han descrito muy recientemente en otros tipos de cáncer.

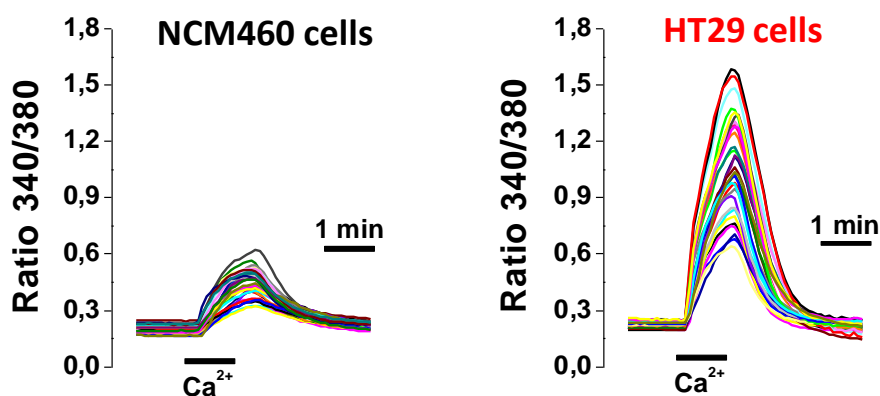


Figura 5. Entrada capacitativa de Ca^{2+} en células normales (NCM460) y tumorales (HT29). Registros representativos del incremento de la concentración de Ca^{2+} libre citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$) en células tratadas con taspigargina en medio libre de Ca^{2+} para depletar los depósitos de Ca^{2+} intracelular en células de epitelio colónico humano NCM460 y células de carcinoma de colon humano HT29. (Datos tomados de Sobradillo, Hernández-Morales et al., en revisión).

El estudio electrofisiológico mediante “patch-clamp” automático o planar (Dra. Hernández-Morales, datos no publicados) ha permitido identificar las corrientes implicadas en la entrada capacitativa en células normales y tumorales (**Figura 6**). Los datos sugieren que la entrada capacitativa está originada por diferentes tipos de corrientes en las células normales y tumorales. En concreto, las células normales presentan un tipo único de corriente similar, por sus características biofísicas, a la corriente I_{CRAC} descrita originalmente en mastocitos y células T. Sin embargo, las células tumorales presentan junto a este tipo de corriente aunque de magnitud incrementada, una corriente adicional probablemente debida a la activación de un miembro de la superfamilia de canales TRP (Sobradillo, Hernández-Morales et al., en revisión).

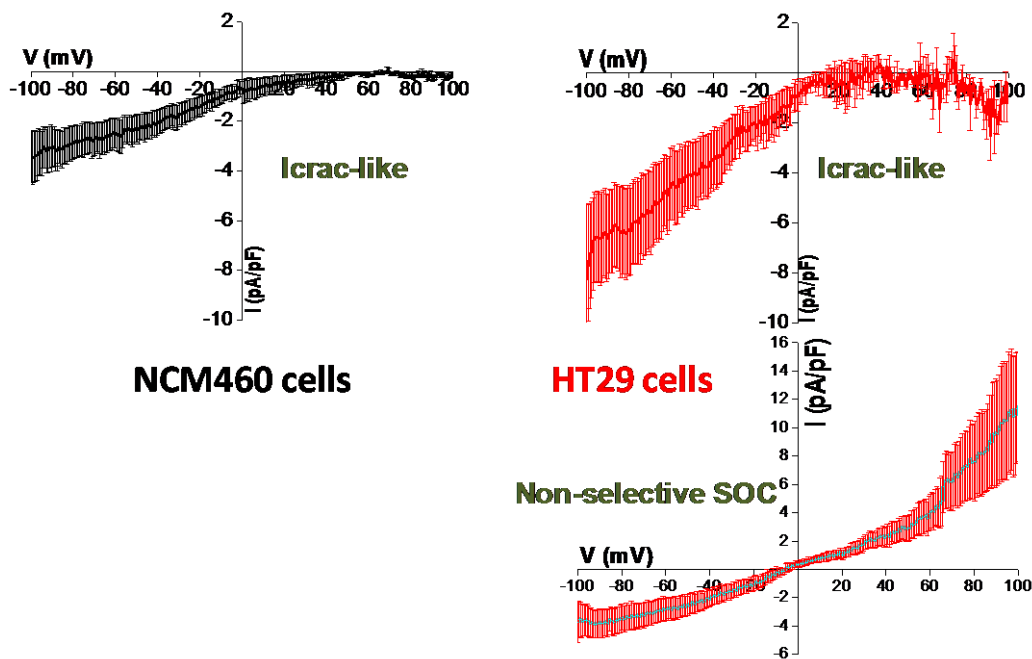


Figura 6. Corrientes activadas por depósitos en células normales (NCM460) y tumorales (HT29). Representaciones I/V características de las corrientes iónicas activadas por vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} con EGTA 20 mM intracelular o tapsigargina. (Datos tomados de Sobradillo, Hernández-Morales et al., en preparación).

Junto a las diferencias en la ECC y corrientes de Ca^{2+} , hemos encontrado que el contenido de calcio de los depósitos es significativamente diferente en las células normales y tumorales (**Figura 7**).

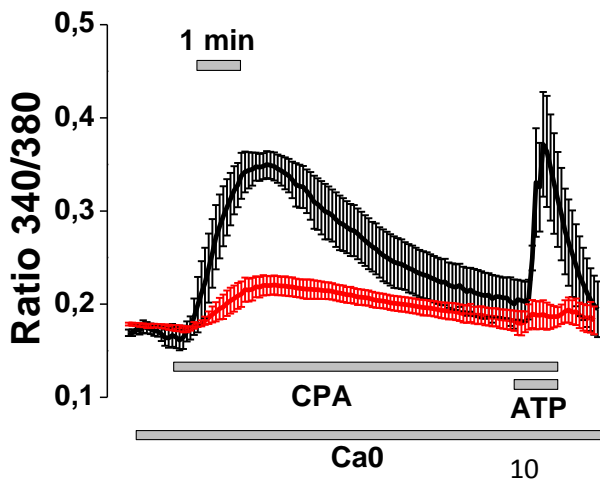


Figura 7. Liberación de Ca^{2+} inducida por ácido ciclopiazónico (CPA) y ATP en células normales (negro) y tumorales (rojo). (Datos tomados de Sobradillo, Hernández-Morales et al., en revisión).

El análisis molecular de las células normales y tumorales ha permitido describir las bases moleculares del remodelado de la señal de Ca^{2+} . Sin ánimo de ser exhaustivos, el remodelado está asociado a cambios particulares en la expresión de ciertas proteínas implicadas en la entrada capacitativa de calcio incluyendo a miembros de las familias Orai, Stim y TRP (Sobradillo, Hernández-Morales et al., en revisión). Los cambios en las proteínas mencionadas junto con la remodelación del Ca^{2+} intracelular que estas producen, podrían contribuir a la excesiva proliferación, invasión y supervivencia características de las células tumorales. Sorprendentemente, los cambios encontrados recuerdan parcialmente a los descritos recientemente en el proceso de restitución o reparación de la mucosa intestinal inducida por poliaminas (Rao et al., 2012). Las poliaminas participan en muchas funciones celulares incluyendo no solo la restitución o reparación intestinal sino también la proliferación celular, la angiogénesis, la apoptosis y el mantenimiento de la barrera del tracto gastrointestinal. Las poliaminas inducen numerosas rutas de señalización en estos procesos (**Figura 8**) incluyendo cambios en las proteínas implicadas en la entrada capacitativa de calcio. Por otra parte, es bien conocido que muchos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer colorrectal está asociado al exceso de poliaminas.

