



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

TESIS DOCTORAL EN BIOLOGIA

Efectos del calcitriol en células de
músculo esquelético normal y de
rabdomyosarcoma.

Licenciada Ana Paula IRAZOQUI

Bahía Blanca

Argentina

2017



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

TESIS DOCTORAL EN BIOLOGIA

**Efectos del calcitriol en células de músculo
esquelético normal y de rabdiosarcoma.**

Licenciada Ana Paula IRAZOQUI

Bahía Blanca

2017

Argentina

Directora de la Tesis

Dra. Claudia Graciela Buitrago

Lugar

Laboratorio de Endocrinología Básica I
INBIOSUR (CONICET – UNS)

Prefacio

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Biología, de la Universidad del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia (UNS) y en el laboratorio de Endocrinología Básica 1 del Instituto Nacional de Investigaciones Biológicas y Biomédicas (INBIOSUR) del Sur, durante el período comprendido entre el 15 de octubre del 2013 y el 7 de agosto de 2017, bajo la dirección de la Dra. Claudia Graciela Buitrago Profesora Asistente de Química Biológica General e Investigadora Independiente del INBIOSUR-CONICET.

Lic. Ana Paula IRAZOQUI

7 de agosto de 2017

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

a Martina

Agradecimientos

A Claudia Buitrago, mi directora, por guiarme y acompañarme durante todos estos años de aprendizaje y por su apoyo en todo lo que fuera surgiendo referido al trabajo de la tesis y en todas aquellas oportunidades que este trabajo brinda, alentándome siempre a intentar algo más, a probar algo nuevo.

Al Dr. Ricardo Boland, por haberme permitido trabajar en su laboratorio. Por haber sido una guía y una motivación, no solo en los primeros dos años en los que estuvo físicamente, sino durante toda la realización del doctorado, cuando revisábamos anotaciones de las reuniones con él y probábamos, junto con Claudia, aquellas ideas que él nos había dado.

A la Dirección del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia por permitirme inscribir como alumna de la carrera de Doctor en Biología.

A la Universidad Nacional del Sur y al Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur por brindarme lugar de trabajo y todas las herramientas y los medios necesarios para poder llevar a cabo esta Tesis Doctoral.

A todos los integrantes del Laboratorio de Endocrinología Básica, por su ayuda y colaboración muy valiosa en mi aprendizaje, a aquellos que siguen y quienes se fueron, por hacer del laboratorio un lugar de trabajo donde es posible sentirse cómoda y acompañada, un lugar donde hice buenas amigas.

A Gastón, Edgardo y Pablo, por su ayuda y paciencia en el análisis y obtención de resultados con el citómetro de flujo (Gastón y Pablo) y con el microscopio confocal (Edgardo)

A mis amigos de siempre, los “NN et al” y a “Las Marías”, que aunque están muy lejos y dispersos por todos lados, siempre los siento cerca, me bancan y me ayudan cada vez que los necesito.

A mi mamá, papá y hermanos, por el apoyo incondicional de siempre. A Matías que siempre me colabora con la parte informática. A mi primo Lisandro, que me hizo el

arte de la tapa. También a Eduardo que me banco en todas, aunque mucho no entendía, siempre me escuchó.

Y muy especialmente a MARTINA, por ser mi motivación, mi sostén, mi amor, mi todo.



Resumen

El metabolito activo de la vitamina D es el calcitriol o $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamina D_3 (1,25D). El 1,25D ingresa a la célula difundiendo a través de la membrana plasmática y se une a su receptor, el receptor de la vitamina D (VDR). Este complejo desencadena acciones rápidas, no genómicas (como la activación de vías de señalización MAPKs, y la generación de segundos mensajeros, como el aumento del Ca^{2+} intracelular) o efectos genómicos que requieren generación de nuevas proteínas. Dado que la mayor parte de los efectos del 1,25D reportados involucran al VDR y éste se expresa en la mayoría de los tejidos, esta hormona esteroide se considera pleiotrópica. En el laboratorio donde trabajo, se ha demostrado que el VDR se expresa en el músculo esquelético y que el tratamiento con 1,25D (10^{-9} M) es capaz de promover a proliferación y la activación de vías de señalización como las MAPKs, Akt, con la participación de Src, muy rápidamente, tanto en mioblastos proliferativos como en miotubos diferenciados. Por otro lado está ampliamente documentado que el 1,25D tiene efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos en varios tipos de cáncer.

En este trabajo de Tesis Doctoral, se evidenció que en la línea de músculo esquelético normal C2C12, durante la fase proliferativa, el tratamiento con 1,25D (10^{-9} M) promueve la expresión del VDR y la activación de p38 MAPK y ERK 1/2, que promueven la expresión de las CDK 4/6. Más tarde, durante el arresto promotor de diferenciación, iniciado por el 1,25D, la expresión del VDR y la activación de la p38 MAPK son esenciales para inducir el aumento en la expresión de la ciclina D3, de los CKIs $\text{p}21^{\text{Cip1/WAF1}}$ y $\text{p}27^{\text{Kip1}}$, y del marcador de diferenciación muscular miogenina, el cual también requiere que la ciclina D3 se exprese. En las células C2C12 que están en la etapa de diferenciación temprana, en la fase de alineación (previo a la fusión celular para la formación del miotubo), la hormona esteroide 1,25D unida a su receptor tiene la capacidad de activar la tirosina quinasa no receptora Src y las MAPKs ERK 1/2 y p38

MAPK, a tiempos cortos (hasta de una hora), sin embargo no es capaz de modificar la expresión de proteínas (como las ciclinas D1 y D3 o la caveolin-1).

El rhabdomioma (RMS) es el cáncer de tejido blando más común entre los niños y tiene características de músculo esquelético, a pesar de tener múltiples orígenes. La línea RD es una línea celular de rhabdomioma humano, originada de biopsias de una paciente caucásica de siete años de edad. A pesar de la evidencia acumulada de los efectos antineoplásicos de la hormona esteroide 1,25D, en diferentes tipos de cáncer, solo existe un reporte de los efectos de este esteroide en RMS, en líneas diferentes a la línea RD.

En esta Tesis Doctoral, se evidenció que las células RD expresan basalmente VDR y que el tratamiento con la hormona durante 24 y 48 horas promueve un incremento de este receptor. Además el 1,25D (10^{-9} M) promueve la activación de p38 MAPK, vía su quinasa *upstream* inmediata MKK 3/6 y Src a tiempos cortos en las células RD. De relevancia, se observó que la activación de p38 MAPK es necesaria para la activación de Src, pese a ser esta una quinasa *upstream* de las MAPKs. El tratamiento con 1,25D durante 72 horas provoca una marcada disminución en la expresión del VDR junto con una inhibición en la proliferación (ya que decrece la cantidad de células vivas y aumenta la expresión de p15^{INK4}). Conjuntamente, la hormona no promueve la diferenciación celular (ya que no se observan cambios morfológicos y disminuye la expresión de marcadores de diferenciación tempranos) y estimula la apoptosis (aumentando la expresión de los mediadores ciclina D1 y CDK4 y causando picnosis mitocondrial y pérdida de la red mitocondrial).

En conclusión, el metabolito activo de la vitamina D, el calcitriol tiene efectos opuestos en el músculo esquelético normal y el transformado, ya que en el primero promueve la proliferación seguida de un arresto pro-diferenciativo, mientras que en RMS es capaz de inducir la apoptosis.

Abstract

The vitamin D active metabolite is the calcitriol or $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{-vitamin D}_3$ (1,25D). The 1,25D diffuse into the cell through the plasmatic membrane and it binds to its receptor, the vitamin D receptor (VDR). This complex triggers non-genomic, rapid actions (like activation of MAPKs pathways, and second messengers, like intracellular Ca^{2+} increase) or genomic effects that require protein synthesis. Almost all of the 1,25D actions require the VDR, and this receptor is expressed in almost all tissues, this steroid hormone is pleiotropic. In the laboratory where I investigate, it was demonstrated that the VDR is expressed in skeletal muscle and 1,25D treatment promotes proliferation and activation of MAPK, Akt, and the tyrosine kinase Src, quickly, in both proliferating myoblast and differentiated myotubes. By another hand, it was largely reported that 1,25D exerts antiproliferative and proapoptotic effects in many different cancer types.

In this Ph.D. Thesis, it was evidenced that in normal skeletal muscle cell line C2C12, in the proliferative state, 1,25D (10^{-9} M) treatment promotes VDR expression and p38 MAPK and ERK 1/2 pathways activation, and all these together induce CDK 4/6 expression. Then, during pro-differentiative arrest induced by 1,25D, the VDR expression, and p38 MAPK activation are key events to promote an increase in Cyclin D3, CKIs p21^{cip1/WAF1} and p27^{kip1} and myogenin expression. In C2C12 cell, in an early differentiation state, during myoblast alignment, 1,25D through its receptor induce Src, ERK 1/2 and p38 MAPK pathways activation, within a few minutes, but this short treatment cannot modify some proteins expression involved in differentiation process (like Cyclin D3 and D1, or caveolin-1).

Rhabdomyosarcoma (RMS) is the soft tissue cancer most common in children with skeletal muscle features, although it has different origins. The RD cell line is a human RMS cell line, originated from biopsies from a seven years old Caucasian patient. There is accumulated evidence about antineoplastic effects of 1,25D, in different cancer

types; nevertheless, there is only one report relative to the effects of this steroid hormone treatment developed in RMS cell lines different to RD.

In this PhD. Thesis, it was shown that RD cells express basally VDR and hormone treatment during 24 and 48 hours promotes an increase of this receptor. Moreover, 1,25D (10^{-9} M) promotes p38 MAPK activation via its immediate upstream kinase, MKK 3/6, and Src at short times of steroid exposition. Of relevance, it was observed that p38 MAPK activation is necessary for the activity of Src, despite this being an upstream kinase of MAPKs. Treatment with 1,25D for 72 hours causes a decrease in VDR expression and the inhibition in proliferation (since it decreases the amount of living cells and increases the expression of p15^{INK4}). This steroid treatment does not promote differentiation, since no morphological changes were observed and the expression of early differentiation markers falls. Furthermore, 1,25D stimulates apoptosis increasing the expression of cyclin D1 and CDK4 mediators and causing mitochondria pyknosis and disruption of mitochondrial network).

In conclusion, the active metabolite of vitamin D, calcitriol has opposite effects on normal and transformed skeletal muscle cells, since in the normal cells it promotes proliferation followed by a pro-differentiative arrest, whereas in RMS it is capable of inducing apoptosis.

Índice

Prefacio.....	I
Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Resumen.....	V
Abstract.....	VII
Abreviaturas.....	1
Introducción.....	5
La Vitamina D	6
Química, fisiología y metabolismo de la vitamina D.....	7
Receptor de Vitamina D – VDR.....	9
Acciones del 1,25D	14
El Músculo Esquelético.....	22
Histología	22
Origen y desarrollo.....	23
Células satélites	24
Masa muscular: salud y enfermedad.....	24
Rabdomiosarcoma.....	26
Origen y clasificación	26
Epidemiología: incidencia, pronosis y mortalidad.	28
Tratamientos en la actualidad	31
El ciclo celular.....	32
Fases	32
Diferenciación del músculo esquelético.....	40
Apoptosis	42

Hipótesis y Objetivos.....	45
Hipótesis.....	46
Objetivos	46
Objetivos Generales.....	46
Objetivos específicos:	46
Materiales y Métodos	48
Materiales	49
Modelos experimentales	51
Línea celular de músculo esquelético normal: C2C12	51
Línea celular de RMS: RD.....	53
Métodos.....	54
Cultivo celular	54
Tratamientos de las células con 1,25D.....	55
Western blot.....	57
Ensayos de Inmunocitoquímica.....	59
Marcación de las mitocondrias	60
Transfección de ARN de interferencia corto	61
Citometría de flujo por incorporación de yoduro de propidio (IP)	62
Retrotranscripción y PCR cuantitativa en Tiempo Real - qRT-PCR.....	62
Análisis de apoptosis por citometría de flujo.....	64
Análisis estadísticos.....	65
Capítulo I - Rol del 1,25D en el músculo esquelético normal.....	66
Resultados.....	67
Efectos de la transfección de un shRNA contra el VDR, a nivel del ARNm y de la proteína.....	67
Progresión del ciclo celular en la línea C2C12 bajo el estímulo de suero fetal bovino (SFB)	69
Efectos del tratamiento con 1,25D de las células C2C12.	71

La hormona 1,25D modula la expresión de CDK 4/6 en células C2C12 de manera dependiente del VDR.	72
Los niveles de CDK 4/6 inducidos por el 1,25D a las 6 horas de tratamiento también se evidenciaron por inmunocitoquímica	75
ERK 1/2 y p38 MAPK participan en la regulación positiva de las CDK 4/6 dependiente de la hormona.....	77
CDK 4 co-localiza con el VDR en el núcleo celular después de 12 horas de tratamiento con 1,25D; mientras que CDK 6 aumenta su localización perinuclear en respuesta a la hormona.....	79
Participación de p38 MAPK en el ciclo celular de la línea C2C12wt y C2C12shVDR	82
El VDR está implicado en los cambios de expresión de la ciclina D3 y ciclina D1 por estímulo hormonal.....	84
Participación de p38 MAPK en el aumento en la expresión de la ciclina D3 promovido por el 1,25D	86
La inducción de los CKIs p21 ^{Waf1/Cip1} y p27 ^{Kip1} por el 1,25D es dependiente del VDR.	88
El VDR y la quinasa p38 MAPK están involucrados en la expresión de miogenina promovida por el 1,25D en las células musculares C2C12.....	92
Co-localización entre el VDR y la ciclina D3 en las células musculares C2C12: participación de p38 MAPK	95
El silenciamiento de la ciclina D3 inhibe la expresión del VDR y el aumento de miogenina, provocados por el 1,25D en células de músculo esquelético	98
Discusión	99
Conclusiones	106
Resumen	107
Capítulo II – Rol del 1,25D en el ciclo celular de células musculares esqueléticas transformadas.	108
Resultados.....	108
Expresión del VDR en células RD.....	109
El tratamiento con 1,25D inhibe la proliferación de las células.	110

La hormona provoca cambios en la expresión de proteínas claves en la detención del ciclo celular en células RD.....	111
El tratamiento con 1,25D no provoca cambios en la morfología de las células RD	112
El tratamiento de las células RD con la hormona disminuye la expresión de marcadores de la diferenciación muscular.	113
El tratamiento con 1,25D provoca el aumento de dos proteínas: CDK4 y ciclina D1 considerados reguladores de la apoptosis	115
Desorganización de la red mitocondrial promovida por el 1,25D.	117
El tratamiento con 1,25D de células RD disminuye el porcentaje de células vivas y aumenta la apoptosis temprana y tardía.....	119
Discusión.....	121
Conclusión.....	124
Resumen.....	125
Capítulo III - Acciones rápidas no-genómicas del 1,25D en células musculares normales y de rhabdomyosarcoma.....	126
Resultados.....	127
Modulación de ERK 1/2, p38 MAPK y Src en células C2C12 en proceso de diferenciación: rol del VDR.....	127
Expresión de las ciclina D1 y D3 y de caveolina-1 durante tratamientos cortos con 1,25D: participación del VDR	130
Modulación de ERK 1/2, p38 MAPK y Src por el 1,25D en células RD.....	132
La activación de Src es requerida para la fosforilación de MKK 3/6 y p38 MAPK inducida por el 1,25D.	133
La activación de p38 MAPK es requerida en la activación de Src y MKK 3/6 por el 1,25D	136
Discusión.....	137
Conclusión.....	141
Resumen.....	142
Conclusiones Generales	143

Rol del 1,25D en el ciclo celular de células musculares esqueléticas normales.	144
Rol del 1,25D en el ciclo celular de células musculares esqueléticas transformadas	145
Acciones rápidas no-genómicas del 1,25D en células musculares normales y de rabdomyosarcoma.....	145
Interpretación Final.....	146
Referencias Bibliográficas.....	147
Trabajos generados.....	182
Trabajos generados a partir de esta Tesis.....	183
Publicaciones en revistas científicas con referato.....	183
Resúmenes publicados en revistas científicas.....	183
Presentaciones a congreso.....	184