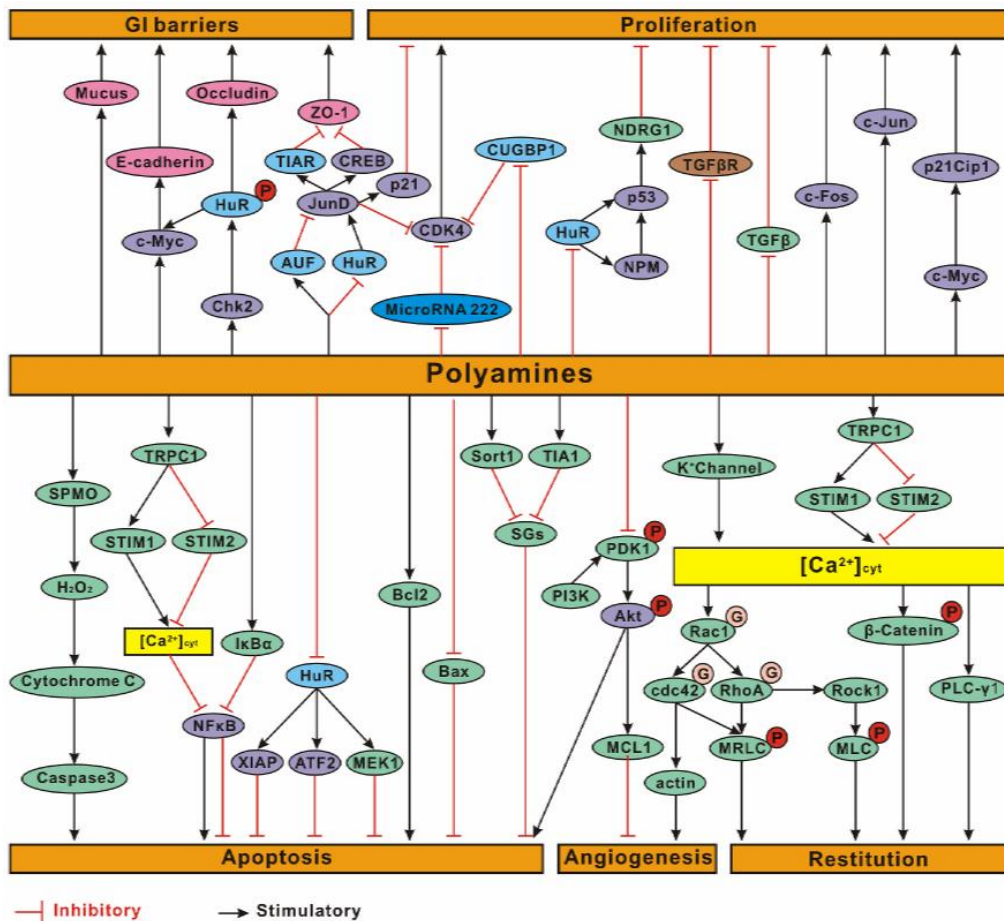


Figura 8. Rutas integradas de señalización por poliaminas en relación con la restitución epitelial, angiogénesis, apoptosis y función barrera del tracto gastrointestinal. Las poliaminas promueven muchos efectos fisiológicos a través de diversas rutas de señalización. En el caso de la restitución epitelial y la apoptosis, los efectos parecen mediados por cambios en la expresión de proteínas que controlan la entrada de calcio (tomado de Gao et al., 2013).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Nuestra hipótesis de trabajo es que el exceso de poliaminas podría contribuir al remodelado del calcio intracelular en el cáncer colorrectal (**Figura 9**). Si la hipótesis es correcta, entonces la inhibición de la síntesis de poliaminas por DFMO podría revertir el remodelado de Ca^{2+} intracelular y prevenir así, la tumorigénesis celular y el cáncer colorrectal. Para testar esta posibilidad, estudiaremos los efectos de DFMO sobre la entrada de calcio, el nivel de llenado de los depósitos y la expresión de posibles genes implicados.

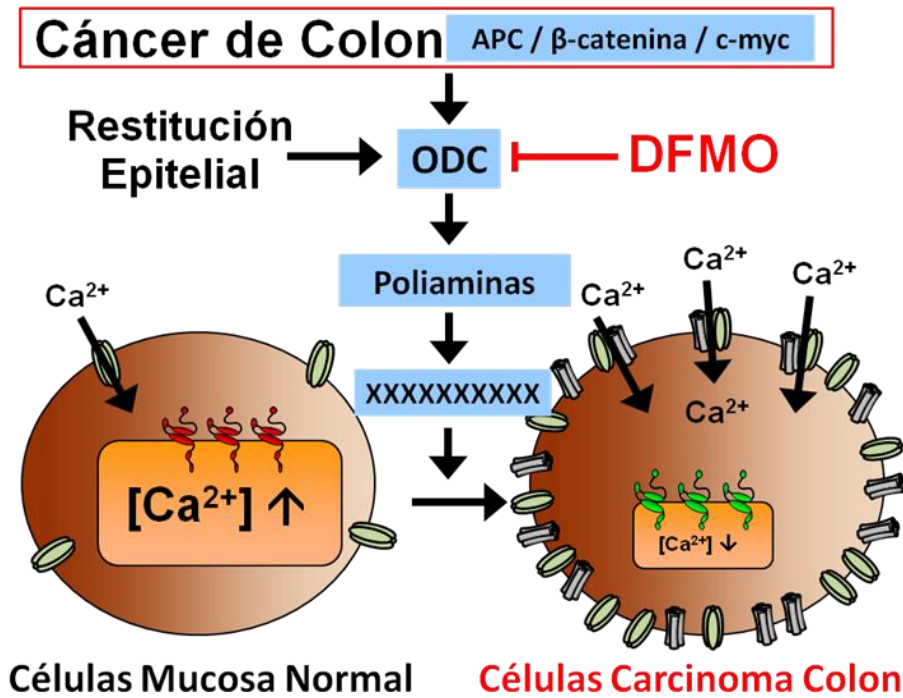


Figura 9. Hipótesis de partida. Lesiones en el epitelio, junto con mutaciones en los genes APC, β-catenina y c-myc repercuten en una sobreexpresión de ODC que conlleva el aumento de la biosíntesis de poliaminas. Este aumento podría alterar la expresión de los canales de la MP y endomembranas modificando la homeostasis del Ca^{2+} . Estas alteraciones de expresión, junto con la consiguiente modificación del contenido de los depósitos de Ca^{2+} y de la ECC podría contribuir a la adquisición de características tumorales (proliferación, invasión, supervivencia).

Para testar de modo preliminar la hipótesis mencionada arriba nos hemos planteado investigar los siguientes objetivos concretos:

1. Determinar el efecto de DFMO sobre la entrada capacitativa de Ca^{2+} y el tamaño de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} en células de carcinoma de colon humano HT29.
2. Determinar los efectos de DFMO sobre la expresión de distintos componentes implicados en la entrada de Ca^{2+} en células de carcinoma de colon humano HT29.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

Ab-cam (Cambridge, UK):

Anticuerpo primario α - β - actina para WB
Anticuerpo secundario conejo α -ratón para WB

Alomone Labs (Jerusalén, Israel):

Tapsigargina

Applied Biosystems (Madrid, España):

Kit retrotranscripción inversa DNAsa I (Ambion)

Fermentas, Thermo Fisher Scientific (Madrid, España):

Taq ADN polimerasa

INVITROGEN Corporation (Carlsbad, California, EE.UU):

Fura-2/AM TRIZOL

LONZA (Barcelona S.L., España):

Medio DMEM Tripsina-EDTA
Suero bovino fetal (FBS) L-Glutamina
Antibióticos: Penicilina, Estreptomicina Solución de tampón fosfato (PBS)

Millipore (Madrid, España):

Membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF)

Merck (Madrid, España)

Ácido clorhídrico Etanol
Butanol Hidróxido sódico
Cloruro cálcico Isopropanol
Cloruro de magnesio Metanol
Cloruro potásico Bis-acrilamida
DMSO

Nunc Labclinics (Barcelona, España):

Fascos de cultivo celular de 25 cm² Placas de cultivo de 4 pocillos

Sigma Aldrich (Madrid, España):

Ácido etilendiamonio tetra-acético (EDTA)
Ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetra-acético (EGTA)
Azul de tripano (Trypan Blue) Hepes
ATP TEMED
Dodecil sulfato sódico (SDS) Tween 20
Glicina β -Mercaptoetan
Putrescina (1,4-Butanediamine dihydrochloride) Anticuerpo primario α -ODC

Tocris Bioscience (Madrid, España):

DFMO (DL-2-(Difluorometilornitina)

2. Cultivos celulares

Las líneas celulares utilizadas derivan de tejidos humanos normales o tumorales (**Figura 10**). Como línea tumoral se utilizó la línea HT29 que es una línea celular derivada de un carcinoma colorrectal humano que expresa ciclooxigenasa 2 (COX-2). Las células fueron donadas por el Dr. C. Fernández-Checa (CSIC, Barcelona). La línea celular normal NCM460 son células derivadas de mucosa epitelial de colon humano sano y fue suministrada por la Dra. Mary P. Moyer (Incell Corporation, San Antonio, TX, EE.UU).

El medio de cultivo empleado para el mantenimiento de estas líneas es DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle Medium”) con 1g/mL de glucosa más 1% de L-Glutamina (2mM), 1% de Penicilina y Estreptomicina y 10% de Suero Fetal Bobino (FBS). Las células se cultivaron en un incubador con una atmósfera al 10% de CO₂ para mantener el pH a 7.4 y en frascos de cultivo de 25cm² (Costar Corporation). Para el tratamiento de las células con DFMO y hasta la realización de los diversos experimentos, las líneas celulares, tanto HT29 como NCM460, se utilizó el mismo medio pero usando suero dializado FBS dializado.