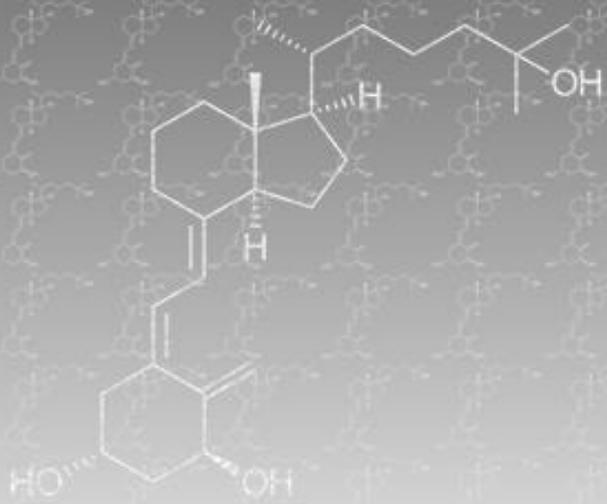
Abreviaturas

1,25D	1 α , 25 - dihidroxivitamina D ₃ o calcitriol
1α-Ohasa	25D -1 α - hidroxilasa
24-OHasa	25D – 24 - hidroxilasa
25D	25-hidroxivitamina D
25D-Ohasa	Vitamina D - 25 - hidroxilasa
7-DHC	7-dehidrocolesterol
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
ADNc	Ácido Desoxiribonucleico complementario
AMPc	Adenosín Monofosfato cíclico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AV	<i>Annexin V</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
CaMKII	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II</i>
cav-1	<i>Caveolin-1</i>
Cdc25	<i>Cell division cycle 25</i>
Cdc6	<i>Cell division cycle 6</i>
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i>
Cdt1	<i>Chromatin Licensing And DNA Replication Factor 1</i>
ChIP-seq	<i>Chromatin Immunoprecipitation with sequencing</i>
Chk1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
CKIs	<i>CDK inhibitors</i>
Cln3	<i>Ceroid-lipofuscinosis, neuronal 3</i>
CoAs	co-Activadores
CoRs	co-Represores

CYP24A1	25D – 24 – hidroxilasa
CYP27B1	25D -1 α – hidroxilasa
CYP2R1	Citocromo P450
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DBD	<i>DNA Binding Domain</i>
DBP	<i>Vitamin D-binding Protein</i>
DL	Desequilibrio de Ligamiento
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ER	Enzima de Restricción
ERK 1/2	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2</i>
ERp57	<i>Endoplasmatic Reticulum protein 57</i>
ERp60	<i>Endoplasmatic Reticulum protein 60</i>
FOXO	<i>Forkhead box protein O</i>
GRP58	<i>Glucose Respond Protein 58</i>
HAT	Histone Acetil Transferasa
HS	<i>Horse serum</i>
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
IL-1	<i>Interleukin-1</i>
IL-4	<i>Interleukin-4</i>
INK4	<i>Inhibitor of CDK4</i>
IP	<i>Ioduro de Propidio</i>
IP3	<i>Phosphatidilinositol-3</i>
Kb	kilobases = 1000 bases
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MdC	Medio de Crecimiento
MdCag	Medio de Crecimiento con alto contenido de glucosa
MdCbg	Medio de Crecimiento con bajo contenido de glucosa
MdD	Medio de Diferenciación
MHC	Myosin Heavy Chain
miRs	micro ARNs

MKK 3/6	<i>MAP-Kinase-Kinase 3/6</i>
MRF	<i>Myogenic Regulator Factor</i>
MyF5	<i>Myogenic Factor 5</i>
MyoD	<i>Myoblast Determination</i>
OMS	<i>Organización Mundial de la Salud</i>
ORC	<i>Origin replication center</i>
PAX	<i>Paired box protein</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
Pdia3	<i>Protein disulfide isomerase, family A, member 3</i>
PI3	<i>Phosphatidilinositol-3</i>
PI3K	<i>Phosphatidilinositol-3-Kinase</i>
PKA	<i>Protein Kinase A</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PLA2	<i>Phospholipase A2</i>
PLAA	<i>PLA2 activator protein</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PP2A	<i>Protein Phosphatase 2A</i>
PRC	<i>Pre-Replicative Complex</i>
PS	<i>Phosphatidylserine</i>
qRT-PCR	<i>quantitative Real Time- Polymerase Chain Reaction</i>
RANK	<i>Receptor Activator Nuclear Kappa</i>
RANKL	<i>Receptor Activator Nuclear Kappa Ligand</i>
Rb	<i>Retinoblastoma Protein</i>
RE	<i>Response Element</i>
RMS	<i>Rabdomiosarcoma</i>
RXR	<i>Retinoic-X Receptor</i>
SFB	<i>Suero Fetal Bovino</i>
shRNAs	<i>short-hairpin Ribonucleic Acid</i>
siRNA	<i>short interfering Ribonucleic Acid</i>

SNPs	<i>Simple Nucleotide Polymorphisms</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline - 0,1% Tween-20</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
UV	<i>Ultravioleta</i>
VDR	<i>Vitamin D Receptor</i>
VDRE	<i>Vitamin D Response Elements</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>



Introducción

La Vitamina D

Ya los antiguos griegos observaron que la exposición a la luz solar tenía beneficios y se asociaba a una buena salud. Hipócrates (460 AC.), “el padre de la medicina”, utilizaba la helioterapia (palabra que deriva de dos palabras griegas: *Helios*, significa sol, y *therapeia*, que significa poder para sanar) para el tratamiento de la enfermedad que hoy conocemos como tuberculosis (Mayer 1921) y Heródoto recomendaba el sol como cura para los "músculos débiles y blandos" y aconsejaba a los atletas olímpicos exponerse a la luz solar para mejorar su rendimiento físico.

A partir del siglo XVII, el raquitismo era una característica de la vida en las ciudades británicas y norteamericanas industrializadas, donde se comenzó a buscar terapias experimentales para su tratamiento. Recién a fines del siglo XIX y principios del XX, varios grupos de investigación demostraron que la luz solar y el aceite de hígado de bacalao prevenían o curaban esta condición (Cheadle 1888; Mayer 1921). En 1903, Niels Finsen obtuvo el Premio Nobel por demostrar que la exposición a la luz ultravioleta (UV) podría ser utilizada para tratar la tuberculosis cutánea (Møller et al. 2005). Llamativamente, ya en 1909, Rose proponía como tratamiento para la tuberculosis que los niños debían tener más clases al aire libre y de esta forma abarcar los cuatro factores principales del tratamiento (aire fresco y movimiento, nutrición adecuada, sueño adecuado y tratamiento desde pequeños), evitando así, que los niños pasen largos períodos de tiempo de su infancia dentro de las aulas, ya que habían visto que los niños más saludables eran aquellos que pasaban más tiempo al aire libre (Rose 1909)

Más tarde en el siglo XX, se comenzó a elucidar que la deficiencia de vitamina D era la mayor causa de raquitismo (Craig y Belkin 1925), y por esto en Europa se incorporó la fortificación y suplementación de la dieta con vitamina D y se promovió la exposición a los rayos UV, siendo herramientas claves para reducir la incidencia de raquitismo en la población urbana pobre (Bivins 2014)

En 1952, el fisiólogo deportivo Spellerberg realizó un extenso estudio de los beneficios de la radiación UV sobre el rendimiento físico y las habilidades motoras de los atletas de élite (Spelleberg 1952), que, según comenta Walrand, llevaron al científico a informarlo al Comité Olímpico (Walrand 2016). Años más tarde se asociaron todos los beneficios de la exposición a la luz solar e irradiación con luz UV a la síntesis de los metabolitos activos de la vitamina D (Bivins 2014; Marcinkowska, Wallace y Brown 2016; Walrand 2016).

Química, fisiología y metabolismo de la vitamina D

La pre-vitamina D₃ es una molécula lipofílica compleja cuya fórmula fundamental es C₂₇H₄₄O y su peso molecular es 384.64 g/mol¹. Hay dos fuentes principales de obtención de la misma: la síntesis cutánea y mediante la incorporación a través de la dieta. La mayor parte se obtiene a partir de la síntesis cutánea (Heath y Elovic 2006; Shinchuk y Holick 2007; Wacker y Holiack 2013; Zhang et al. 2015; Munns et al. 2016). Cuando el sol impacta en la piel, la porción UVB del espectro solar entra en la epidermis y dermis y rompe el anillo B del 7-dehidrocolesterol (7-DHC) para generar la pre-vitamina D₃, en una reacción no enzimática y dependiente de la luz (Holick et al. 1980; MacLaughlin, Anderson y Holick 1982) (Ilustración 1). Una vez sintetizada, la pre-vitamina D₃ se convierte en vitamina D₃ a través de una reacción dependiente del calor (Holick 2011). Todo este proceso está influenciado por el momento del día, la estación del año, la latitud, la edad, el uso de protectores y bloqueadores solares, y el grado de pigmentación cutánea; además, una exposición excesiva también puede causar la formación de fotoproductos inactivos (Sayre y Dowdy 2007; Shinchuk y Holick 2007; Knutsen et al. 2010; Reuss-Borst 2014; Zhang et al. 2015). En menor proporción, se obtiene vitamina D por ingesta en la dieta (Heath y Elovic 2006; Shinchuk y Holick 2007; Reuss-Borst 2014). El ergocalciferol (vitamina D₂) se encuentra principalmente en plantas o productos de origen vegetal, mientras que el colecalciferol (vitamina D₃) se encuentra principalmente en los productos animales como

¹ <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281058#section=Top>

pescados grasos, aceite de hígado de bacalao, huevos y lácteos (Pereira, Larriba y Muñoz 2012) y en alimentos suplementados. La diferencia entre la vitamina D₂ y D₃, reside en las cadenas laterales, lo que afecta la capacidad de unión a la proteína de unión a la vitamina D (*vitamin D-binding protein* - DBP) y en consecuencia su metabolismo (Bikle 2012) pero a los fines prácticos, ambos compuestos son tratados como equivalentes.

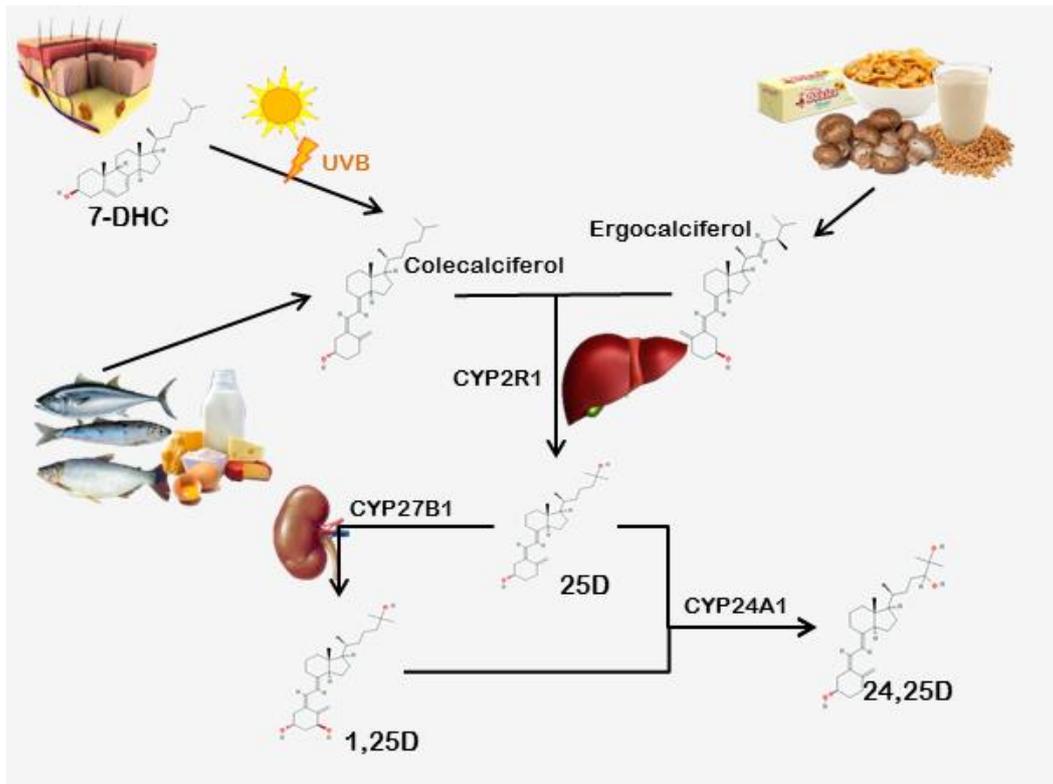


Ilustración 1: Resumen del metabolismo de la vitamina D.

Mientras que circulan en la sangre, la vitamina D y sus metabolitos siempre están unidos a la DBP (Ali y Vaidya 2011). La DBP lleva a la vitamina D desde la piel al hígado donde se metaboliza por la enzima vitamina D - 25 - hidroxilasa (25D-OHasa), también conocida como el citocromo P450 (CYP2R1) (Ilustración 1). El producto de esta reacción es la forma biológicamente inactiva, el 25-hidroxivitamina D₃ (25D), que sale del hígado y circula por sangre hasta llegar a los riñones donde continúa metabolizándose. El próximo paso es la hidroxilación del 25D en los túbulos renales a 1 α , 25 - dihidroxivitamina D₃ (calcitriol, 1,25D) por la enzima 25D -1 α - hidroxilasa (1 α -OHasa), también conocida como

CYP27B1 (Ilustración 1). La acumulación tanto de 25D como de 1,25D puede actuar como retroalimentación negativa para el metabolismo de la vitamina D₃, por inhibición de la 25-OHasa y la 1 α -OHasa, respectivamente. Para prevenir el exceso de 25D y de 1,25D, éstos son metabolizados por la 25D – 24 - hidroxilasa (24-OHasa o CYP24A1) a fin de facilitar la excreción biliar de los productos 24, 25 - hidroxivitamina D (24,25D) (Wintermeyer et al. 2016) (Ilustración 1). Al llegar a la membrana plasmática de la célula *target*, por circulación sanguínea, tanto el 25D como el 1,25D son librados de la DBP y difunden libremente por la membrana lipídica al interior celular. Una vez dentro de la célula, el 1,25D se asocia al receptor de la vitamina D (*vitamin D receptor* – VDR).

Receptor de Vitamina D – VDR

La capacidad de la hormona 1,25D de cumplir una amplia variedad de funciones en diferentes tejidos, incluso en diferentes especies, se debe a la presencia del receptor de la vitamina D (Norman 2006). El VDR es una proteína del tipo receptora de esteroides, muy conservada desde los vertebrados inferiores hasta los humanos (Darwish y Deluca 1996; Kollitz et al. 2015). Se encuentra en el citoplasma y se une específicamente al 1,25D desencadenando cambios que influyen en el comportamiento de la célula. La acción más clásica del complejo hormona esteroide – receptor esteroide es la de regular la transcripción de segmentos específicos de ácido desoxiribonucleico (ADN), al unirse a elementos del ADN que responden a la vitamina D (*Vitamin D Response Elements* – VDRE)

Estructura del gen del receptor de la vitamina D₃

El gen del receptor de la vitamina D₃ se encuentra en el cromosoma 12, en la posición 12q13.11 en el humano (Dempfle et al. 2006) y en el gen 15, en la posición 15 qF1 en el ratón (Ilustración 2).

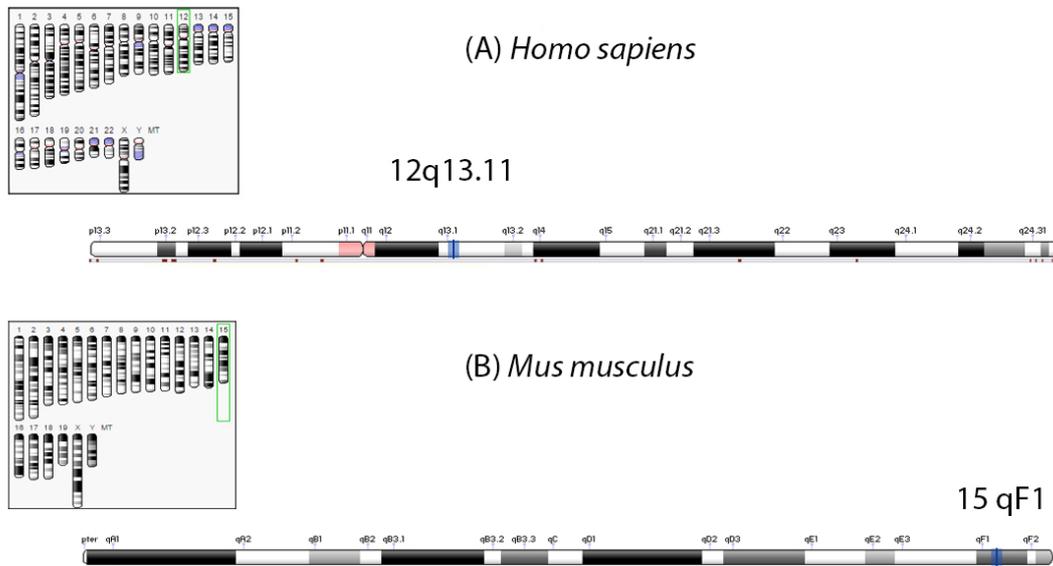


Ilustración 2: Esquema de la localización del gen del VDR en *Homo sapiens* (A) y en *Mus musculus* (B) (Modificado de ²⁻³)

Abarca 75 kilobases (kb), incluyendo seis exones (Ia al If) que codifican la región 5' que no se traduce, de *splicing* alternativo, ocho exones codificadores de proteína (II al IX) y dos regiones promotoras (Ilustración 3) (Nejentsev et al. 2004; Miyamoto et al. 1997). Los exones II y III codifican el dominio de unión al ADN y los exones IV al IX codifican la región de unión al ligando (Zmuda, Cauley y Ferrell 2000).

Se han identificado polimorfismos de nucleótido único (*simple nucleotide polymorphisms* - SNPs) en el gen del VDR: *FokI* (rs2228570), *BsmI* (rs1544410), *Tru9I* (rs757343), *Apal* (rs7975232) y *TaqI* (rs731236), entre otros, que provocan una variación de la expresión de VDR, y en consecuencia podrían afectar la transcripción de los genes *target* del receptor y las funciones del mismo (Glass et al. 2009; Yamshchikov et al. 2009). Hay una gran variación en las frecuencias alélicas de los genotipos formados por estos polimorfismos entre los grupos con diferente ancestría (Hannan et al. 2008)

²[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/?context=gene&acc=GCF_000001405.33&q=7421\[geneid\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/?context=gene&acc=GCF_000001405.33&q=7421[geneid])

³[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/?context=gene&acc=GCF_000001635.24&q=22337\[geneid\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/?context=gene&acc=GCF_000001635.24&q=22337[geneid])

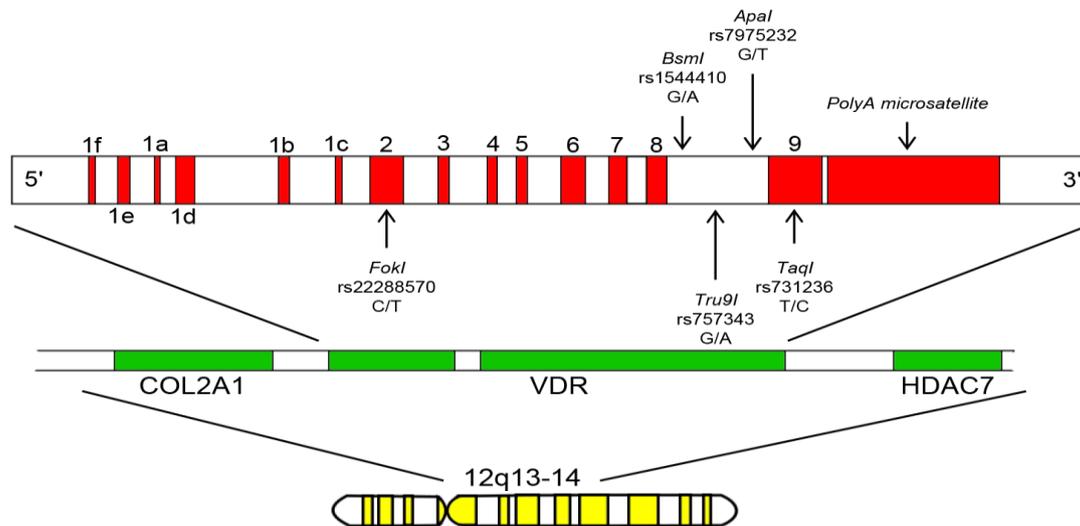


Ilustración 3: Esquema del gen del receptor de la vitamina D y sus polimorfismos más comunes (Bai et al. 2009).

Distribución de SNPs en el VDR

En el VDR se reconocen como bloques de desequilibrio de ligamiento (DL) a regiones cromosómicas en las cuales la frecuencia de recombinación cromosómica es nula o despreciable. Los genes, o polimorfismos, ubicados en tales regiones presentan una desviación en las frecuencias esperadas por herencia mendeliana debido a que se heredan como un bloque. Sin embargo, el alto grado de DL entre los polimorfismos dentro de un bloque, no se relaciona con el grado de DL entre los polimorfismos ubicados en dos bloques diferentes (Wigginton, Cutler y Abecasis 2005).

En el gen de VDR, se encontraron varios bloques de DL, pero que varían en las diferentes poblaciones (Fang et al. 2005). En europeos se identificaron 5 bloques con alto DL (Ilustración 4 - B) de 2-17 kb. El SNP *FokI* no está en DL con ninguno de los otros SNP y no puede ser asignado a ninguno de los bloques. El mapa de DL de asiáticos es similar al de los europeos, pero presenta solo 4 bloques. Para los asiáticos hay un gran bloque de DL en la región promotora (1e-1b), el cual corresponde a la combinación de los bloques 2 y 3 en europeos. El mapa de DL para los africanos es más fragmentado y es substancialmente

diferente al de europeos y asiáticos, tiene 8 pequeños bloques y *FokI* también es independiente de cualquier bloque de DL. La mayor cantidad de bloques de DL de menor tamaño en los africanos y sus descendientes, y la mayor variabilidad que esto conlleva, está en concordancia con la teoría del origen de la especie *Homo sapiens* ubicado en África y la posterior colonización del resto de los continentes (Harcourt 2016; Stringer 2016) (Ilustración 4-A).

Debido a la similitudes de algunos bloques de DL, o regiones comunes de DL en los europeos, asiáticos y africanos, se puede sugerir que este desequilibrio de ligamiento apareció antes de la divergencia de los grupos (Gong et al. 2006). Estos polimorfismos producen diferencias en regiones no codificantes o sinónimas y por lo tanto no cambian la estructura de la proteína, aunque provocarían variaciones en la expresión y/o función (Kariuki et al. 2016).

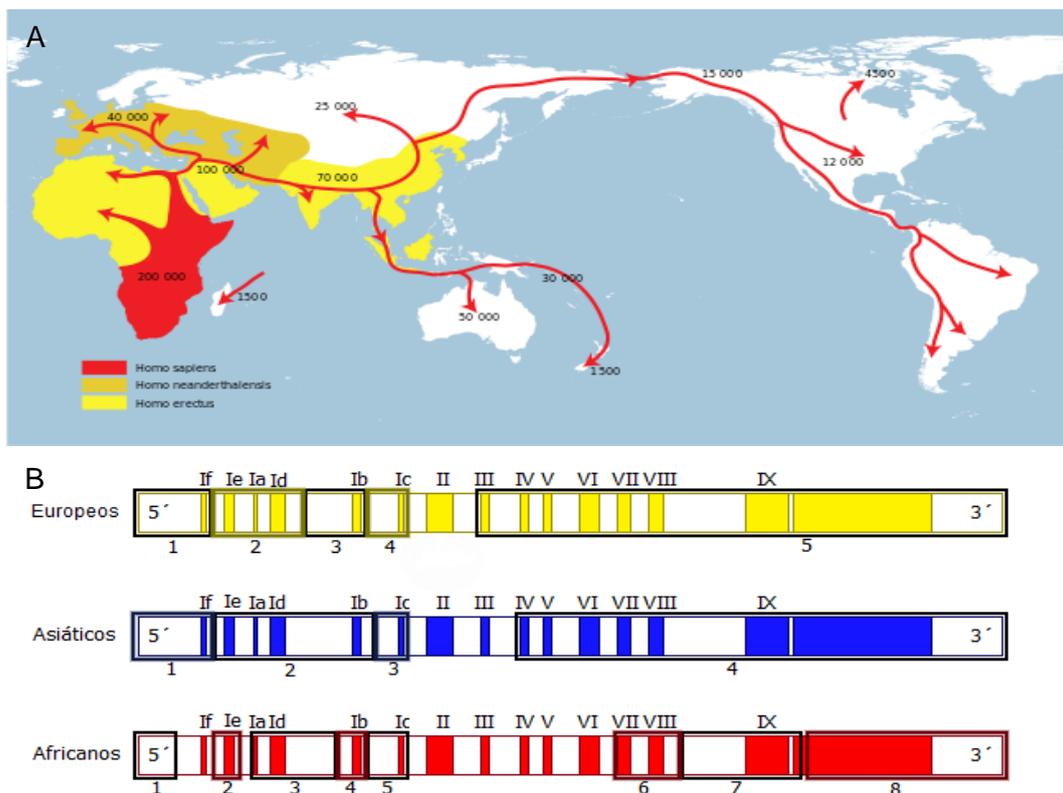


Ilustración 4: A. Mapa del origen y la colonización del mundo por *Homo sapiens*. **B.** Bloques de DL en las distintas poblaciones [modificado de (Fang et al. 2005)].

Estructura molecular del receptor de la vitamina D

En la literatura se describe que el 1,25D interactúa con dos receptores distintos dentro de la célula: el receptor clásico VDR (que se asociaría únicamente a las acciones genómicas) y Pdia3 (*Protein disulfide isomerase, family A, member 3*) asociado a la membrana plasmática, que participaría en las acciones rápidas, (Nemere et al. 2004; Doroudi et al. 2014; Doroudi, Schwartz y Boyan 2015). Sin embargo, está reportado en ratones *knockout* y en personas con mutaciones que provocan la pérdida de función en el VDR, que se necesita del VDR funcional para poder llevar a cabo las acciones rápidas atribuidas al 1,25D (Nguyen et al. 2004; Zanello y Norman 2004), y hay disponible un único reporte de osteoblastos de un ratón VDR^{-/-}, en el cual el 1,25D estimuló los canales de calcio y la proteína quinasa C (PKC) (Wali et al. 2003). Por otra parte, se considera que el VDR es la única proteína capaz de unirse al 1,25D a concentraciones nanomolares (Hausler et al. 1997; Carlberg y Campbell 2013).

El VDR pertenece a la superfamilia de receptores nucleares con alta homología estructural y de unión al ligando a lo largo de varias especies. Este receptor tiene la misma estructura modular que los demás miembros de la superfamilia de receptores nucleares, incluyen un dominio conservado de unión al ADN, una región flexible en bisagra, un bolsillo de unión al ligando conservado y un dominio de activación transcripcional dependiente del ligando, AF2 (Campbell et al. 2010).

Mizwicki observó mediante un modelado molecular del VDR la presencia de dos bolsillos de unión al ligando (ya sea la hormona natural o sus análogos sintéticos), una forma 6-s-trans específica para las acciones genómicas y una forma 6-s-cis, el otro para las acciones rápidas, no clásicas (Mizwicki et al. 2004, 2010) (Ilustración 5).

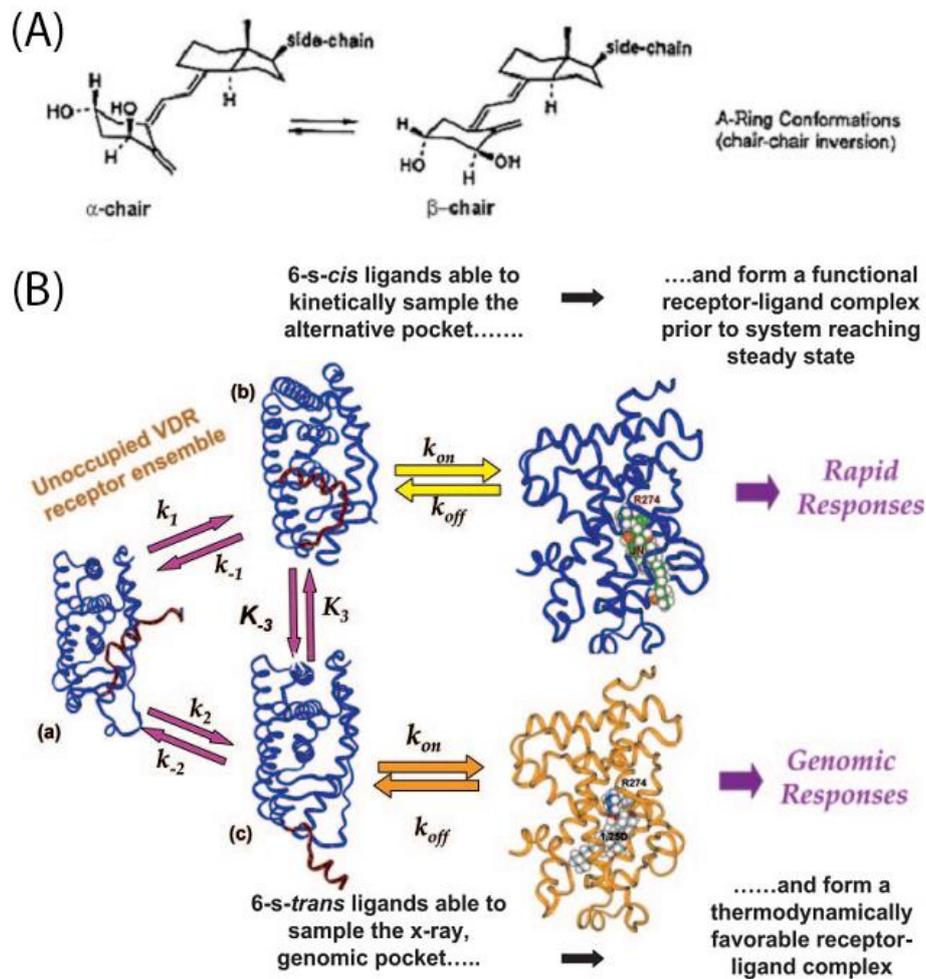


Ilustración 5: A. Libertad rotacional del 1,25D de la unión simple carbono-carbono 6-7 con el anillo que permiten conformaciones que van desde la conformación 6-s-trans abierta y extendida, que el VDR usa para las respuestas genómicas, a una forma más parecida al esteroide 6-s-cis que se cree que el VDR utiliza para las acciones rápidas, no genómicas. B. Modelo esquemático del receptor que describe cómo el VDR podría acomodar ligandos de diferentes formas para iniciar respuestas rápidas o genómicas (Norman 2006).

Acciones del 1,25D

El rol más conocido del 1,25D es en la homeostasis del calcio y fosfato para el mantenimiento del hueso (Ceglia y Harris 2013), sin embargo también tiene acciones tanto genómicas como no genómicas en otros tejidos como en el músculo esquelético (ampliamente estudiado en nuestro laboratorio), en el sistema inmune, en diferentes tipos de cáncer, en el desarrollo embrionario, etc. La característica pleiotrópica de las acciones

del 1,25D, podría deberse a que virtualmente todos los tejidos expresarían el VDR (Rosen et al. 2012).

Homeostasis del calcio y fosfato

La acción de la vitamina D mejor caracterizada se observa en un tipo de células óseas, los osteoblastos, y es la estimulación de la osteoclastogénesis y la resorción ósea (Suda et al. 1995), mediante el mantenimiento de la homeostasis del calcio y fósforo plasmático.

El hueso membranoso se desarrolla a partir de una célula osteoprogenitora que se diferencia a osteoblasto, el cual deposita luego cristales de fosfato de calcio en la matriz para producir tejido óseo (Bronner, Farach-Carson y Farach-Carson 2003). En los osteoblastos, el 1,25D activa al VDR y aumenta la expresión del ligando del receptor activador de factor nuclear kappa (*receptor activator nuclear kappa ligand* - RANKL). RANKL se une al receptor activador nuclear kappa (*receptor activator nuclear kappa* - RANK) expresado en la superficie de las células progenitoras de osteoclastos y estimula la osteoclastogénesis y la resorción ósea (Turner, Anderson y Morris 2012). Toda esta vía depende del VDR (Takeda et al. 1999). La formación de hueso endocondral se inicia por la diferenciación de células madres mesenquimales en condroblastos que producen una matriz de colágeno del tipo II rica en proteoglicanos. Estas células continúan diferenciándose en condrocitos hipertróficos que dejan de sintetizar colágeno del tipo II y comienzan a producir colágeno del tipo X. Por otra parte, inician la degradación y calcificación de la matriz mediante la secreción de vesículas llenas de enzimas degradativas como metaloproteinasas, fosfolipasas y la fosfatasa alcalina. Los condrocitos hipertróficos también comienzan a producir los marcadores de osteoblastos como la osteocalcina, osteopontina y el colágeno del tipo I resultando en la deposición inicial del osteoide. La diferenciación terminal de los condrocitos hipertróficos y la posterior calcificación de la matriz están notablemente afectadas en casos de deficiencia de vitamina D, ya que ésta conduce al abocardado de los extremos de los huesos largos y formación de un rosario

costal a lo largo de las uniones costocondrales de las costillas, características clásicas de raquitismo (Bikle 2012). Aunque la suplementación con cantidades adecuadas de calcio y fosfato podrían corregir la mayoría de estos defectos en la diferenciación terminal y calcificación, los metabolitos de la vitamina D, el 1,25D y el 24,25D, han demostrado ejercer distintos roles en el proceso de la formación de hueso endocondral (Bikle 2012).