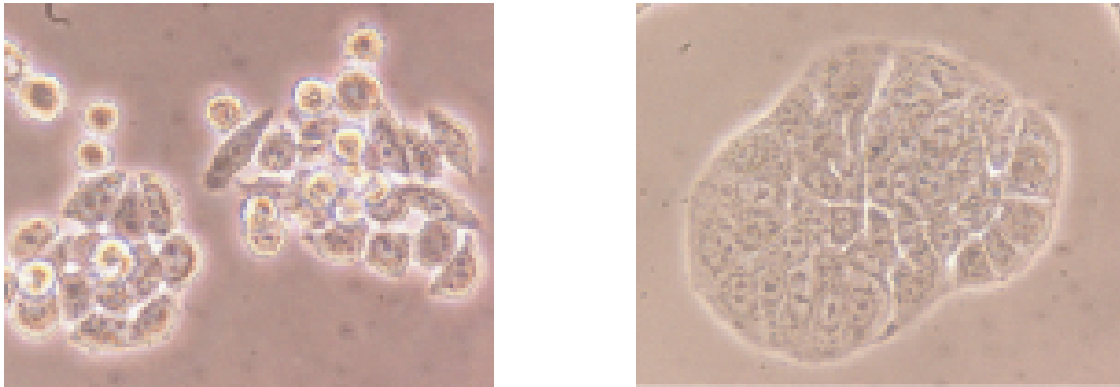


Figura 10. Imágenes de cultivos celulares de las líneas NCM460 (normal) y HT29 (tumoral). La imagen de la izquierda corresponde con células NCM460, se encuentran agrupadas pero sin formar agregados, con una fisiología más estrellada que las HT29. Las células HT29 (la imagen de la derecha) forman agregados definidos.

Las células que más tarde se usarían para la medición de Ca²⁺ citosólico *in vivo* se sembraron en gotas de suspensión celular a una densidad de 5x10⁴ células por pocillo en cristales de 12mm de diámetro autoclavados previamente y tratados con poli-L-lisina (0,01mg/mL). Para la extracción de ARN se sembraron 1.5 millones de células HT29 en placas de Petri de 100mmX20mm.

3. Imagen de fluorescencia de Ca²⁺ citosólico.

La molécula Fura2/AM actúa como indicador fluorescente de las variaciones de calcio libre citosólico ([Ca²⁺]_{cit}) permitiéndonos estudiar los cambios que sufren las células como respuesta a diferentes estímulos por medio de microscopia de imagen de fluorescencia en célula única. La molécula penta-acetosimetilester de Fura2 (Fura2/AM) es un quelante de alta afinidad por Ca²⁺ con restos aromáticos que le confieren propiedades fluorescentes, derivado de Fura-2 (Grynkiewicz et al, 1985). La molécula Fura2/AM es hidrofóbica pudiendo atravesar la

membrana celular fácilmente, al contrario que la molécula origen de Fura-2. Ya en el interior celular, las esterasas internas de-esterifican Fura2/AM liberando la molécula Fura-2 en su forma de ácido libre, que queda retenida en el interior celular. Una vez en el citosol, puede ser excitada a diferentes longitudes de onda con las luces monocromáticas deseadas obteniendo una fluorescencia de emisión correspondiente a la cantidad de Ca^{2+} presente en el citosol. El registro de la emisión de fluorescencia en tiempo real permite la monitorización continua, en células vivas, de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ estimada a partir del cociente de las fluorescencias de excitación a 340 y 380nm (el ratio). La unión de Ca^{2+} al colorante, cuya estequiometría es de 1:1, aumenta la emisión de fluorescencia excitada a la longitud de onda de 340nm pero disminuye la excitada a 380nm (**Figura 11**), de modo que se puede derivar la ecuación de la ley de acción de masas para la posible determinación de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ (Grynkiewicz et al, 1985). La excitación con dos longitudes de onda diferentes permite que el cociente de fluorescencias (RATIO) sea independiente de la cantidad de colorante acumulado dentro de las células lo que permite eliminar muchos de los artefactos asociados a la imagen de fluorescencia (Tsien, 1988).

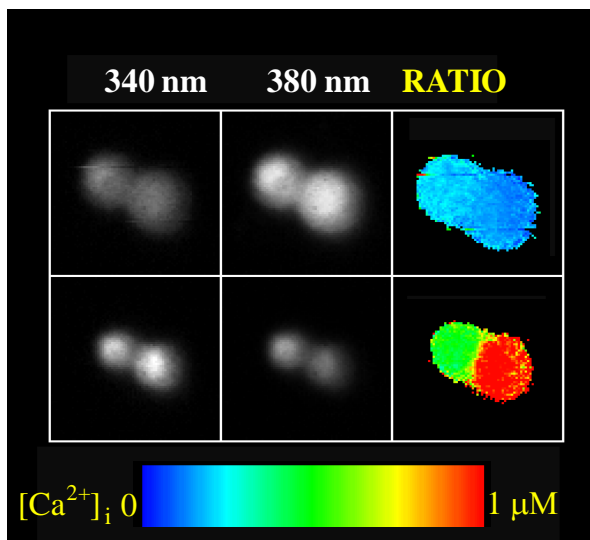


Figura 11. Imagen de calcio intracelular
 Imágenes de fluorescencia de 2 células cromafines excitadas a 340 y 380 nm, y del cociente F340/F380 codificado en pseudocolor en situación de reposo (paneles superiores) y tras la aplicación de un estímulo (paneles inferiores). Obsérvese que la estimulación aumenta la fluorescencia excitada a 340nm y disminuye la emisión de fluorescencia excitada a 380nm. El cociente de fluorescencias (RATIO) se codifica en pseudocolor de acuerdo a la escala inferior (Foto cortesía del Prof. J. García-Sancho, IBGM, Valladolid)

Para la medida de la fluorescencia, las células sembradas sobre cubreobjetos de cristal de 12 mm de diámetro se incubaron con Fura2/AM (4 μM , 1 h) en medio externo completo (MEC) cuya composición es la siguiente: NaCl, 145mM; KCl, 5mM, MgCl_2 1mM; CaCl_2 1mM, HEPES/NaOH, glucosa 10mM, pH 7,42). Tras la incubación, los cristales se colocan en la cámara termoestabilizada a 37°C de un microscopio invertido (Nikon Diaphot). Durante toda la realización del experimento, las células se mantienen perfundidas con MEC precalentado a 37°C y epi-iluminadas alternativamente con luz monocromática de excitación alternante a 340nm y 380nm con la ayuda de una rueda de filtros. La fluorescencia emitida a longitudes de onda superiores a 520nm es recogida mediante un objetivo 40x de inmersión en aceite (Nikon Fluor 40/1.30) y capturada mediante una cámara digital Orca ER de Hamamatsu Photonics, (Hamamatsu, Japón). Las imágenes de fluorescencia se cuantificaron en regiones de interés que reflejaban las células individuales mediante los programas AquaCosmos2.0 de Hamamatsu y Origin 7.0 para el análisis y representación de los registros.

4. Extracción de ARNm y RT-PCR cuantitativa

La extracción de ARN total se realizó a partir de placas petri de cultivo celular de 10 cm² tras tres días después de la siembra y 48 horas después de la aplicación del tratamiento con DFMO 5mM. Se sembraron 1.5x10⁶ de células utilizando 1ml del reactivo TRIZOL (Ambion, Life Technologies) siguiendo el protocolo optimizado en el laboratorio. La calidad del ARN y su cuantificación se comprobó mediante medidas de densidad óptica (DO) a 260 y 280 nm (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer). A partir de 1µg/µl de ARN se obtuvo ADN complementario mediante la enzima transcriptasa inversa (MultiScribe Reverse Transcriptase). Para su realización se usó una mezcla maestra (“master mix” en inglés) con 3.2 µl de H₂O libre de ARNasas; 2µl de Tampón 10x de PCR; 0.8µl de mezcla dNTPs; 2µl de cebadores aleatorios (“random primers” en inglés); 1µl de inhibidor de ARNasa; 1µl del enzima transcriptasa inversa por cada 1µl de ARN de muestra y se aplicó el siguiente protocolo en el termociclador: 25°C (10min), 37°C (120min), 85°C (5s) y 4°C (infinito).

La RT-PCR cuantitativa se llevó a cabo a partir del ADN complementario en el equipo “LightCycler 480” de Roche. Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 20µl, 1µl de muestra y 19µl de mezcla maestra (“master mix”) que contiene KAPA SYBR FAST qPCR kit (KAPA Biosystems); 0.3µM de cebador directo (“forward primer” en inglés); 0.3µM de cebador inverso (“reverse primer” en inglés) y agua de grado PCR. El protocolo para la amplificación es:

	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	N° ciclos
Pre-incubación	95	300	1
Amplificación	95	15	45
	60 ó 57 (*)	20	
	72	5	
Curva de Melting	95	5	1
	55	60	
	95	--	
Enfriamiento	40	10	1

Tabla 1. Protocolo seguido en la RT-PCR cuantitativa. (*) 60°C para β-actina y gen1 y 57°C para el resto de genes.

Para la realización de las RT-PCR cuantitativas los primers (“forward” y “reverse”) de los distintos genes se obtuvieron de Wang et al., 2000 o fueron diseñados usando Primer-BLAST.