La deficiencia nutricional de la vitamina D, la responsividad alterada a la vitamina D₃ dada por mutaciones en el VDR y la inadecuada producción de 1,25D como consecuencia de mutaciones en CYP27B1 tienen como fenotipo principal al raquitismo. Esto indica que la vitamina D y en particular el 1,25D son de vital importancia para el hueso. Además, tanto el VDR como el CYP27B1 se expresan en las células óseas (Boivin et al. 1987; Anderson et al. 2005; Masuyama et al. 2006; van Driel et al. 2006; Naja et al. 2009; Kogawa, Masakazu et al. 2010; Kogawa, M et al. 2010).

Un factor de complicación extra en la determinación del rol de los metabolitos de la vitamina D en el hueso es la multitud de efectos que éstos tienen en los mecanismos homeostáticos del calcio, los cuales impactan en el hueso. La falta de vitamina D resulta en hipocalcemia e hipofosfatemia, suficiente para causar raquitismo. Además los metabolitos de la vitamina D pueden alterar la responsividad del hueso a la hormona de crecimiento (Morales et al. 2002), y la expresión y/o secreción un gran número de factores como el factor de crecimiento del tipo insulina 1 (*insulin-like growth factor-1*; IGF-1) (Chenu et al. 1990), su receptor (Kurose et al. 1990) y proteínas de unión (Scharla et al. 1991; Moriwake et al. 1992); factor de crecimiento transformante - β (*Transforming Growth Factor- β* ; TGF- β) (Sato, Ono y Tuan 1993), factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*; VEGF) (Wang et al. 1996), interleucina-1 (IL-1) (Lacey, Grosso, et al. 1993), IL-4 (Lacey, Erdmann, et al. 1993) y receptores endoteliales (Nambi et al. 1995), todos los cuales pueden tener efectos en la modulación de las acciones de los metabolitos de la vitamina D en el hueso.

El 1,25D no solo regula la homeostasis del calcio a través de la resorción y movilización desde el esqueleto, sino que además regula su absorción desde el intestino y su excreción vía los riñones (Hansen et al. 2001). Hay evidencia sustancial que demuestra que uno de los mecanismos por el cual el 1,25D ejerce su acción en el intestino y los riñones es interfiriendo con proteínas específicas de unión al calcio con alta afinidad, las calbindinas, que facilitan y regulan el transporte de calcio transcelular (Saito y Harada 2014; Pulskens et al. 2015; Wongdee y Charoenphandhu 2015).

Acciones clásicas GENOMICAS

El VDR es considerado un factor de transcripción que se une al ADN y es específicamente activado por concentraciones nanomolares de pequeñas moléculas lipofílicas de tamaño y peso similar al del colesterol (Molnár, Peräkylä y Carlberg 2006).

Como se observa en otros factores de transcripción, el dominio de unión al ADN (*DNA Binding Domain* - DBD) del VDR puede unirse con seis nucleótidos en el surco mayor del ADN genómico, por lo que los VDRE son, por tanto, secuencias hexaméricas que tienen como secuencia consenso RGKTS_A (R = A/G; K = G/T; S = C/G), conocidas como elemento de respuesta (*Response Element*, RE) (Carlberg y Campbell 2013). Sin embargo, la afinidad de unión del VDR monomérico al ADN no es suficiente para la formación de un complejo estable y por lo tanto necesita unirse a otras proteínas previamente a la unión al ADN. La principal proteína a la que se une es el receptor del ácido retinoico (*Retinoic-X Receptor* – RXR), aunque no siempre está presente (Meyer, Goetsch y Pike 2012). Un arreglo de repetición directa y asimétrica de dos RE separados por 3 nucleótidos, proporciona una interfaz eficiente de los DBD del VDR y del RXR, en consonancia con la “regla 3-4-5” propuesta por Umesono (Umesono et al. 1991). Sin embargo, son necesarias otras proteínas, denominadas correguladores que permiten la unión y la consecuente formación del complejo necesario para la transcripción, el cual incluye a la ácido ribonucleico (ARN) polimerasa II. Los correguladores pueden ser definidos como coactivadores (coAs) o correpresores (coRs), dependiendo de su efecto en la transcripción

de los genes. Los coAs estabilizan la maquinaria transcripcional en un proceso denominado transactivación, caracterizados por tener actividad histona acetil transferasa (HAT) o alguna otra función enzimática que altere la estructura de la cromatina o esté involucrada en la maduración del ARN mensajero (ARNm). Por otra parte, los coRs reducen la actividad transcripcional asociada al receptor nuclear por medio de la disrupción de la unión del complejo transcripcional con el ADN, por reclusión de las histonas desacetilasas para inducir una estructura cromatínica más apretada o el secuestro de algún otro factor involucrado en el complejo transcripcional (Carlberg y Campbell 2013; Teske, Yu y Arnold 2016)

Unos pocos estudios se realizaron en células de diferentes tejidos humanos, mediante la técnica de secuenciación por inmunoprecipitación de la cromatina (*Chromatin Immunoprecipitation with sequencing*; ChIP-seq), que permite analizar la interacción de proteínas con el ADN. Basados en estudios *in silico* habría entre 10^5 y 10^6 sitios con motivos VDRE (Meyer, Goetsch y Pike 2012), sin embargo mediante la técnica ChIP-seq, en general se vio que son menos de 1000 son los que generalmente ocupa el VDR en ausencia del 1,25D, y aumentan de 2000 a 8000 sitios luego del tratamiento con la hormona (Pike y Meyer 2014): en linfoblastoides con 36 horas de tratamiento se vieron 2776 sitios de unión, con cambios significativos en la expresión de 229 (Ramagopalan et al. 2010); en células de tumor colorectal (de la línea celular LS180) encontraron 1674 sitios con motivos VDRE, de los cuales 638 estaban ubicados en regiones que se transcriben (Meyer, Goetsch y Pike 2012); en células de leucemia monocítica humana (de la línea celular THP-1) 2340 sitios con secuencia VDRE, de los cuales 1171 son ocupados únicamente con tratamiento con 1,25D, 520 sitios son ocupados únicamente sin tratamiento y 649 son ocupados con o sin tratamiento (Heikkinen et al. 2011). A pesar de las diferencias entre estos trabajos, el 20% de los sitios encontrados son comunes en los tres estudios. Pese a estos estudios, se ha comprobado que aún en ausencia de las secuencias consenso y la regla 3-4-5 de Umesono, el VDR también es capaz de unirse al ADN de una forma más laxa y flexible,

probablemente mediante la unión a otros factores de transcripción y así promover la transcripción de genes que no contienen la secuencia hexamérica (Carlberg y Campbell 2013). De esta forma, el 1,25D puede regular el transcriptoma tanto de ARNm como de micro ARNs (miRs) (Wang et al. 2011; Giangreco et al. 2013; Wang y Tenniswood 2014; Craig et al. 2014; Kariuki et al. 2016)

Acciones NO GENOMICAS – Efectos rápidos

El 1,25D ejerce acciones no genómicas, muy rápidas, que suceden en cuestión de segundos y hasta unos pocos minutos u horas. Incluyen la activación de moléculas de señalización, como la fosfolipasa C (*Phospholipase C* - PLC), la fosfolipasa A2 (*Phospholipase A2* - PLA2), la quinasa del fosfatidilinositol-3 (*Phosphatidylinositol-3-kinase* - PI3K), p21^{Ras}, la generación de segundos mensajeros rápidos como Ca²⁺, adenosín monofosfato cíclico (AMPc), ácidos grasos y fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato, acompañados por la activación de proteínas quinasas, tales como la proteína quinasa A y C (PKA y PKC), proteína tirosina quinasa citosólica no receptora (Src), proteínas quinasas activadas por mitógeno (*Mitogen Activated Protein Kinase* - MAPK) y la proteína quinasa dependiente de Ca²⁺-calmodulina II (*Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II* – CaMKII). Las acciones no genómicas también incluyen la apertura de los canales de Ca²⁺ y Cl⁻.

Aunque es muy aceptado que el 1,25D dispara acciones rápidas al llegar a la célula, es muy controversial, aún, la identidad del receptor a través del cual ejerce estas acciones. Boyan junto a sus colaboradores, afirman que existe un receptor de la vitamina D específico para la señalización rápida, que es distinto al receptor clásico nuclear (Boyan et al. 2003). Este receptor ha recibido diferentes nombres: proteína similar a la tiorredoxina o proteína para la respuesta de glucosa, 58 kDa (*Glucose Respond Protein 58* - GRP58), la proteína del retículo endoplasmático 57 / 60 kDa (*Endoplasmatic Reticulum protein 57 / 60* - ERp57 o ERp60) y la Pdia3 (Hii y Ferrante 2016). En contraposición, está demostrado que, como se mencionó anteriormente, el mismo receptor clásico VDR es capaz de disparar tanto acciones genómicas como rápidas, y esto depende de la rotación de la molécula

1,25D y del bolsillo que éste ocupe en el VDR (Molnár, Peräkylä y Carlberg 2006; Carlberg y Campbell 2013; Norman 2006). Según los autores, esta evidencia no implica que no exista un receptor diferente capaz de unir al 1,25D e iniciar las acciones rápidas atribuidas. Sin embargo, tanto los autores que afirman que el Pdia3 es el responsable de las acciones rápidas asociadas al 1,25D, como aquellos que aseguran que es el VDR clásico el que une al 1,25D para iniciar estas acciones, ubican al receptor en las caveolas, con la necesaria participación de la proteína caveolina 1 (cav-1) (Buitrago y Boland 2010; Doroudi et al. 2014; Doroudi, Schwartz y Boyan 2015; Dirks-Naylor y Lennon-Edwards 2011).

Entonces, el modo de acción del 1,25D para disparar las acciones rápidas sería de dos maneras. La primera involucraría la unión del 1,25D al Pdia3 que se encuentra en las caveolas, en la cara externa de estas invaginaciones de la membrana plasmática y asociado a cav-1, provocando la unión a la proteína activadora de la PLA2 (*PLA2 activator protein* – PLAA) a CaMKII, que activa a PLC también ubicado en la membrana y que a su vez activaría dos vías: la del fosfatidilinositol-3 (*Phosphatidylinositol-3* - PI3) que provoca finalmente una liberación de Ca^{2+} del retículo endoplasmático y la vía de la PKC que puede activar a la quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (*Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2* - ERK 1/2), que finalmente provoca la formación de hueso y la mineralización o a la PKC puede fosforilar otras proteínas que culminarían con una inducción a la síntesis de ADN como con una inhibición de la apoptosis (Ilustración 6) (Doroudi, Schwartz y Boyan 2015).

La otra vía por la cual el 1,25D iniciaría las acciones rápidas involucra que el 1,25D ingrese a la célula y que se una al VDR clásico, que se encuentra en inmediaciones de la membrana plasmática unido a cav-1 y a Src, luego, esta última se activaría induciendo la activación de la vía de las MAPKs (Buitrago y Boland 2010)

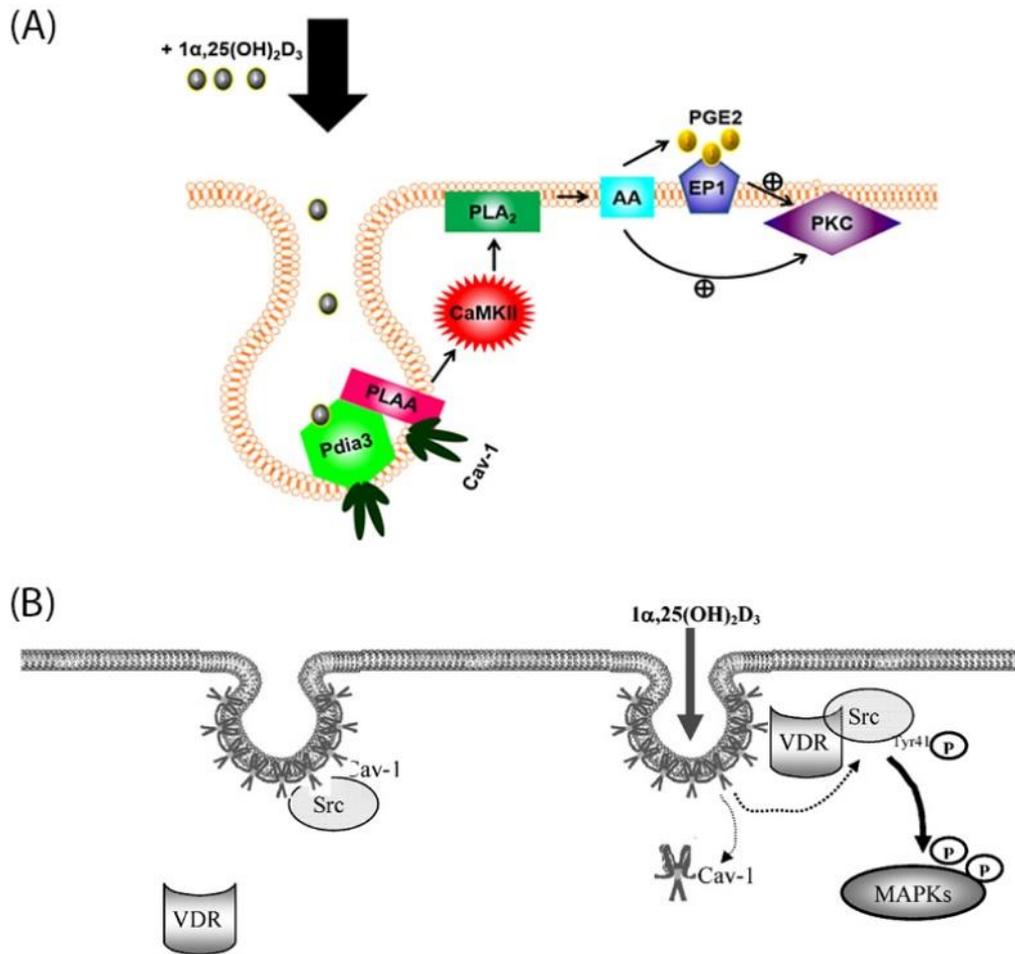


Ilustración 6. Síntesis de la señalización rápida disparada por el 1,25D, (A) a través del receptor Pdia3 (Doroudi, Schwartz y Boyan 2015) o (B) a través del VDR clásico (Buitrago y Boland 2010).

El Músculo Esquelético

La movilidad se define como la capacidad de moverse de forma espontánea e independiente. En los mamíferos, entre los cuales se encuentra el ser humano, los movimientos son controlados por el sistema esquelético asociado al sistema muscular. Y este último, consiste en los músculos esqueléticos o estriados, que pueden ser contraídos voluntariamente (Altan et al. 2016). El músculo esquelético comprende el 38,4 % del peso corporal de los hombres y el 30,6 % del peso corporal total de mujeres (Janssen et al. 2000), y tiene la capacidad de regenerarse como respuesta a pequeños desgarros que se producen durante el ejercicio o actividad diaria, debido a la presencia de células madre del músculo llamadas mioblastos satélites, que ante una lesión se activan, proliferan y se fusionan para formar nuevas fibras musculares y reparar el tejido dañado (Shadrin, Khodabukus y Bursac 2016).

Histología

Los músculos esqueléticos junto con los músculos cardíacos están compuestos por músculo estriado que forman fibras musculares paralelas. El tejido muscular estriado consiste en los miocitos acomodados en largas y delgadas fibras que presentan un patrón regular de líneas transversales finas rojas y blancas, lo que le da al músculo su apariencia distintiva y el nombre. Hay dos tipos de fibras musculares (las rápidas y las lentas) que dependen del tipo de miosina que esté presente. Estos dos tipos de fibras no pueden ser distinguidas con una tinción de Hematoxilina & Eosina.

El tipo principal de células son los miocitos, que se han fusionado durante el desarrollo para formar largas células multinucleadas. Estas células son ricas en mitocondrias y proteínas de actina y miosina acomodadas en una unidad repetida llamada sarcómero. Histológicamente, este arreglo altamente estructurado de los sarcómeros aparece como bandas oscuras (bandas A) y claras (bandas I), que son muy claras en las micrografías (Ilustración 7 - A). Además de las fibras musculares, se encuentran en los

espacios intersticiales las células satélites y tejido conectivo y adiposo (Ilustración 7 - B). El tejido muscular está altamente vascularizado con una fina red de capilares que se extiende entre las fibras.