Name	Primers (5→3)	Predicted size (pb)
Gen 1	F: AGGGXXXXXXXXXXXXXXXXXX R: CACAXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	399
Gen 2	F: TGTCXXXXXXXXXXXXXXXXXX R: GGGCXXXXXXXXXXXXXXXXXX	469
Gen 3	F: TACTXXXXXXXXXXXXXXXXXX R: ACCCXXXXXXXXXXXXXXXXXX	209
Gen 4	F: AGCAXXXXXXXXXXXXXXXXXXX R: GTCTXXXXXXXXXXXXXXXXXX	344
Gen 5	F: CGGCXXXXXXXXXXXXXXXXXX R: TTGTXXXXXXXXXXXXXXXXXX	333
Gen 6	F: CTCTXXXXXXXXXXXXXXXXXX R: CGATXXXXXXXXXXXXXXXXXX	380
β -actin	F: TACGCCAACACAGTGCTGTCTGG R: TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT	206

Tabla 2. Primers utilizados para la amplificación del ADN complementario y sus pesos moleculares (los nombres de los genes estudiados y las secuencias de los primers se han ocultado deliberadamente para salvaguardar la patentabilidad de los resultados obtenidos).

5. Extracción de proteínas y Western Blotting

A partir de muestras de proteína de células HT29 y NCM460 a diferentes pases, previamente extraído por Diego Sobradillo, se mezclan en una proporción 1:1 con el tampón de carga 2x y se calientan a 100°C durante 5 minutos para romper los puentes disulfuro y desnaturalizar las proteínas. La separación de las proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) (Bis/Acrilamida al 30%; 375mM de Tris HCl pH 8,9; 2M; 0.1% de SDS al 10%; 0.05% de APS 20%; TEMED). El gel concentrador realizado para el estudio de la expresión de la proteína ODC contenía un 10 % de Bis/Acrilamida, ya que su peso molecular es de 51kDa. El marcador de pesos moleculares que se utilizó es "Precision Plus Protein Standards, Dual Color" de BioRad. Cada gel se transfirió a una membrana de polivinilideno (PVDF). Tanto para la electroforesis como para la transferencia se utilizó el sistema BioRad (siguiendo protocolo optimizado por Diego Sobradillo (Sobradillo, Hernandez-Morales et al., en revisión).

La membrana se incubó con una solución de bloqueo con leche al 5 % en TTBS durante una hora, tras lo cual se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TTBS a Tª ambiente en agitación y, posteriormente, se incubó cada membrana con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C en agitación. A continuación, se lava otras 3 veces con TTBS y se incubó con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano durante 1 hora a Tª ambiente en agitación.

Las bandas de proteína de interés se pusieron de manifiesto con la mezcla de dos sustratos (Pierce ELC Western Blotting Substrate, Thermo Scientific) mediante quimioluminiscencia y su detección se llevó a cabo en el equipo VersaDoc 4000 (BioRad). Las cantidades relativas de proteína fueron estimadas por densitometría de las bandas utilizando el software Quantity One (BioRad). Como control endógeno se empleó la proteína β -actina, respecto a la cual se normalizaron los resultados de expresión de la proteína estudiada, ODC. Debido a que la proteína β -actina tiene un peso molecular de 42kDa, se procedió a la realización de un “stripping” de las membranas, una vez revelada la expresión de ODC. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el Western Blotting se describen en la **tabla 3**.

Anticuerpos Primarios	Tipo	Dilución
Ratón α -ODC	Monoclonal	1:100
Ratón α - β -actina	Monoclonal	1:5000

Anticuerpo Secundario	Tipo	Dilución
Conejo α -ratón	Policlonal	1:10000

Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios y diluciones empleados en la detección de ODC.

RESULTADOS

1. Expresión de ornitina descarboxilasa (ODC) en células normales y tumorales

Se ha descrito la abundancia de poliaminas en pacientes con cáncer colorrectal debido a la sobre-expresión del enzima ODC. Para validar nuestros modelos experimentales realizamos un estudio de expresión a nivel de proteína del primer enzima encargado de la síntesis de estas biomoléculas, la ODC (Ornitina descarboxilasa). Para ello, quisimos comprobar la cantidad relativa de la proteína ODC mediante "Western Blotting", tanto en células normales (células NCM460) como en células de carcinoma de colon humano (HT29). Como se muestra en la **Figura 12**, la expresión de la proteína ODC en células HT29 es significativamente mayor que en células NCM460. Realizamos dos membranas de PVDF (n=2) colocando las muestras en diferente orden para corroborar las posibles diferencias de expresión entre los dos tipos de células (**Figura 12A**). En ambos casos, se aprecia mayor intensidad de banda en las muestras HT29 respecto a las NCM460. La cuantificación relativa al control endógeno (β -actina) realizada por densitometría (**Figura 12B**) refleja que el enzima ODC se expresa hasta 14 veces más en las células tumorales que en las normales. Por tanto, podemos concluir que en las células tumorales hay mayor expresión de ODC lo que es consistente con una mayor biosíntesis de poliaminas característica del cáncer colorrectal.

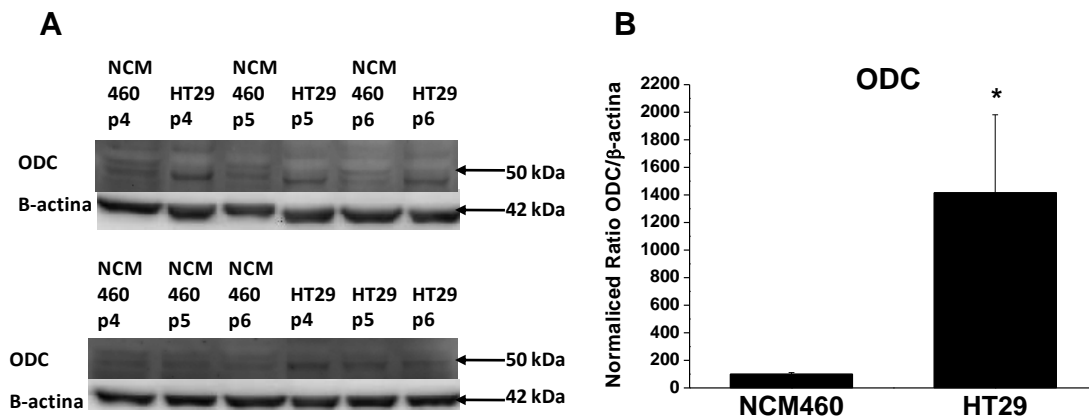


Figura 12. Expresión de ODC en células normales y tumorales. **A.** Membranas de PVDF en las que se muestra las bandas de la proteína ODC a 51kDa en relación a la β -actina (pm = 42kDa) que se encuentra en la parte inferior de cada membrana. Se puede comprobar que las bandas pertenecientes a HT29 son más oscuras que las de las NCM460. **B.** Representación gráfica de la cuantificación relativa por densitometría de ODC en NCM460 y HT29 (* $p < 0,05$, $n = 6$).

2. DFMO aumenta la liberación de Ca^{2+} inducida por ionomicina en células HT29

Una vez validado el modelo experimental de que las células tumorales tendrían mayor biosíntesis de poliaminas, quisimos determinar los efectos de la aplicación de un tratamiento que inhibe la síntesis de poliaminas. Para ello, tratamos las células HT29 con DFMO, un inhibidor suicida de la ODC durante tiempos variables y estudiamos los efectos del tratamiento

sobre el contenido de Ca^{2+} de los depósitos. Para estimar esta variable de modo indirecto, estudiamos los incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducidos por ionomicina en medio libre de calcio en células HT29 tratadas con solvente (Control) o DFMO.

En primer lugar, tras la aplicación de DFMO a una concentración 5mM durante 84 horas, procedimos a la monitorización de la liberación de Ca^{2+} de los depósitos mediante la perfusión de ionomicina 400nM, (ionóforo de Ca^{2+} que se ancla en las membranas biológicas y permite su paso) en medio libre de Ca^{2+} , en experimentos de imagen de fluorescencia en células HT29; previamente incubadas con Fura2/AM (Figura 13).

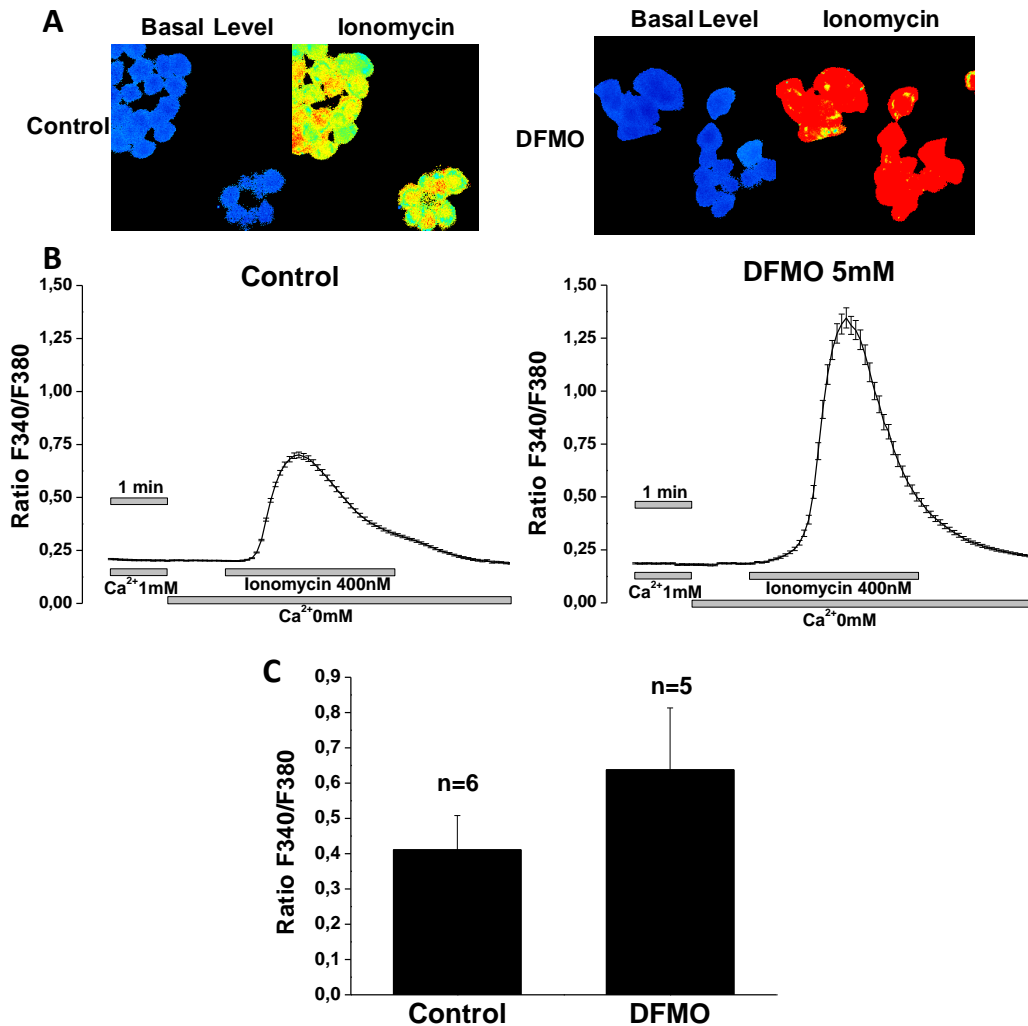


Figura 13. DFMO (5mM, 84 h) aumenta la liberación de Ca^{2+} inducida por ionomicina en células HT29. **A.** Imágenes de fluorescencia que refleja en pseudocolor los flujos de Ca^{2+} en las células HT29 controles y tratadas con DFMO 5mM a niveles basales y tras la perfusión de ionomicina. **B.** Representación del incremento del ratio F340/F380 para n =6-5 y p<0.05 (T-Student) en el que se observa $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ mayores en las células tratadas con DFMO que las células control, sin ser estadísticamente significativo. **C.** Gráficas representativas de los experimentos realizados con ionomicina en células control (n=6) (a la izquierda) y de células tratadas (n=5) (a la derecha) de las medias del ratio F340/F380 de la fluorescencia captada.

Observamos que las células tratadas con DFMO, ionomicina tiende a dar un mayor incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ respecto a las células control, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa. Dicha diferencia también se manifiesta en las imágenes en pseudocolor de ratio F340/F380. Estos experimentos de imagen de fluorescencia se repitieron diferentes días utilizando el mismo protocolo de actuación obteniendo una n=6 para los experimentos con células control y n=5 para los experimentos de las células tratadas. Los resultados sugieren que la inhibición de la síntesis de poliaminas podría inducir el aumento de la cantidad de calcio almacenada en los depósitos intracelulares. De ser ciertos, estos datos serían consistentes con una reversión del fenotipo tumoral hacia otro no tumoral. Sin embargo, las imágenes de fluorescencia de las células tratadas mostraron signos de saturación, lo que sugiere que se deberían repetir los experimentos con una sonda de menor afinidad como fura4F. Puede que en estas condiciones las diferencias alcanzasen significación estadística.

3. DFMO modifica la entrada de Ca^{2+} inducida por tapsigargina en células HT29

Siguiendo la hipótesis de que la inhibición de la síntesis de poliaminas puede inducir la reversión de un fenotipo tumoral a uno normal, la aplicación de DFMO debería mostrar alteraciones sobre la ECC, ya que es uno de los sistemas remodelados en las células tumorales. Al igual que en el experimento de la comprobación de los depósitos de Ca^{2+} con ionomicina, se procedió al tratamiento de células HT29 con DFMO 5mM durante 84 horas. Tras la incubación de las células con Fura-2 /AM, incubamos otros 10 minutos con un inhibidor de las bombas tipo SERCA, la tapsigargina, a una concentración $1\mu M$ en MEC nominalmente sin Ca^{2+} (+EGTA 0,5mM). La tapsigargina es un inhibidor irreversible de las bombas tipo SERCA que al quedar inhibidas conlleva el vaciado de los depósitos. Esto, con la perfusión de MEC con Ca^{2+} 1mM induce la ECC, permitiendo la estimación de la ECC máxima, con los depósitos completamente depletados. Los resultados indican que el tratamiento con DFMO induce cambios inesperados en la ECC (**Figura 14**). La ECC es paradójicamente mayor en las células tratadas con DFMO. Sin embargo, en los gráficos ampliados se puede apreciar que la cinética de la ECC sufre un retraso considerable (de unos 30 segundos) en aparecer respecto a las células HT29 control. Los cambios en la ECC de las células tratadas respecto a las células control también quedan reflejados en las imágenes en pseudocolor del ratio F340/F380.

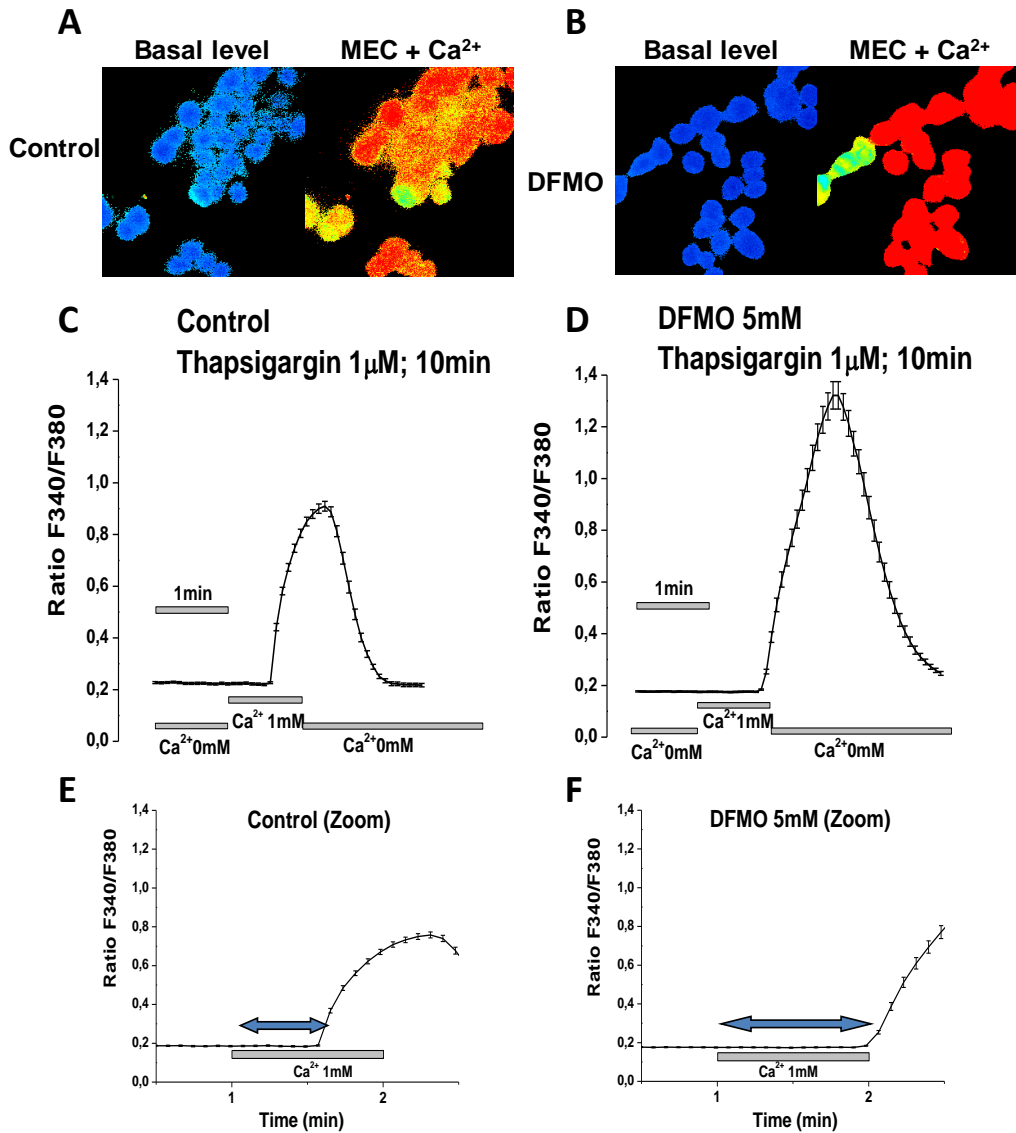


Figura 14. DFMO (5 mM x 84 h) modifica la entrada de Ca²⁺ inducida por tapsigargina en células HT29. A y B. Imagen de fluorescencia que refleja, en pseudocolor, los flujos de Ca²⁺ a nivel basal y tras la perfusión de un minuto de MEC con Ca²⁺ 1mM. **C y D.** Gráficas representativas realizada en células HT29 con un pre-incubación con tapsigargina durante 10 minutos en células control (n=6)(C) y células tratadas con DFMO (n=5) (D). Observamos que la ECC es mayor en las células tratadas que en las células control. **E y F.** Ampliando el momento de inicio del incremento de la ECC podemos apreciar como parece haber un retraso en la aparición de la ECC que se aprecia en todos los experimentos.