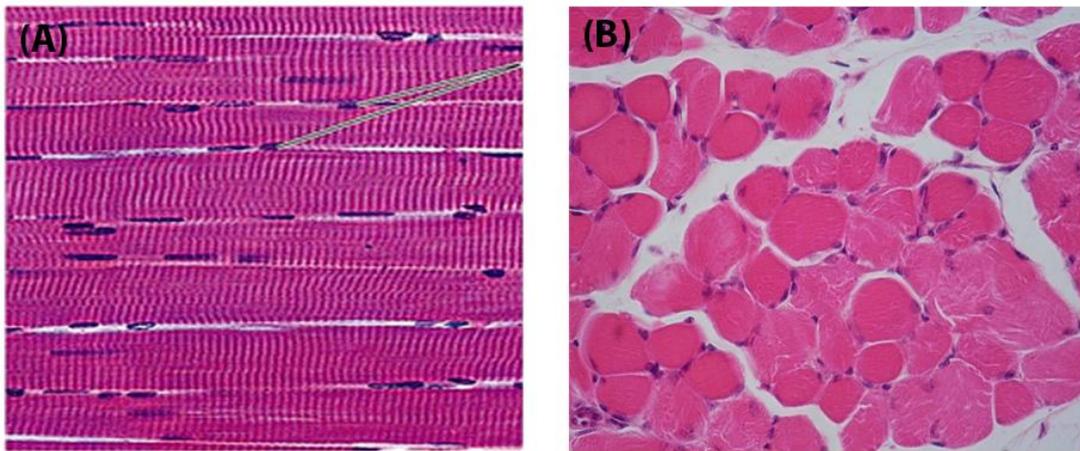


Ilustración 7. Histología del músculo esquelético. (A) Corte longitudinal⁴. (B) Corte transversal⁵.

Origen y desarrollo

El sistema musculoesquelético se origina del mesodermo en los amniotes. En un embrión de etapa neurular, el mesodermo se subdivide en cuatro regiones: el mesodermo de la corda, el paraxial, el intermedio y el de la placa lateral. El mesodermo de la corda da lugar a la notocorda, que está implicada en la formación del tubo neural y en el establecimiento del eje anterior - posterior. El mesodermo paraxial, o mesodermo pre-somítico, flanquea ambos lados del tubo neural como gruesas bandas de células mesodérmicas. Éste forma el mesodermo craneal de la región craneal y las somitas por segmentación en la región del tronco. El mesodermo craneal es la fuente del esqueleto, los músculos esqueléticos y el tejido conectivo de la cara y el cráneo. La formación de somitas por segmentación progresa a lo largo del eje anterior - posterior del embrión.

⁴ https://www.flickr.com/photos/eye_smile/8017685238

⁵ https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Striated_muscle#/media/File:Muscular_estriado_transv_400X.JPG

Las somitas son inicialmente esferas compuestas de una pared celular epitelial y un núcleo de células mesenquimales. Luego se divide en esclerotoma, formado por células mesenquimales en la región ventral, y dermomiótoma que retiene las estructuras epiteliales en la región dorsal. El esclerotoma genera cartílagos vertebrales que se diferencian en huesos, tendones del tronco y las articulaciones vertebrales. El dermomiótomo genera todos los músculos esqueléticos del tronco y los miembros. Además de la formación de músculo esquelético, la parte central del dermomiótomo, denominado tradicionalmente dermatoma, produce dermis dorsal y la grasa marrón (Endo 2015).

Durante el desarrollo embrionario, las células del miótomo, se diferencian a mioblastos y migran a la zona donde se desarrollarán los miembros superiores e inferiores, esbozos de los miembros inferiores y superiores. Una vez que llegan a su sitio, se denominan los mioblastos. Una parte de estas células se diferencian a miotubos y otra se mantiene en estado de mioblasto proliferativo, formando las células satélites del adulto que servirán de reservorio para reparar injurias producidas en el músculo maduro (Endo 2015).

Células satélites

Las células satélites son células madres de músculo esquelético que tienen un importante rol en el crecimiento y regeneración del músculo postnatal (Mauro 1961). En el músculo esquelético adulto intacto, las células satélites están quiescentes, arrestadas en la fase G0, expresando el factor miogénico 5 (*Myogenic Factor 5 - MyF5*) y la proteína de determinación de mioblasto (*Myoblast Determination - MyoD*), lo que sugiere que son células madres comprometidas al linaje muscular (Beauchamp et al. 2000). Una vez que se activan, dado una injuria o degeneración del músculo, las células satélites migran hacia el lugar, proliferan, se diferencian a miotubos y maduran (Endo 2015).

Masa muscular: salud y enfermedad

El músculo se adapta a las demandas que se le imponen, por ejemplo el entrenamiento de resistencia otorga una mayor actividad contráctil o el entrenamiento de

fuerza genera un aumento de la capacidad de carga (Argilés et al. 2016). Se ha demostrado un aumento del 10 al 30 % de la sección transversal de las fibras musculares después de 10 - 12 semanas de entrenamiento de sujetos sedentarios, alcanzando el 80 % en atletas con largos períodos de entrenamiento. Por otro lado, el desuso del músculo o ciertos procesos patológicos pueden llevar a una pérdida de masa severa (Favier, Benoit y Freyssenet 2008). Cuando una persona tiene una enfermedad crítica se produce pérdida de masa muscular que no es debida únicamente al confinamiento de la persona a estar en una cama, y esta pérdida es mayor cuando la persona enferma sufre una falla multiorgánica, por lo que es indispensable una intervención para evitar esta pérdida o prevenirla (Puthuchearry et al. 2013).

La masa muscular provee al individuo la fuerza, movilidad y balance (Wolfe 2006), además, tiene un papel importante en el metabolismo proteico corporal e impacta en la vida de los pacientes con enfermedades crónicas (McCarthy y Esser 2010). La palabra sarcopenia se refiere a la pérdida de masa muscular relacionada a la edad, que tienen como complicación extra (además de la pérdida de fuerza, movilidad y balance asociada a la masa muscular) la pérdida del importante reservorio de aminoácidos y moléculas efectoras (como mioquinas y citoquinas) que participan en la lucha contra las enfermedades e infecciones (Argilés et al. 2016). La relación entre la sarcopenia y el desequilibrio energético que se produce fue llamada “síndrome de fragilidad” por Walston y Fried, quienes también describieron que esta fragilidad es diferente en los dos sexos, teniendo el doble de impacto en las mujeres mayores que en hombres de la misma edad (Walston y Fried 1999). Este síndrome deja a la persona débil y con predisposición a caídas y fracturas lo que aumenta la morbilidad y mortalidad (Walston y Fried 1999; Cerri et al. 2015), disminuye la calidad de vida y aumenta los gastos médicos y hospitalarios. Por lo tanto es importante conocer los mecanismos que influyen en dicho síndrome y desarrollar terapias o tratamientos para revertirlo o evitarlo.

Rhabdomyosarcoma

El rhabdomyosarcoma (RMS) es considerado un cáncer relativamente raro, pero entre los niños y jóvenes adultos, es el sarcoma de tejido blando más común. Su origen podría estar en los mioblastos, en células satélites o en los miocitos desdiferenciados (Saab, Spunt y Skapek 2011), pero siempre en células del linaje de músculo esquelético, dado su fenotipo.

Origen y clasificación

El RMS como sarcoma con características de músculo esquelético fue observado por primera vez en 1854 (Weber y Virchow 1854) y casi un siglo más tarde se realizó una descripción más detallada basada en varios tumores (Stout 1946). Hoy en día, la clasificación de los RMS implica el origen y características histológicas de los tumores (Parham y Barr 2013). Sin embargo, todos los tumores tienen como característica común la expresión de Myf5 y MyoD lo cual indica que se trata de células que estaban comprometidas en el linaje muscular (Saab, Spunt y Skapek 2011).

Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS), clasifica a los RMS en 4 subtipos según la histología: esclerosante, embrionario, alveolar y pleomórfico (Rudzinski et al. 2015).

1- RMS de célula fusiforme o esclerosante

Este subtipo de RMS tiene el mejor pronóstico (Rudzinski et al. 2015), se considera una variante de RMS embrionario pero que presenta células fusiformes. Las características distintivas de esta variante es su composición casi exclusiva de células en forma de huso, los nucléolos en forma de cigarro y los núcleos prominentes. Incluye dos subconjuntos de tumores: pobre o rico en colágeno. En la forma pobre en colágeno, las células se disponen en haces o fascículos, separadas entre sí por poco o ningún estroma. En la forma rica en colágeno, hay menos células y abundantes fibras de colágeno fino que las separan unas de

otras (Newton et al. 1995). Este tipo de RMS embrionario puede ser fácilmente identificado y se encuentra frecuentemente en sitios paratesticulares (Leuschner et al. 1993).

2- RMS embrionario.

Es un RMS de riesgo intermedio (Rudzinski et al. 2015). Se trata de un sarcoma de tejido blando primitivo maligno que recapitula las características fenotípicas y biológicas del músculo esquelético embrionario. El término rbdomiosarcoma embrionario abarca las células fusiformes, botrioides y variantes anaplásicas. Aunque los rbdomiosarcomas embrionarios contienen células que son histológicamente idénticas al músculo estriado en desarrollo, menos del 9% aparecen dentro de la musculatura esquelética de las extremidades. La mayor proporción ocurre en la cabeza y el cuello (aproximadamente el 47 %), seguida por el sistema genitourinario (aproximadamente 28 %), que incluyen la vejiga urinaria, la próstata y los tejidos blandos paratesticulares (Fletcher et al. 2002).

3- RMS Alveolar

El rbdomiosarcoma alveolar es una neoplasia primaria, maligna, de células redondas que se asemeja citológicamente al linfoma y que muestra una diferenciación parcial del músculo esquelético. Es el subtipo de RMS con peor prognosis (Rudzinski et al. 2015), que suele surgir en las extremidades (aproximadamente 39 %), aunque hay un reporte que indica que no existe ningún sitio de origen favorecido (Fletcher et al. 2002). Otros sitios donde puede originarse son las regiones paraespinal y perineal, y los senos paranasales. También, pueden aparecer tumores mixtos embrionarios y alveolares en áreas favorecidas por rbdomiosarcomas embrionarios, como el tracto urogenital y la órbita, pero generalmente estos son sitios de origen inusuales (Fletcher et al. 2002).

4. RMS Pleomórfico

El RMS pleomórfico es un sarcoma de alto grado que se presenta casi exclusivamente en adultos y consiste en células poligonales, redondas y fusiformes que

muestran evidencia de diferenciación de los músculos esqueléticos, en el que no se debe identificar ningún componente embrionario o alveolar. Estos tumores usualmente ocurren en los tejidos blandos profundos de las extremidades inferiores pero han sido reportados en una amplia variedad de otros lugares (Fletcher et al. 2002).

Epidemiología: incidencia, prognosis y mortalidad.

Según las sociedades de cáncer americana, canadiense y británica, los rbdomiosarcomas son los sarcomas de tejido blando más comunes, considerando que representan el 3 % de los todos los tumores en la niñez y adolescencia ^{6 - 7 - 8}.

El RMS es el tumor de tejido blando más común en los niños de 0 a 14 años. Sin embargo son considerados raros, ya que representan solo entre el 3 y 4 % de todos los cánceres pediátricos. Se diagnostican alrededor de 350 casos nuevos en Estados Unidos todos los años y la incidencia anual en los niños, adolescentes y adultos jóvenes es de 4,6 casos por millón, número que se ha mantenido en los por los últimos 30 años (Ries et al. 2008). Se sabe que hay síndromes hereditarios que aumentan el riesgo de padecer RMS, específicamente el síndrome de Li-Fraumeni, el blastoma pleuropulmonar, la neurofibromatosis del tipo 1, el síndrome de Costello, de Beckwith-Wiedemann y de Noonan. Por otra parte, los niños que nacen con mayor peso o altura que la esperada, también presentan un riesgo aumentado de RMS embrionario. Sin embargo, la causa del RMS en la mayoría de los casos es desconocida⁹.

Dos tercios de los casos son diagnosticados en niños menores de 6 años, y hay una pequeña predominancia de los varones. La incidencia en los pacientes afroamericanos

⁶<http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/childrens-cancers/incidence#heading-Seven> (2016/12/20)

⁷<http://www.cancer.org/cancer/rhabdomyosarcoma/detailedguide/rhabdomyosarcoma-key-statistics> (2016/12/20)

⁸<http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/rhabdomyosarcoma/rhabdomyosarcoma/?region=on> (2016/12/20)

⁹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032842/> (2016/12/28)

es más alta que en caucásicos (Tabla 1). La incidencia en los pacientes asiáticos es aparentemente menor que en los caucásicos (Howlader et al. 2016).

Tabla 1. Incidencia por edad, sexo y etnia.

Edad	0 – 14	15 – 39	40 +
Todas las etnias	0,6 : 0,4	0,2 : 0,1	0,2 : 0,2
Caucásicos	0,6 : 0,5	0,2 : 0,1	0,2 : 0,1
Afroamericanos	0,7 : 0,3	0,2 : 0,2	0,2 : 0,3

Las tasas son cada 100.000 personas. La relación es varones : mujeres (Howlader et al. 2016).

Los RMS embrionarios constituyen el subtipo más común, y ocurre en 3 niños por millón menores de 15 años; sólo el 17 % de los RMS embrionarios se presentan en adolescentes. El 46 % de estos ocurre en niños menores de 5 años de edad; el 5 % de estos RMS afecta a los lactantes. El RMS embrionario también constituye una variante histológica importante en los adultos, aunque estos casos son raros. En los Estados Unidos, los RMS embrionarios muestran un ligero predominio masculino : femenino (Tabla 1). El 70 % de los RMS reportado en Estados Unidos se producen en blancos no hispanos, en comparación con el 14 % en los afroamericanos, el 10 % en los hispanos y el 4,5 % en los asiáticos (Fletcher et al. 2002), y las tasas de incidencia son más altas en los blancos. Las cifras de incidencia en Europa se parecen a las de los Estados Unidos, con una leve prevalencia en los varones, mientras que las tasas de incidencia aparecen algo más bajas en Asia oriental y meridional (Fletcher et al. 2002). El pronóstico se determina por estadio (evaluación clínica o quirúrgico-patológica), edad y lugar de origen. Los pacientes más jóvenes tienden a tener un pronóstico más favorable. Los RMS embrionarios con anaplasia difusa pueden tener un peor pronóstico que los otros subconjuntos de RMS embrionario. Los tumores para-meníngeos y de extremidades tienden a tener un mal pronóstico en comparación con otros lugares, mientras que los tumores orbitarios y paratesticulares tienden a tener uno mejor (Fletcher et al. 2002). En general este subtipo de RMS tiene una

tasa de supervivencia a 5 años del 60 % en niños y adolescentes (menores de 19 años) y del 34 % en adultos (mayores de 19 años) (Sultan et al. 2009).

Los RMS alveolares ocurren en todas las edades y con mayor frecuencia en adolescentes y adultos jóvenes; casos muy raros pueden ser congénitos (Fletcher et al. 2002). Ocurren con menor frecuencia que los RMS embrionarios (Sultan et al. 2009), la relación varón : mujer es aproximadamente igual y no se menciona ninguna predilección geográfica o racial. Los RMS alveolares son neoplasmas más agresivos que los RMS embrionarios. El pronóstico depende del estadio (si son tumores embrionarios/alveolares mixtos, suelen comportarse levemente mejor que el subtipo alveolar), del sitio y la edad. Los datos indican que las fusiones genéticas predicen el resultado, y que los tumores positivos para la proteína de caja pareada (*Paired box protein - PAX*) 7 / *Forkhead box protein O* (FOXO) 1 se comportan de manera más benigna que los PAX3 / FOXO1 positivos (Kelly et al. 1997). La tasas de supervivencia a 5 años son del 45 % en niños y adolescentes (menores de 19 años) y del 28 % en adultos (mayores de 19 años) (Sultan et al. 2009)

El RMS pleomórfico ocurre casi exclusivamente en adultos, son más comunes en los hombres y se presentan como media en la sexta década (Fletcher et al. 2002). Casos excepcionales se pueden ver en los niños, pero su existencia ha sido puesta en duda. El pronóstico para estos tumores es pobre y los factores pronósticos confiables todavía no se han desarrollado. En dos estudios con seguimiento, el 74 % de los pacientes murieron de la enfermedad (Furlong, Mentzel y Fanburg-Smith 2001; Gaffney, Dervan y Fletcher 1993), y según Sultan y colaboradores, la tasa de supervivencia a 5 años es del 25 % en adultos (mayores de 19 años) y del 48 % en niños y adolescentes (menores a 19 años) (Sultan et al. 2009) aunque no hay protocolos especialmente diseñados para el tratamiento de esta enfermedad en adulto, sino que se adapta el protocolo de tratamiento utilizado en niños (Kollár et al. 2016).