4. DFMO modifica la liberación y entrada de Ca^{2+} inducidas por CPA en células HT29

Ante los resultados obtenidos, se procedió a realizar experimentos de patch-clamp, realizados por la Dra. Miriam Hernández Morales para investigar posibles cambios en las corrientes de calcio en células HT29 tratadas con DFMO a distintas concentraciones y tiempos de tratamiento. Los resultados indicaron que los cambios más agudos parecen ser a las 24 horas tras retirar el tratamiento, mientras que a las 48 horas comenzaba a perderse el efecto del DFMO. Los resultados sugieren efectos importantes del tratamiento sobre las corrientes (HernDatos no mostrados para permitir su posible patentabilidad). Tras estos resultados quisimos ver si tratamientos más breves eran suficientes para inducir cambios a nivel del contenido de los depósitos de Ca^{2+} y en la ECC. Para ello, se realizaron una serie de experimentos aplicando DFMO 5mM durante 6 horas a células HT29 sembradas en cristales de 12 mm tratado con poli-Lisina empleando un inhibidor de las bombas SERCAs, cuyo efecto es reversible, CPA. Inicialmente los experimentos de imagen de fluorescencia con Fura2/AM que se llevaron a cabo fueron a una concentración de CPA de $10\mu\text{M}$, pero los resultados inducían a pensar que esta concentración no era suficiente para la inhibición completa de todas las bombas, de modo que se repitieron los experimentos con una concentración de $30\mu\text{M}$ para asegurarnos el vaciamiento completo de los depósitos de Ca^{2+} .

En los experimentos que se llevaron a cabo se analizó el contenido de Ca^{2+} de los depósitos y la ECC. Partiendo de una perfusión con MEC libre de Ca^{2+} se perfunde CPA $30\mu\text{M}$ en medio libre de Ca^{2+} que induce la liberación de Ca^{2+} de los depósitos, dándonos información sobre el tamaño de los mismos. Una vez recuperado los niveles basales perfundimos durante 1minuto, MEC con Ca^{2+} 1mM (en presencia de CPA $30\mu\text{M}$), lo que induce la activación de la ECC. Tras lo cual se perfunde medio libre de Ca^{2+} para retomar rápidamente los niveles basales.

Los resultados obtenidos a las 24 horas muestran una clara tendencia al aumento de los depósitos en células HT29 tratadas y a la alteración de la ECC, retrasándola en el tiempo, volviéndola más lenta y aumentando el pico de entrada (tras la perfusión de un minuto de CPA $30\mu\text{M}$). Al ver los experimentos de imagen de fluorescencia representativos de los resultados obtenidos a las 24 horas tras la aplicación del tratamiento de DFMO (**Figura 15**) se observa las fluctuaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ durante la perfusión de los distintos medios. Aparecen diferencias interesantes entre los experimentos control y los tratados sugiriendo de nuevo la posible restitución del fenotipo normal por aumento del tamaño de los depósitos de Ca^{2+} . Con la perfusión de CPA $30\mu\text{M}$ en Ca^{2+} 1mM durante un minuto se observa como la ECC de las células tratadas tiene un pico más alto que en las células control. Sin embargo, la pendiente de los incrementos es menor sugiriendo que la cinética de la entrada es más lenta en las células tratadas con DFMO. Los resultados obtenidos a las 48 horas muestran respuestas similares a los de 24 horas.

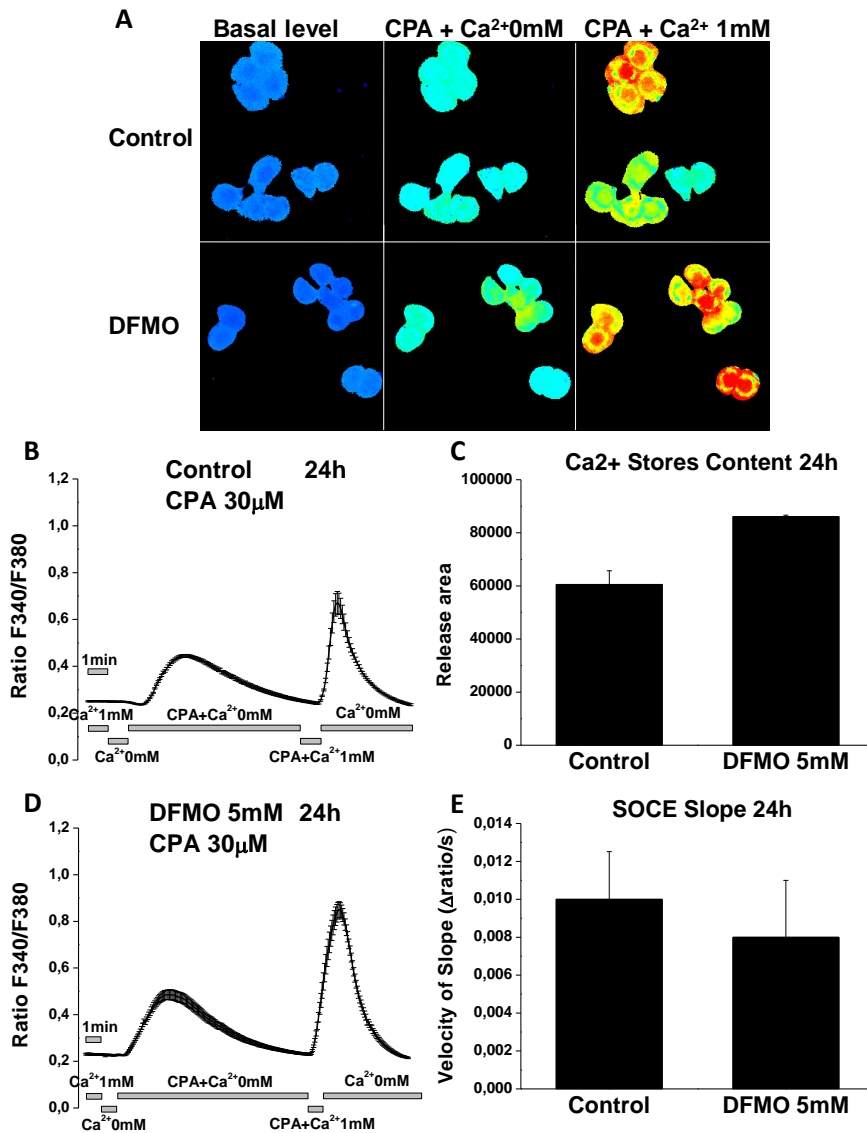


Figura 15. DFMO modifica la liberación y entrada de Ca²⁺ inducidas por CPA. Resultados obtenidos a las 24 horas tras la aplicación del tratamiento con DFMO (5mM, 6 h). **A.** Imagen de fluorescencia en pseudocolor que refleja los flujos de Ca²⁺ en células control y tratadas con DFMO (nivel basal y tras liberación y entrada de calcio). **B-D.** Gráficas representativas de la fluctuación del ratio F340/F380 a lo largo de los experimentos, mostrando liberación de Ca²⁺ y entrada de Ca²⁺. En las células tratadas (D) (n=3) parece haber aumento tanto en la liberación como en la entrada de Ca²⁺ intracelular respecto a las células control (B) (n=2). **C.** Representación del aumento de la liberación de Ca²⁺ (contenido de Ca²⁺ en los depósitos) en las células tumorales tratadas. **E.** Representación de la aparente disminución de la velocidad de inicio de la pendiente sobre la entrada de Ca²⁺ en las células tumorales tratadas.