Tratamientos en la actualidad

Según la Sociedad Americana de Cáncer¹⁰, el tratamiento del RMS comienza una vez diagnosticado y evaluado el estado en el que se encuentra el tumor. Hay que tener en cuenta que dado las grandes diferencias que hay entre los diferentes tipos de RMS y los pronósticos de cada uno, es esencial que todos estos datos sean conocidos para diseñar el tratamiento, el cual normalmente lo diseña un grupo de médicos especializados en diferentes áreas: un cirujano ortopédico (que se especializa en músculos y huesos) con experiencia en el tratamiento de RMS, un médico oncólogo pediátrico, un oncólogo de radiación, un patólogo, un fisiatra (que dirige la rehabilitación y la terapia física después del tratamiento) y un psicólogo. Los tipos de tratamiento que se pueden usar para RMS incluyen cirugía (para biopsia o remoción del tumor), quimioterapia, radioterapia y hasta incluso alguna vez se realiza quimioterapia a altas dosis y trasplante de células madre.

Incluso cuando se declara la remisión, los pacientes experimentan morbilidad a largo plazo debido a una terapia multimodal intensiva, en particular los pacientes pediátricos que presentan un riesgo durante toda la vida de neoplasias secundarias asociadas al tratamiento. Los tratamientos para el RMS no han mejorado en las últimas tres décadas, lo que subraya la necesidad de dilucidar los mecanismos moleculares de la enfermedad (Kashi, Hatley y Galindo 2015).

¹⁰ <http://www.cancer.org/cancer/rhabdomyosarcoma/detailedguide/rhabdomyosarcoma-treating-general-info>

El ciclo celular

Las células de todos los organismos sufren división para proliferar. En los seres humanos, la división celular se repite cíclicamente a partir de un óvulo fecundado para crear un cuerpo adulto formado por aproximadamente sesenta billones de células. La división celular continúa a partir de entonces para reemplazar células viejas o perdidas y permitir la renovación y la regeneración. Las células pasan por una serie de etapas ordenadas que en su conjunto se denominan ciclo celular. Durante cada etapa, la célula cumple sus funciones y se prepara para la siguiente etapa, ya sea duplicando sus organelas, material genético o dividiéndose.

Fases

El ciclo celular tiene dos fases principales: la fase S, donde los cromosomas se replican y la mitosis, donde se dividen en dos, y en eucariotas superiores, que presentan un ciclo celular más complejo, estas fases a su vez están separadas por dos fases *gap* G1 y G2 (Ilustración 8) (Murray y Kirschner 1989; Morgan 1995). Cada una está caracterizada por eventos específicos y controles que permiten que solo la célula que esté sana y preparada pueda proseguir a la siguiente etapa del ciclo celular.

La fase G1 es un período en el que diversas señales metabólicas, de estrés y ambientales se integran e interpretan para influir en la división celular y el programa de desarrollo de una célula. Por otra parte, hay que tener en cuenta que en organismos multicelulares, el comportamiento de una célula debe obedecer a las señales enviadas por las células circundantes. Sobre la base de estas señales, la célula decide si ingresa a la fase S o se retira del ciclo, entrando en una fase de quiescencia, diferenciación o muerte, procesos que requieren la salida de la célula del ciclo celular (Ilustración 8 – A, ver *R point*) (Massagué 2004). Durante la fase G1, las células sintetizan ARNm y proteínas para prepararse para la duplicación del material genético, mientras que durante la fase G2, además de la síntesis de ARNm y proteínas, las células duplican las organelas para que

puedan distribuirse equitativamente entre las dos células hijas [revisado en (Spector 2015)]. Una vez que la célula ha duplicado su material genético y el contenido citoplasmático, está lista para dividirse es decir lista para entrar en Mitosis.

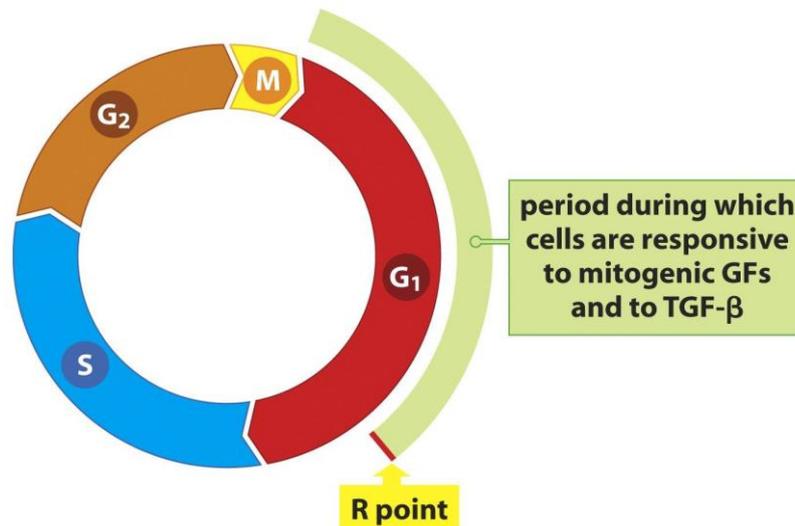


Ilustración 8. Fases del ciclo celular y la determinación del punto R (Weinberg 2014).

Las ciclinas y las CDK en la regulación del ciclo

Las quinasas dependientes de ciclinas (*cyclin dependent kinases* - CDKs) son proteínas serina / treonina quinasas que mantienen un nivel proteico en exceso y constante a lo largo del ciclo celular normal y requieren la unión a una ciclina para volverse catalíticamente competentes (Morgan 1995). Los diferentes miembros de la familia de las CDKs, en asociación con diferentes ciclinas, se convierten en interruptores claves a través del ciclo celular. La formación de los complejos CDK - ciclina es regulada por eventos de fosforilación / desfosforilación e interacción con los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas, CKIs, que controlan estrictamente el tiempo y el alcance de la activación de cada CDK (Morgan 1995). Por otro lado, las ciclinas se expresan y luego se degradan de forma sistemática para dirigir las fases del ciclo celular. Otros actores claves en la regulación del ciclo celular son p53 y la proteína del retinoblastoma (Rb).

Los pasos que controlan la entrada y el progreso de la fase G1 varían mucho con el tipo de célula y el contexto, aunque todas las células para entrar en fase S requieren de la activación de las CDKs (Massagué 2004). Existe la hipótesis de que el ADN se altera de determinada manera durante la fase G1, lo cual permite su replicación (le genera una “licencia de replicación”). Esta licencia se da cuando la caída de la actividad de CDK1 al final de la fase M permite que los sitios cromosómicos conocidos como centros de origen de replicación (*origin replication center* - ORC) se carguen con un complejo pre-replicativo (PRC). Durante la fase G1, se forma el complejo de la CDK2 con las ciclinas del tipo E (Ilustración 9), y en esta activación los PRC reclutan helicasas, primasas y polimerasas de ADN, provocando el desenrollamiento de la doble hélice y la replicación del ADN. Los ORC recién replicados no pueden volver a ensamblar nuevos PRC hasta que la actividad de CDK1 vuelva a caer al final de la mitosis. El paso a través de la fase S, remueve esta licencia, haciendo al ADN refractario a la replicación en la fase G2; y es reestablecida después de división celular. Al restringir la licencia de replicación a la fase G1, cada ronda de replicación debe tener una división celular, para asegurar que el ADN se replique una única vez por ciclo celular. Toda esta hipótesis lleva al concepto de “licencia de replicación”. Las CDKs inhiben la licencia de replicación al regular negativamente la formación de PRC [revisado en (Takeda y Dutta 2005; Massagué 2004)].

La proteína del retinoblastoma (Rb) es el único sustrato de los complejos de ciclina D - CDK 4/6, pero éste también puede ser fosforilado por el complejo ciclina E - CDK2, creando una retroalimentación positiva que ayuda a la entrada en fase S una vez que CDK2 ha sido lo suficientemente activado. Sin embargo, sería una simplificación excesiva implicar las funciones de las ciclinas D, CDK 4/6, Rb, E2F y CDK2 en una vía estrictamente lineal (Massagué 2004). Es importante destacar que c-Myc controla el mecanismo de paso de la fase G1 a S, regulando el complejo ciclina E - CDK2, en paralelo a la vía clásica de pRb-E2F (Santoni-Rugiu et al. 2000). Otro mecanismo que impide la entrada prematura en la fase S depende de las proteínas inhibidoras que se unen al complejo ciclina - CDK y

desorganiza su centro catalítico. Uno de estos inhibidores, p27^{Kip1}, funciona como un freno integral del ciclo celular; y otros, como p15^{Ink4b}, p16^{Ink4a}, p21^{Cip1/WAF1} y p57^{Kip2} son mediadores de señales citostáticas (Massagué 2004).

Después de pasar el punto de restricción (R), en la fase G1 tardía, las ciclinas del tipo E asociadas con la CDK 2 permiten la fosforilación de sustratos apropiados para la entrada en fase S. La fase S es la fase de síntesis de ADN, de ahí proviene su nombre. Durante esta fase los cromosomas se duplican y la progresión exitosa a través de esta fase requiere que la replicación sea regulada adecuadamente para asegurar que todo el genoma se duplique exactamente una vez, sin errores, de manera oportuna (Takeda y Dutta 2005).

Durante la fase S, los PRC cargados en los ORC comienzan a replicar el ADN. Para ello, es necesaria la activación de las CDKs por parte de las ciclinas, en particular de la CDK 2 y la ciclina E y A (Woo y Poon 2003). Para que aumente la expresión de ciclina E, es necesario el factor de transcripción E2F, que durante la fase G1 se encuentra unido a Rb, inactivo (Nicolay y Dyson 2013). Ante un estímulo mitogénico, aumenta la cantidad de ciclina del tipo D, que se combinan con las CDK 4/6 para fosforilar a Rb, llevándola a un estado de hipo-fosforilación que resulta en la inactivación de esta última (Avni et al. 2003). Esta fosforilación provoca la disociación de E2F y Rb, permitiendo que E2F actúe como factor de transcripción, activando la transcripción de la ciclina del tipo E, y de varios componentes necesarios para la replicación del ADN y de los eventos subsecuentes (Sears y Nevins 2002; Bertoli, Skotheim y de Bruin 2013).

A medida que las células entran en fase S, las ciclinas del tipo A reemplazan a las ciclinas del tipo E como compañeros de CDK2 y por lo tanto permiten el progreso de la fase S (Ilustración 9). En la última etapa de la fase S, las ciclinas del tipo A cambian de compañero, dejando a la CDK2 y asociándose a CDK1. Como la célula prosigue a la fase G2, la ciclina del tipo A se reemplaza como compañero de la CDK1, por las ciclinas del tipo B (Ilustración 9). Finalmente en el comienzo de la fase M, los complejos de CDK1 con las

ciclinas del tipo B disparan muchos eventos de la profase, metafase, anafase y telofase que juntos constituyen el complejo programa de la mitosis.

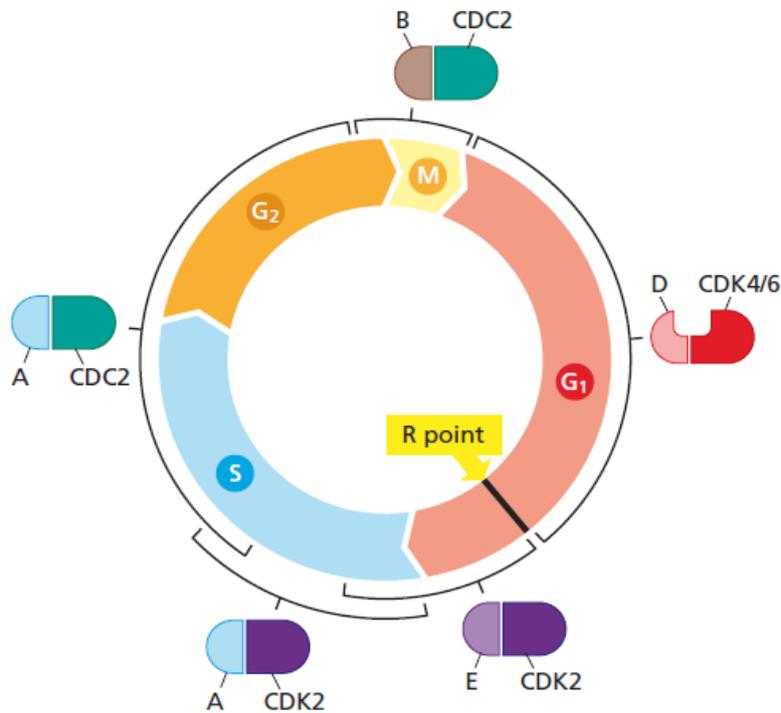


Ilustración 9. Formación de complejos ciclina – CDK que caracterizan cada fase del ciclo y principales *checkpoints* (Weinberg 2014) .

La regulación de todo este proceso, depende de los cambios en los niveles de las ciclinas y de su capacidad de formar complejos con unas u otras CDKs. Es así, que está ampliamente reportado que al comenzar la fase de mitosis, la expresión de la ciclina del tipo B, aumenta abruptamente [revisado en (Gavet y Pines 2010; Fisher et al. 2012)]. Los niveles de la ciclina E son bajos durante la mayor parte de la fase G1, y aumentan abruptamente después de que una célula ha pasado el punto R, y colapsan cuando la célula entra en la fase S [revisado en (Zetterberg, Larsson y Wiman 1995)], mientras que la ciclina del tipo A aumenta en consonancia con la entrada de la célula en fase S (Ilustración 10) [revisado en (Weinberg 2014)]. La caída abrupta en la expresión de ciclinas a medida que la célula avanza de una fase del ciclo celular a la próxima se debe a su rápida degradación debida a la marcación con cadenas de poliubiquitina que lleva a la degradación

proteolítica en los proteosomas. La acumulación gradual de ciclinas seguida de su rápida degradación tiene una consecuencia funcional importante para el ciclo celular, porque dicta que el ciclo celular pueda moverse en una sola dirección.

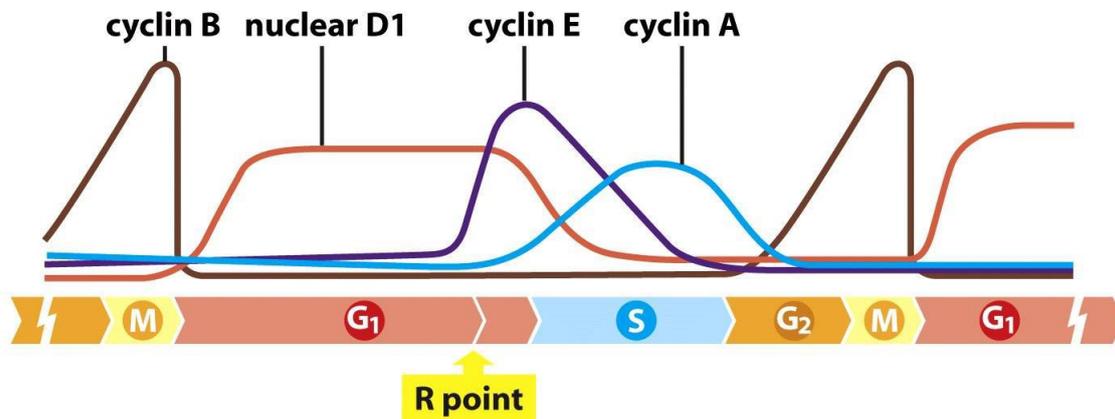


Ilustración 10. Cambios en la expresión de la ciclina en las diferentes fases del ciclo celular (Weinberg 2014).

Rol de los CKIs en la regulación del ciclo celular

Las CDKs son reguladas negativamente por la fosforilación y por la acción de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKIs). En las células de los mamíferos, hay dos clases de CKIs: de la clase INK4 y de la clase Cip / Kip. Estos inhibidores, dado su participación en la inhibición de los complejos CDK - ciclina, tienen importantes roles en el desarrollo, en los puntos de control y en la supresión de tumores (Harper 1997).

Dentro de la clase INK4, se reconocen cuatro miembros: p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}. Todos ellos inhiben a las CDK 4/6 (Ilustración 11), de ahí proviene su nombre (**IN**hibidor de **CDK 4**), y comparten una estructura similar. Sin embargo, la diversidad en el patrón de expresión de los genes INK4 sugirió que esta clase de CKI podría tener funciones específicas de linaje celular o de tejidos (Cánepa et al. 2007). La interacción entre p16^{INK4a}, ciclina D / CDK y Rb / E2F juntos constituyen una unidad funcional conocida como la vía Rb. Cada uno de los componentes principales de este mecanismo puede desregularse en el cáncer, y evidencia acumulada apunta a la "vía Rb" como un candidato casi obligatorio en la

oncogénesis de posiblemente todos los tipos de tumores humanos (Viallard et al. 2001). La sobre-expresión de proteínas INK4 arresta las células en fase G1, de una manera dependiente de Rb. En este escenario, la CDK4 se redistribuye de los complejos de ciclina D-CDK4 a complejos de INK4-CDK4, y la ciclina de tipo D no unida se degrada rápidamente por la vía de degradación de proteosoma. Esto evita la formación de los complejos ciclina E - CDK2 y posteriormente la formación del complejo ciclina D - CDK2, resultando en una inhibición completa de las actividades de ciclina E-CDK2 y ciclina A-CDK2, fosforilación de pRb y salida de la fase G1 [revisado en (Roussel 1999)].