5. Efectos de DFMO sobre la expresión de genes implicados en la entrada de Ca^{2+}

Una vez analizado el efecto de la inhibición de la ODC por medio de DFMO sobre la remodelación del Ca^{2+} intracelular, quisimos hacer un análisis de la expresión, a nivel de ARN mensajero (ARNm), de diferentes moléculas implicados en la homeostasis del Ca^{2+} citosólico por medio de la técnica de RT-PCR cuantitativa. Lamentablemente, la difusión pública de resultados de investigación susceptibles de ser protegidos intelectualmente echaría a perder cualquier intento de patentabilidad de los mismos. Por ello, y a sugerencia de investigadores expertos, se describen los resultados obtenidos enmascarando la identidad de los transcritos investigados (**Figura 16**). Los resultados de las correspondientes RT-PCRs cuantitativas, muestran que todos los genes/transcritos investigados ven disminuida su expresión en las células tratadas con DFMO.

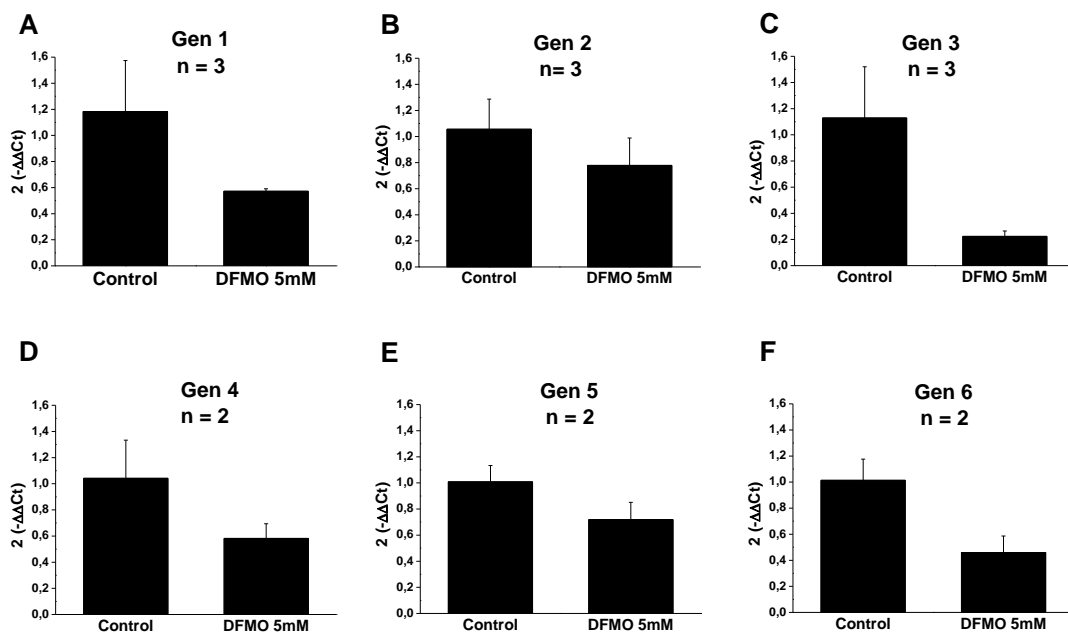


Figura 16. Efectos de DFMO (5mM x 6h) sobre la expresión de transcritos implicados en la entrada de Ca^{2+} . Expresión de transcritos en células tratadas con DFMO 5mM durante 48 h. n refleja el número de experimentos en cada caso.

DISCUSIÓN

Las fluctuaciones del Ca^{2+} intracelular regulan multitud de funciones celulares, tanto a corto como a largo plazo, entre las que se encuentran la proliferación celular, la migración y la muerte celular. Por lo que es lógico suponer que las células tumorales sufren una remodelación de la homeostasis del calcio intracelular. Nuestro grupo está interesado en investigar la remodelación del Ca^{2+} intracelular en cáncer de colon y sus bases moleculares para así buscar posibles soluciones farmacológicas para la reversión del remodelado y el retorno a un fenotipo celular normal. Siguiendo esta línea de pensamiento, en el presente trabajo se ha investigado los posibles efectos sobre el remodelado del calcio intracelular en el cáncer de colon de DFMO, un inhibidor suicida de la síntesis de poliaminas, que está actualmente en fase III de ensayo clínico en combinación con el AINE sulindac para la quimioprevención del cáncer colorrectal con resultados preliminares muy esperanzadores.

Está descrito que las células tumorales presentan elevadas concentraciones de poliaminas, lo cual está relacionado con la malignidad del tumor. Nuestros resultados muestran que la expresión del primer enzima de la síntesis de las poliaminas naturales y paso limitante de esta biosíntesis (ODC) está expresado 14 veces más que en las células normales NCM460. Lo que se relacionaría de modo exponencial con la altísima concentración de poliaminas en sangre y orina encontrada en muchos pacientes de cáncer, en general, y cáncer colorrectal en particular. La cuantificación relativa realizada por densitometría se realizó a partir de membranas de PVDF en las que aparecen las bandas de la proteína ODC. Sin embargo, estas bandas parecen localizarse ligeramente por debajo de los 50kDa, por lo que convendría optimizar el Western Blotting y poder así ratificar los datos obtenidos.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con DFMO induce modificaciones no significativas del contenido en calcio de los depósitos intracelulares y la cinética y tamaño de la entrada capacitativa de calcio. Los experimentos realizados mediante imagen de fluorescencia nos permiten determinar indirectamente el tamaño de los depósitos de Ca^{2+} a partir de la liberación de Ca^{2+} de los mismos, inducido por la perfusión de ionomina en medio libre de Ca^{2+} . Que la liberación de Ca^{2+} intracelular se vea aumentada, podría ser un signo de una restitución parcial del fenotipo normal. Sin embargo, el análisis estadístico de estos resultados no los da como significativos, por lo que se deberían de realizar más experimentos optimizando los tiempos de tratamiento para obtener conclusiones definitivas. Además, hemos observado que los picos de calcio inducidos por ionómicina son muy grandes y llevan a la saturación del colorante lo que podría haber ocultado las diferencias reales. Por ello, se deberían repetir los experimentos con una sonda de calcio de menor afinidad como Fura4F.

Además de los cambios en la liberación de Ca^{2+} también quisimos determinar cuáles eran los posibles efectos de DFMO sobre la ECC. Observamos una tendencia de cambio en el tamaño de la ECC, además de lo que parece ser un retardo en la aparición de la misma en las células tratadas. Las células parecen volverse "perezosas", por lo que parece, un enlentecimiento de la velocidad de la entrada de Ca^{2+} . Los registros electrofisiológicos mediante la técnica de patch-clamp mostraron cambios significativos en las corrientes (Datos no mostrados, Hernández-Morales, datos no publicados). Además, observamos que los cambios eran más evidentes a tiempos más breves. Por ello, repetimos nuestro estudio

utilizando tratamientos más breves y estudiando los efectos del ácido ciclopiazónico, un inhibidor reversible de las bombas tipo SERCA que permite estudiar liberación y entrada de calcio en el mismo experimento. Los resultados, aunque no han podido ser validados estadísticamente por falta de un número suficiente de experimentos, muestran una tendencia a cambios tanto de la liberación como de la entrada de Ca^{2+} . También realizamos estos experimentos utilizando un tratamiento de 48 horas con resultados muy similares (Datos no mostrados). En resumen, la inhibición de la síntesis de poliaminas parece inducir cambios en el contenido de calcio de los depósitos y la entrada capacitativa de calcio consistentes con un retorno del remodelado del calcio observado en las células de carcinoma de colon humano.

Los experimentos de imagen de fluorescencia o electrofisiología no nos dan información sobre las bases moleculares de los efectos observados. Para ello realizamos estudios de expresión de ARNm de algunos genes de canales implicados en la remodelación del Ca^{2+} , a los que llamamos Gen1, Gen2, Gen3, Gen4, Gen5 y Gen6 para preservar la patentabilidad de los resultados. Observamos que el tratamiento inducía una tendencia a disminuir la expresión de todos los genes estudiados, aunque los cambios relativos no eran similares. El gen control no mostró en cambio reducción indicando que los cambios eran específicos. Los cambios observados, aunque no es posible discutirlos en más detalle para preservar su patentabilidad, serían consistentes con la reversión del fenotipo tumoral.

En resumen, nuestros resultados indican que el DFMO, un agente quimiopreventivo de extraordinario interés, podría actuar sobre la remodelación del calcio y ser esta la base molecular de sus efectos quimiopreventivos. Si este extremo fuera cierto podría revelar el papel relevante de las poliaminas y la homeostasis del calcio intracelular en el cáncer colorrectal y previsiblemente otros tipos de tumores epiteliales.

CONCLUSIONES

1. La expresión de la enzima ornitindescarboxilasa (ODC) es significativamente mayor en las células de carcinoma de colon humano (HT29) que en las células normales de mucosa intestinal humana (NCM460).
2. El tratamiento crónico con DFMO (5mM x 84h) tiende a aumentar la liberación de Ca^{2+} inducida por ionomicina.
3. El tratamiento crónico con DFMO (5mM x 84h) tiende a modificar la magnitud y la cinética de la entrada capacitativa de Ca^{2+} inducida en células HT29.
4. El tratamiento crónico con DFMO (5mM x 6 h) tiende a aumentar la liberación de Ca^{2+} y entrada de Ca^{2+} inducidos por ácido ciclopiazónico en células HT29 a las 24 y 48 h.
5. El tratamiento crónico con DFMO (5mM x 48h) tiende a reducir de modo variable la expresión de mensajeros implicados en entrada de Ca^{2+} en células HT29.