La clase de los CKI Cip / Kip, comprende tres miembros $p21^{Cip1/Waf1}$, $p27^{Kip1}$ y $p57^{Kip2}$. Esta clase, a diferencia de la INK4 que inhibe únicamente a CDK 4/6, tiene un rango de acción más amplio ya que inhibe a los otros complejos (ciclina E - CDK2, ciclina A - CDK2, ciclina A - CDK1, ciclina B - CDK1) (Ilustración 11). El CKI $p57^{Kip2}$ tiene un papel importante durante la embriogénesis de algunos tejidos, es por esto que la mayor cantidad de evidencia se acumula con respecto a los otros dos miembros en la regulación del ciclo celular (Pateras et al. 2009).

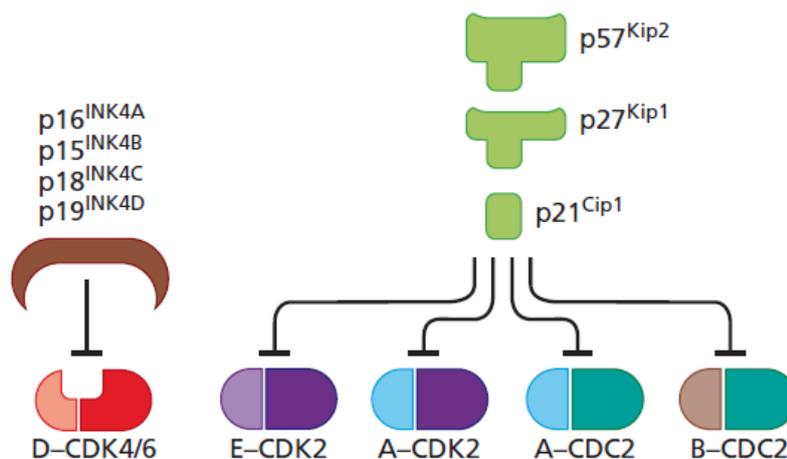


Ilustración 11. Inhibidores de complejos ciclina – CDK y complejo específico que inhibe (Weinberg 2014).

El miembro más importante de la clase Cip / Kip es p21^{Cip1/Waf1}, ya que responde aumentando su expresión cuando la célula detecta daño en el ADN, y actúa inhibiendo la formación de complejos CDK / ciclina posteriores al punto R, cuando la progresión del ciclo celular es independiente de la presencia de mitógenos. El CKI p21^{Waf1/Cip1} suele activar la reparación del ADN al interactuar con el antígeno nuclear de proliferación celular (*proliferating cell nuclear antigen* - PCNA) limitando la acumulación del daño en el ADN. Las células en respuesta al daño del ADN, provocan inhibición de la apoptosis, la entrada en el ciclo celular, la división simétrica y la reparación parcial del ADN. Cada uno de estos eventos biológicos depende de la regulación positiva del inhibidor del ciclo celular p21^{Waf1/Cip1}. Además, la inhibición de la apoptosis y la división simétrica de células madre son la consecuencia de la regulación negativa del supresor tumoral p53, como resultado directo de la regulación positiva de p21^{Waf1/Cip1} [revisado en (Insinga, Cicalese y Pelicci 2014; Karimian, Ahmadi y Yousefi 2016)]. Por otro lado, p21^{Waf1/Cip1} es capaz de desacoplar el complejo E2F /CDK2, así como de regular negativamente a E2F y así reprimir la transcripción de genes esenciales para la progresión del ciclo celular [revisado en (Møller 2000)]. Por su parte, el CKI p27^{Kip1}, tiene mayor afinidad por los complejos CDK - ciclina que por las CDKs solas (Toyoshima y Hunter 1994). Este CKI puede inducir un arresto del ciclo celular en fase G1, tanto dependiente como independientemente de pRb y también actúa como mediador de señales extracelulares, tanto mitogénicas como antimitogénicas [revisado en (Møller 2000)].

Puntos de control

Los puntos de control (o *checkpoints*) del ciclo celular son mecanismos mediante los cuales se controlan el orden, la integridad y la precisión de los principales eventos del ciclo celular. Entre estos eventos se incluyen el crecimiento al tamaño apropiado de la célula, la replicación y la integridad de los cromosomas, y su segregación precisa en la mitosis. Muchos de estos mecanismos son antiguos y altamente conservados desde los organismos más simples como las levaduras. Otros han evolucionado en organismos

superiores, y controlan destinos alternativos de la célula con un impacto significativo sobre la supresión tumoral (Yasutis y Kozminski 2013).

Diferenciación del músculo esquelético

La miogénesis es el proceso que permite la diferenciación de las células mesenquimales en mioblastos, que proliferan, se retiran del ciclo celular, se alinean y se fusionan para formar las fibras que en conjunto formarán el tejido muscular.

Durante el desarrollo, las células positivas para PAX3 son células fundadoras que forman la base de las fibras iniciales y las células PAX7 positivas contribuyen formando fibras secundarias y estableciendo un reservorio de células satélite (Maqbool y Jagla 2007). Luego, se expresa el primer factor miogénico MyF5, que lo hace durante el desarrollo embrional. Éste es redundante con MyoD, ya que ratones carentes de MyF5, desarrollan el tejido muscular normal, compensando la falta de MyF5, con una mayor expresión de MyoD y viceversa. Sin embargo, los ratones dobles *knockout* para MyF5 / MyoD, no son capaces de desarrollar masa muscular (Rot-Nikcevic et al. 2006). Entonces, tanto MyF5 como MyoD actúan para especificar a los mioblastos para la diferenciación terminal. Luego, la entrada de los mioblastos en la vía de la diferenciación está indicada por el aumento de miogenina. Cuando aumenta p21^{Waf1/Cip1}, se produce la salida irreversible del ciclo celular; seguida de la diferenciación fenotípica indicada por la inducción de la cadena pesada de la miosina (*Myosin heavy chain* - MHC) y finalmente la fusión celular, donde está involucrado (*Myogenic regulator factor* - MRF) 4, que actúa promoviendo la expresión de genes específicos de miotubos (Andrés y Walsh 1996; Bentzinger, Wang y Rudnicki 2012).

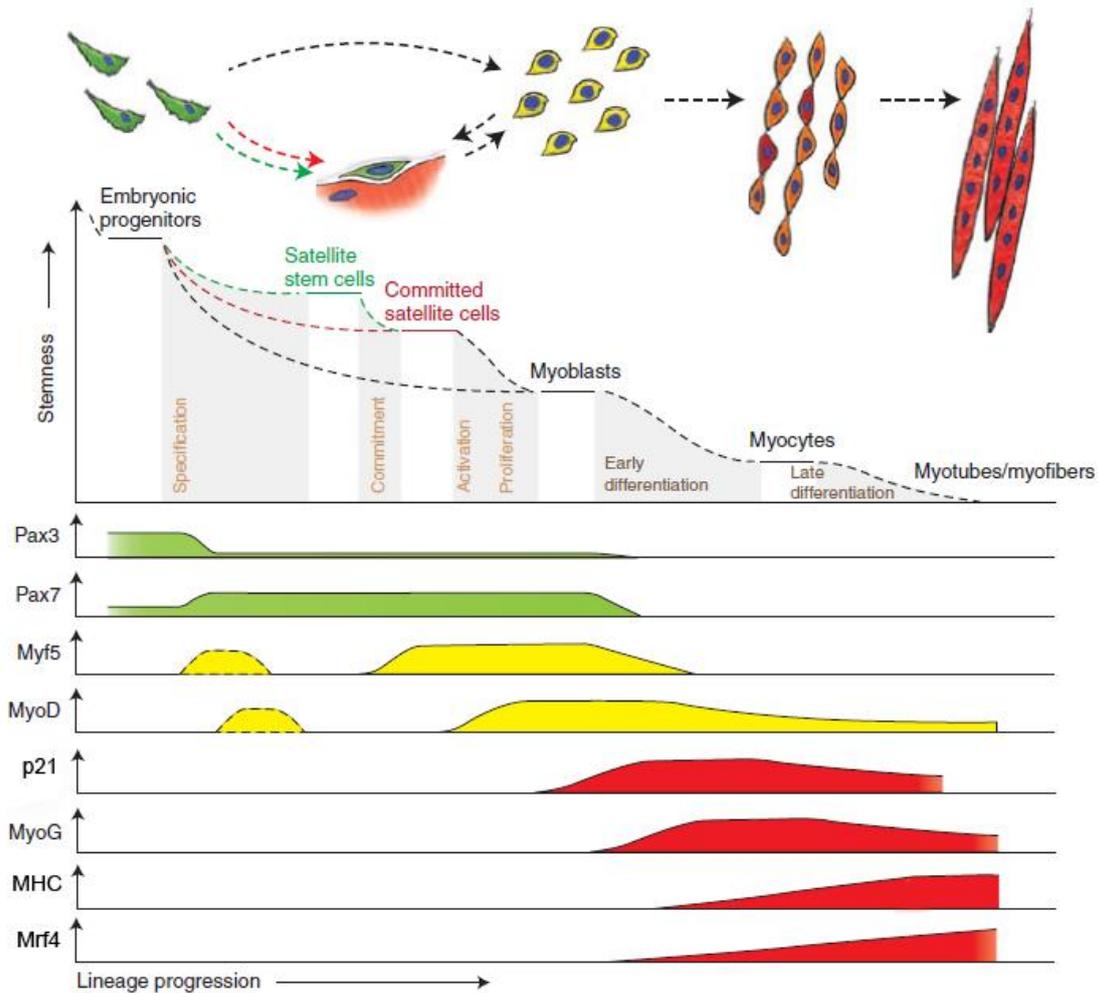


Ilustración 12. Progreso del linaje celular muscular y expresión de marcadores [modificado de (Bentzinger, Wang y Rudnicki 2012)]

Las células progenitoras musculares que están involucradas en la diferenciación muscular embrionaria, saltan el estadio quiescente de célula satélite y directamente se vuelven mioblastos. Algunos progenitores permanecen como células satélites en el músculo postnatal y forman una población de células madres pluripotentes y células comprometidas al linaje muscular. Los factores PAX 3/7 son reguladores maestros de la especificación temprana del linaje, mientras que MyF5 y MyoD compromete a la célula al programa de diferenciación. La expresión de genes de diferenciación terminal, es necesaria para la fusión de los miocitos y la formación de miotubos, que son llevadas a cabo tanto por la miogenina como por MRF4.

Apoptosis

El programa apoptótico implica cambios celulares que conducen al suicidio celular y que se realizan de acuerdo a un esquema coordinado con precisión, en respuesta a un daño genómico irreparable y masivo, en respuesta a la anoxia (privación extrema de oxígeno), o a desbalances severos en la señalización. Durante la apoptosis se forman ampollas en la membrana plasmática; el núcleo y las mitocondrias se colapsan en estructuras densas (estados denominados picnosis nuclear y mitocondrial, respectivamente) y luego el ADN se fragmenta. En última instancia, la célula apoptótica se descompone en pequeños fragmentos, llamados cuerpos apoptóticos, que son rápidamente ingeridos por células vecinas en el tejido o por macrófagos itinerantes, eliminando así todos los rastros de lo que había sido una célula viva, sin que se produzca el proceso de inflamación. En las células vivas y metabólicamente activas las moléculas de fosfatidilserina (*Phosphatidylserine* - PS) sólo están presentes en la cara interior de la bicapa que forma la membrana plasmática. Esta asimetría característica se pierde durante la apoptosis temprana, dando como resultado la visualización de PS en la cara exterior de la bicapa lipídica y su reconocimiento por un receptor de anexina especializado en la superficie de macrófagos, la unión resultante de macrófagos a la célula apoptótica desencadena la fagocitosis.

En un sentido general, la apoptosis se utiliza para mantener un número apropiado de diferentes tipos de células en una amplia variedad de tejidos humanos. La apoptosis que se utiliza para el mantenimiento rutinario de los tejidos no parece depender de la función p53 y, en cambio, es activada por otros mecanismos. Por lo tanto, las acciones de p53 parecen estar limitadas a situaciones de emergencia, que ocasionalmente amenazan a las células y tejidos. En el contexto específico de la patogénesis del cáncer, el organismo utiliza la apoptosis desencadenada con p53 como medio para eliminar células que tienen el potencial de convertirse en neoplásicas, incluyendo algunas células que han sostenido

ciertos tipos de mutaciones desreguladoras del crecimiento y otras que han sufrido daños generalizados a sus genomas.

La proteína p53 inicia la apoptosis en parte a través de su capacidad para promover la expresión de varios genes diana aguas abajo que especifican componentes de la maquinaria apoptótica. Entre ellos están los genes que codifican un grupo diverso de proteínas pro-apoptóticas y al mismo tiempo, p53 reprime la expresión de genes que especifican proteínas de supervivencia (Ilustración 13).

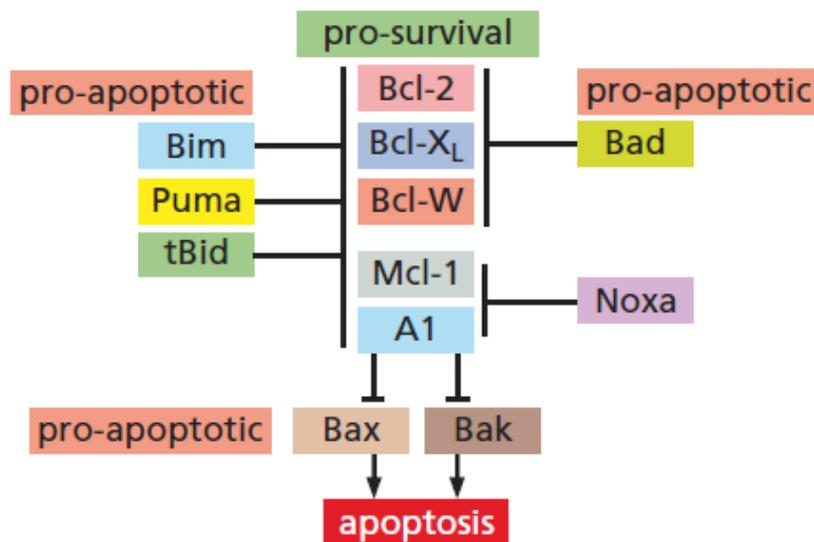
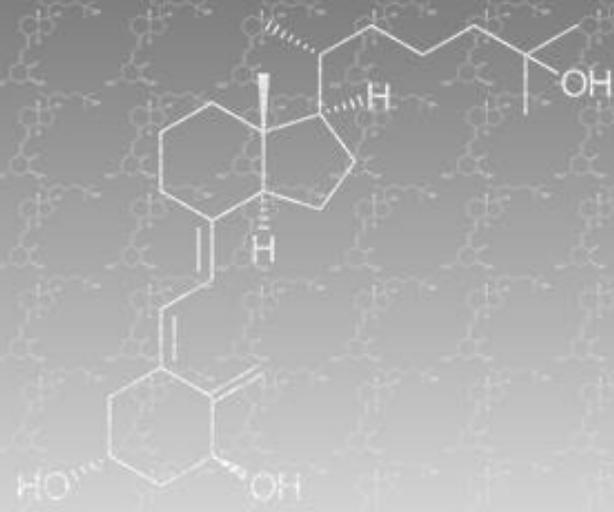


Ilustración 13. Proteínas de supervivencia y pro-apoptóticas (Weinberg 2014).

Las acciones biológicas de p53 caen en dos categorías principales. En ciertas circunstancias, p53 actúa de forma citostática para detener el avance del ciclo celular. En otras situaciones, p53 activa la maquinaria apoptótica latente de una célula, garantizando así la muerte celular. La elección entre estos modos alternativos de acción parece depender del tipo de estrés fisiológico o daño genético, de la gravedad del estrés o daño, del tipo de célula y de la presencia de otras señales pro- y anti-apoptóticas que operan en una célula. A nivel bioquímico, no queda claro cómo p53 decide entre imponer la detención del ciclo celular y desencadenar la apoptosis.