Por lo tanto, las conclusiones anteriores serían consistentes con la hipótesis inicial de que las poliaminas podrían contribuir al remodelado del calcio intracelular y la adquisición de fenotipo tumoral en el cáncer colorrectal y que este proceso podría ser revertido mediante DFMO (Figura 17). Sin embargo, estos resultados son preliminares y se requieren numerosos estudios adicionales para confirmar la hipótesis de trabajo.

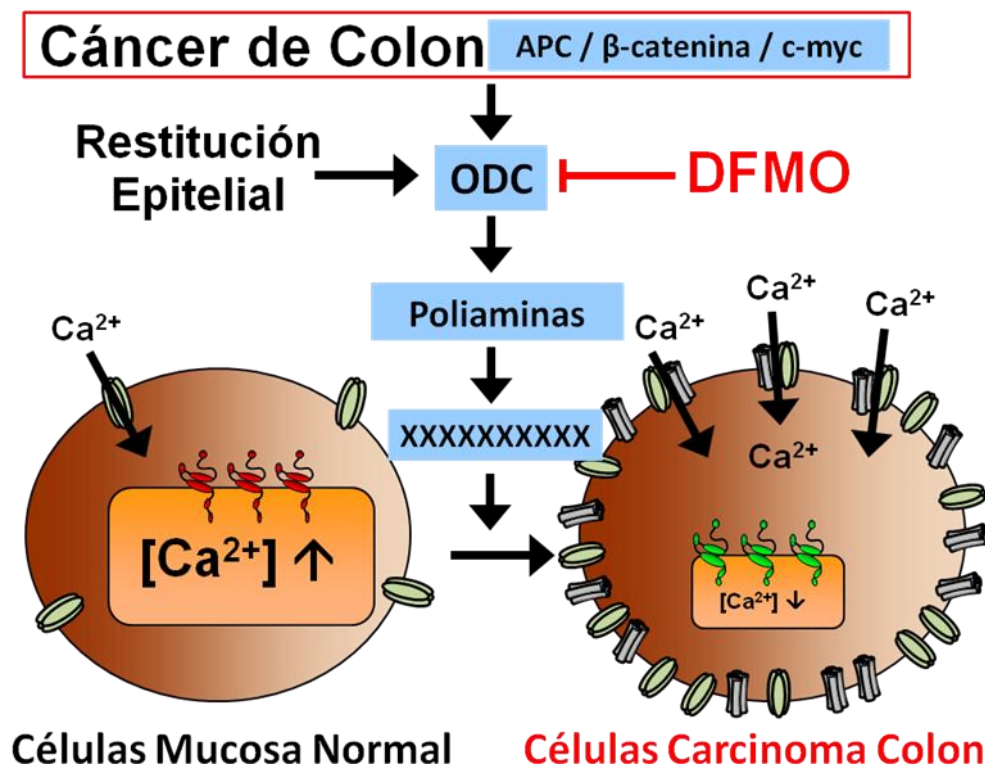


Figura 17. La inhibición de la síntesis de poliaminas podría revertir parcialmente el remodelado del calcio intracelular en el cáncer colorrectal.

BIBLIOGRAFÍA

- Berridge MJ, (1995). Capacitative calcium entry. *Biochem J.* 312, 1-11.
- Chamero P, Villalobos C, Alonso MT, García-Sancho J, (2002). Dampening of cytosolic Ca^{2+} oscillations on propagation to nucleus *J Biol Chem.* 277(52):50226-50239.
- Chan AT, Arber N, Burn J, Chia WK, Elwood P, Hull MA, Logan RF, Rothwell PM, Schrör K, Baron JA, (2012). Aspirin in the chemoprevention of colorectal neoplasia: an overview. *Cancer Prev Res.* 5(2):164-178.
- Grynkiewicz G, Poenie M y Tsien RY, (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440-3450.
- Gao JH, Guo LJ, Huang ZY, Rao JN, Tang CW, (2013). Roles of cellular polyamines in mucosal healing in the gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol.* 64: 681-693.
- Hernández-Morales et al., en preparación
- Hewavitharana T, Deng X, Soboloff J, Gill DL, (2007). Role of TIM and Orai proteins in the Store-operated calcium signaling pathway. *Cell Calcium* 42, 173-182.
- Hoth M, Penner R, (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355, 353-356.
- Jänne PA, Mayer RJ, (2000). Chemoprevention of colorectal cancer. *N Engl J Med* 342, 1960-1968.
- Kirichok y, Krapivinsky G, Clapham DE, (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427 (6972):360-364.
- Laukaitis CM, Gerner EW, (2011). DFMO: targeted risk reduction therapy for colorectal neoplasia. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 25(4-5):495-506.
- McLaren CE, Fujikawa-Brooks S, Chen WP, Gillen DL, Pelot D, Gerner EW, Meyskens FL Jr, (2008). Longitudinal assessment of air conduction audiograms in a phase III clinical trial of difluoromethylornithine and sulindac for prevention of sporadic colorectal adenomas. *Cancer Prev Res (Phila)* 1(7):514-521.
- Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibáñez I, Albillos A, García-Sancho J, Alvarez J, (2000). Chomaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* 2(2): 57-61.
- Muñoz E, Valero RA, Quintana A, Hoth M, Núñez L, Villalobos C, (2011). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit vascular smooth muscle cell proliferation by enabling the Ca^{2+} -dependent inactivation of Ca^{2+} release-activated calcium/Orai channels normally prevented by mitochondria. *J Biol Chem* 286, 16186-16196.
- Núñez L, Valero RA, Senovilla L, Sanz-Blasco S, García-Sancho J, Villalobos C, (2006). Cell proliferation depends on mitochondrial Ca^{2+} uptake: inhibition by salicylate. *J Physiol* 571, 57-73.

- Oshima et al., 1996; Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM, (1996). Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 29;87(5):803-809.
- Pani B, Cornatzer E, Cornatzer W, Shin DM, Pittelkow MR, Hovnanian A, Ambudkar IS, Singh BB, (2006). Up-regulation of transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) following sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2 gene silencing promotes cell survival: a potential role for TRPC1 in Darier's disease. *Mol Biol Cell* (10):4446-4458.
- Parekh AB, Putney JW Jr, (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol. Rev* 85, 757-810.
- Putney, J.W., Jr. (1986). A model for receptor regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7, 1-12.
- Putney JW Jr, (1990). Capacitative calcium entry revises. *Cell Calcium* 11, 611-624.
- Quintana A, Pasche M, Junker C, Al-Ansary D, Rieger H, Kummerow C, Nuñez L, Villalobos C, Meraner P, Becherer U, Rettig J, Niemyer BA, Hoth M, (2011). Calcium microdomains at the immunological synapse: how Orai channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for efficient T-cell activation. *EMBO J* 30(19):3895-3912.
- Rao JN, Rathor N, Zhuang R, Zou T, Liu L, Xiao L, Turner DJ, Wang JY, (2012). Polyamines regulate intestinal epithelial restitution through TRPC1-mediated Ca²⁺ signaling by differentially modulating STIM1 and STIM2. *Am J Physiol Cell Physiol* 303: C308-317.
- Rial NS, Meyskens FL, Gerner EW, (2009). Polyamines as mediators of APC-dependent intestinal carcinogenesis and cancer chemoprevention. *Essays Biochem.* 46, 111-124.
- Sobradillo D, Hernández-Morales M, Ubierna D, Moyer MP, Núñez L, Villalobos C. A reciprocal shift in TRPC1 and Stim2 drives Ca²⁺ remodeling in human colon carcinoma cells. (en revisión).
- Sporn MB, Hong WK, (2008). Clinical prevention of recurrence of colorectal adenomas by the combination of difluoromethylornithine and sulindac: an important milestone. *Cancer Prev Res (Phila)*. 1(1):9-11.
- Takemura H, Hughes AR, Thastrup O, Putney JW Jr, (1989). Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J Biol Chem* 264(21):12266-12271.
- Tsien RW, Tsien RY, (1990). Calcium channels, stores and oscillations. *Annu Rev Cell Biol* 6, 715-760.
- Valero RA, Senovilla L, Núñez L, Villalobos C, (2008). The role of mitochondrial potential in control of calcium signals involved in cell proliferation. *Cell Calcium* 44, 259-269.
- Villalobos C, García-Sancho J, (1995). Capacitative Ca²⁺ entry contributes to the Ca²⁺ influx induced by thyrotropin-release hormone (TRH) in GH3 pituitary cells. *Pflügers Archive: European journal of physiology* 430 (6):923-935.
- Yano K, Petersen OH, Tepikin AV, (2004). Dual sensitivity of sarcoplasmic/endoplasmic Ca²⁺-ATPase to cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ as a mechanism of modulating cytosolic Ca²⁺ oscillations. *Biochem J* 383, 353-360.