La literatura basada sobre la muerte celular, incluso anterior a la descripción de la apoptosis, revela cambios que sufre la mitocondria durante la muerte celular. Los cambios más frecuentes que sufre la mitocondria son la reducción del tamaño, la hiper-densificación de la matriz, característica conocida como “picnosis mitocondrial” y la desorganización de la red mitocondrial que se existe en una célula saludable (Desagher y Martinou 2000)

Varios trabajos han sugerido que las ciclinas y las CDKs por sí mismas pueden iniciar la apoptosis cuando están sobre-expresadas. Los resultados colectivos de estos estudios inicialmente sugirieron que la sobreexpresión de cualquier ciclina o cualquier CDKs podría resultar de la transición temprana del ciclo celular en un ciclo celular abortivo y apoptosis (Dobashi, Takehana y Ooi 2003). Sin embargo, encontramos que no todas las CDKs y ciclinas puedan causar apoptosis, la regulación positiva de la actividad quinasa y la sobreexpresión de CDK4 y de la ciclina D1 son mediadores primarios y críticos de la apoptosis, más allá del tipo celular. Además la inactivación de Rb deja a las células más susceptibles a la apoptosis por la expresión anormal de cualquiera de los reguladores del ciclo celular (Katayama et al. 2003).



Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

➤ En células de músculo esquelético normales sabemos que el 1,25D ingresa al interior celular y creemos que, mediante su interacción con el VDR, induciría proteínas claves que regulan el ciclo celular, la proliferación y la diferenciación. De este modo, la hormona desencadena eventos que conducen a la activación de vías de transducción de señales (MAPKs, por ejemplo) que posteriormente regularían la expresión de genes específicos, modulando así la miogénesis celular y la expresión de su receptor.

➤ Si bien se desconoce por completo la ruta de señalización que emplea la hormona en células de RMS, suponemos que hallaremos diferencias en comparación con las células normales, sobre todo a nivel de la regulación del ciclo celular. Se hipotetiza que el 1,25D conduciría a las células de cáncer a la diferenciación símil músculo esquelético y/o la apoptosis celular.

Objetivos

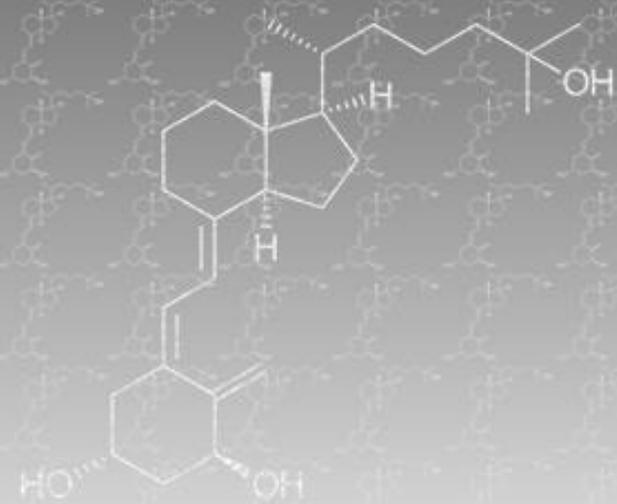
Objetivos Generales

- ✓ Caracterizar las acciones del 1,25D y su receptor en la activación de las vías MAPKs en células de músculo esquelético normales y determinar su rol en la regulación del ciclo celular.
- ✓ Caracterizar las acciones que ejerce el 1,25D en células de músculo esquelético tumorales de RMS y determinar su rol en la regulación del ciclo celular.
Determinar la expresión del VDR en células de RMS.

Objetivos específicos:

- Investigar las acciones del 1,25D en células normales de músculo esquelético a nivel de la activación de Src, MKK 3/6, p38 MAPK y ERK 1/2.

- Elucidar cambios provocados por la hormona en mioblastos normales a nivel del ciclo celular y de la expresión de sus proteínas clave.
- Identificar el rol del VDR en la regulación del ciclo celular por el 1,25D y de la activación de las vías MAPK en células de músculo esquelético normal y en células RMS.
- Investigar las acciones del 1,25D en células de RMS a nivel de la activación de Src, MKK 3/6, p38 MAPK y ERK 1/2
- Elucidar cambios provocados por la hormona en células RMS a nivel del ciclo celular y la expresión de sus proteínas clave.
- Investigar las acciones del 1,25D a nivel de la proliferación, diferenciación e inducción a la apoptosis de las células de RMS.



Materiales y Métodos

Materiales

Producto	Marca / Proveedor (Nro. de catálogo)
DMEM con bajo contenido en glucosa y sin rojo fenol	US Biological, Inc. (Salem, MA, USA) (D9806)
DMEM con alto contenido en glucosa y con rojo fenol	Sigma Aldrich (# D7777)
Suero fetal bovino	Natocor (Argentina) (# SFBE)
Sulfato de Estreptomicina - Penicilina G sódica	Laboratorios Richet S.A.
Nistatina	Droguería Saporiti S.A.C.I.F.I.A.
Calcitriol o 1,25D	Sigma Aldrich (#D1530)
Puromicina	Invitrogen (Invivogen, San Diego, CA) (# ant-pr-5)
Amersham ECL Full-Range Rainbow Molecular Weight marker	General Electric (Oklahoma, USA) (RPN800E)
Membranas de Immobilon P (PVDF: polivinil-difluoruro; Millipore 0,45 µm)	Thermo Scientific (USA) (# 88518)
Albúmina de suero bovino (BSA)	Sigma Aldrich (#A9647)
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	General Electric (Oklahoma, USA) (RPN2232)
Films Kodak X-OMAT	General Electric (UK) (28906836)
Yopro	Molecular Probes (OR, USA) (Y3603)
MitoTracker® Red CMXRos	Molecular Probes (OR, USA) (M7512)
DAPI	Molecular Probes (OR, USA) (D1306)
siRNA Ctrl	Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) (sc-37007)
siRNA Ciclina D3	Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) (sc-35137)
siRNA Dilution Buffer	Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) (sc-29527)
siRNA Transfection Reagent	Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) (sc-29528)
siRNA Transfection Medium	Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) (sc-36868)
PI/RNase Staining Buffer kit	BD Biosciences (USA) (#550825)
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences (USA) (#556547)
High Pure RNA Isolation Kit	Roche (11828665001)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (4368814)

KAPA SYBR® FAST qPCR Kit	Kapa Biosystems (KR0389 - v8.12)
Master Mix (2x) Universal	
Anticuerpo anti- VDR	Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) (sc-1008)
Anticuerpo Anti- GAPDH	Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) (sc-32233)
Anticuerpo Anti- Ciclina D3	Cell Signaling Technology, Inc. (MA, USA) (#2936)
Anticuerpo Anti- Ciclina D1	Cell Signaling Technology, Inc. (MA, USA) (#2926)
Anticuerpo Anti- p21	Cell Signaling Technology, Inc. (MA, USA) (#2946)
Anticuerpo Anti- p27	Cell Signaling Technology, Inc. (MA, USA) (#2552)
Anticuerpo Anti- p15	Cell Signaling Technology, Inc. (MA, USA) (#4822P)
Anticuerpo Anti- CDK4	Cell Signaling Technology, Inc. (MA, USA) (#2906)
Anticuerpo Anti- CDK6	Cell Signaling Technology, Inc. (MA, USA) (#3136P)
Anticuerpo Anti- Tubulin	Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) (sc-73242)
Anticuerpo Anti- p-p38	Cell Signaling Technology, Inc. (MA, USA) (#4511P)
Anticuerpo Anti- p38	Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) (sc-
Anticuerpo Anti- p-ERK 1/2	Cell Signaling Technology, Inc. (MA, USA) (#4370P)
Anticuerpo Anti- p-MKK 3/6	Cell Signaling Technology, Inc. (MA, USA) (#12280)
Anticuerpo Anti- Myogenin	Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) (sc-12732)
Anticuerpo Anti- caveolin	Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) (sc-101653)
Anticuerpo Anti- p-Src	Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) (sc-16846)
HRP-conjugated anti-rabbit	Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) (sc-2004)
HRP-conjugated anti-mouse	Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) (sc-2005)
Goat anti-rabbit conjugado a Alexa Fluor 488	Molecular Probes (OR, USA) (A-11008)
Goat anti-mouse conjugado a Alexa Fluor 647	Molecular Probes (OR, USA) (A-21236)
Goat anti-mouse conjugado a Cy3	Molecular Probes (OR, USA) (A-10521)

Goat anti-rabbit conjugado a Cy5	Molecular Probes (OR, USA) (A-10523)
Inhibidor SB 203580	TOCRIS Bioscience, (Bristol, UK) (#1202)
Inhibidor UO126	TOCRIS Bioscience (Bristol, UK) (#1144)
Inhibidor PP1	TOCRIS Bioscience (Bristol, UK) (# 1397)

Modelos experimentales

Línea celular de músculo esquelético normal: C2C12

Se trata de una población clonada pura de células miogénicas obtenidas de músculo esquelético murino adulto, que puede proliferar y diferenciar en cultivo (Yaffe y Saxel 1977). Los mioblastos C2C12 son chatos, poligonales y mononucleados, con un núcleo grande redondo central, cuando son mantenidos en medio de crecimiento (ver Ilustración 14). Expresan actina, principalmente en la periferia celular y en los contactos focales (Burattini et al. 2004). Cuando a estos mioblastos se los coloca en medio de diferenciación (MdD), detienen su proliferación, cambian su forma volviéndose fusiformes, comienzan a fusionarse a los dos días, con una tasa máxima de fusión a los cuatro días, y finalizan a los ocho días; todo este proceso se acompaña con la expresión de marcadores miogénicos específicos para cada etapa MyoD, Myf5, miogenina y MHC aunque no expresan MRF4, característico de una fibra muscular adulta (Dedieu et al. 2002). Durante este proceso de fusión, las estructuras involucradas en la contracción se ensamblan progresivamente, se comienzan a observar los sitios primordiales de anclaje de actina (Sanger et al. 2002).

Esta línea es ampliamente utilizada como modelo para los estudios de formación de músculo esquelético, desde su obtención en la década del 70' (Yaffe y Saxel 1977) hasta la fecha (Qiu et al. 2017; Blondelle et al. 2017). También ha sido un modelo considerablemente aceptado para los estudios de transdiferenciación de tejido muscular a tejido adiposo (Yeow et al. 2001) o tejido óseo (Rauch et al. 2002; Sondag et al. 2014).

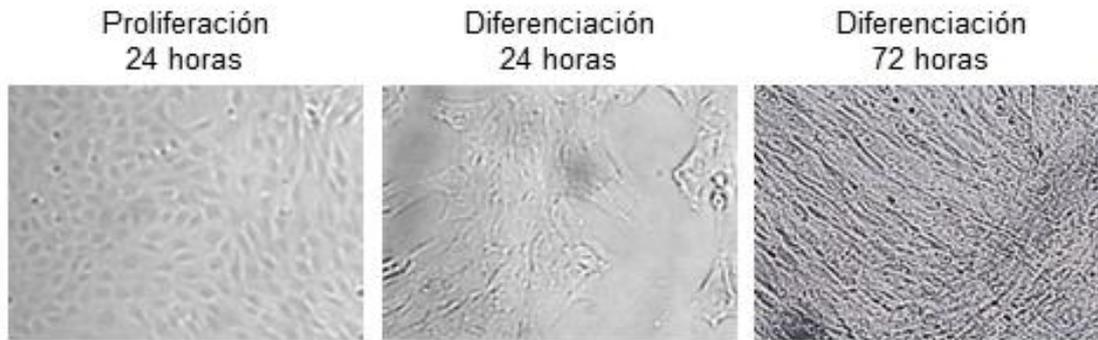


Ilustración 14: Fotos obtenidas por observación microscópica de contraste de fase, aumento 10x de la línea celular C2C12 en proliferación y diferenciación temprana y tardía

En la Ilustración 14 puede observarse que las células C2C12, cuando son mantenidas en estado proliferativo, es decir en medio de crecimiento (MdC) durante 24 horas, mantienen una forma poligonal y son mononucleadas. En cambio, cuando son mantenidas durante 24 horas en MdD, éste provoca un estímulo a la diferenciación y puede observarse cómo comienzan a alinearse, alargándose pero continúan siendo mononucleadas. En una etapa final de diferenciación, a las 72 horas de estímulo con MdD, las células ya aparecen como miotubos alargados multinucleados.

Línea de células carente de VDR: C2C12shVDR

Los ARNs de interferencia (ARNi) son ARNs cortos sintetizados químicamente que pueden suprimir la expresión de genes heterólogos o endógenos en los cultivos celulares. Aunque estos efectos pueden durar unos días, son transitorios. La integración genómica de vectores que expresan de forma estable los ARNs de horquilla pequeños (*short-hairpin ribonucleic acid* - shRNAs) que imitan a los ARNi supera esta restricción proporcionando una fuente continua y heredable de ARNi.

Para generar una línea celular C2C12 con la expresión del gen del VDR *knockeado* (silenciado) de manera estable, se infectaron las células C2C12 con partículas lentivirales que contenían el vector pLKO.1 con la información para expresar un *shRNA* dirigido contra el ARNm del VDR murino. Este plásmido también tiene un gen que codifica para la

resistencia a la puromicina, por lo tanto la adición de puromicina al medio de cultivo permite hacer una selección de las células que expresan el *shRNA* contra el VDR establemente, ya que las células C2C12 *wild type* mueren a ciertas dosis de este antibiótico. Primero se determinó la concentración óptima de puromicina para esta línea celular antes de iniciar los experimentos (ensayos para establecer una curva de valoración, *titration curve*). Para esto, se sembraron las células C2C12 en placas de Petri de 35 mm de diámetro y se dejaron crecer en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino a 37 °C bajo atmósfera húmeda de 95,5 % aire / 5,5 % CO₂ durante la noche, hasta que las células alcanzaron aproximadamente el 80 % de confluencia. La puromicina se diluyó en el medio de cultivo DMEM a diferentes concentraciones 1 - 4 (con intervalos de 1 µg/ml), y luego fue adicionada a las células. Se examinaron las células todos los días utilizando un microscopio óptico y se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco conteniendo la puromicina a una concentración deseada todos los días. La concentración mínima requerida que resulta en una muerte de todas las células después de 3 días fue de 2 µg/ml, por lo que se utilizó esta concentración para la selección y el mantenimiento de esta nueva línea inmortalizada carente del VDR a la que decidimos llamar: células C2C12*shVDR*.

Para llevar a cabo la infección lentiviral de las células C2C12, se utilizaron células con un 80 % de confluencia aproximadamente. Se cambió el medio de cultivo por 1,5 ml de medio fresco conteniendo 4,5 µg de *polibrene* y 1,5 ml de la solución enriquecida con el virus, y se las incubó a 37 °C bajo atmósfera húmeda de 95,5 % aire / 5,5 % CO₂. Se renovó el medio por medio fresco después de 24 horas de infección. Para poder seleccionar las células infectadas, no se adicionó la puromicina hasta 48 horas después de la infección a fin de permitir la expresión en grado suficiente del gen de resistencia a la puromicina. El silenciamiento exitoso fue monitoreado por análisis Western blot.

Línea celular de RMS: RD

Esta línea se originó directamente de la biopsia de una niña caucásica de 7 años que presentaba RMS pélvico y tuvo un tratamiento con ciclofosfamida y radiación (McAllister

et al. 1969). Tiene características histológicas de un RMS embrionario, y las células cultivadas presentan 51 cromosomas hiperploides (Hinson et al. 2013; McAllister et al. 1969). Se ha demostrado que las células RD tienen amplificación del oncogén MYC (Missiaglia et al. 2009), mutación Q61H de NRAS (Schaaf et al. 2010) y mutación homocigótica de TP53 (Felix et al. 1992; Miyachi et al. 2009). Las células RD constituyen una de las líneas celulares más utilizadas en la investigación del RMS (Hinson et al. 2013) y son adquiridas comercialmente.

Métodos

Cultivo celular

Las células de músculo esquelético murino normal C2C12 obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC número: CRL-1772™, Manassas, VA), denominadas C2C12 wt fueron cultivadas en el medio de cultivo DMEM con bajo contenido en glucosa y sin rojo fenol, suplementado con 10 % de SFB inactivado por calor (30 minutos, 56 °C), 1 % de nistatina y 2 % estreptomycin-penicilina (MdCbg). Las células C2C12 crecen en monocapa a 37 °C bajo atmósfera húmeda de 95,5 % aire / 5,5 % CO₂. No se permitió que las células excedan el 70 % de confluencia durante los pasajes y fueron descartadas después de diez pasaje (aproximadamente 30 días), para minimizar el agotamiento de los mioblastos en cultivo. Se realizaron todos los experimentos independientemente, en diferentes pasajes (entre el primer y el décimo pasaje). Las células fueron sembradas a una densidad adecuada (100.000 células / cm²) en placas de Petri, con MdCbg y cultivadas a 37 °C en atmósfera húmeda de 95 % aire / 5 % CO₂. Bajo estas condiciones, los mioblastos se dividen dentro de las primeras 48 horas. Las células subconfluentes se sincronizaron al cambiar el medio por DMEM con bajo porcentaje (1 - 2 %) de SFB (*starving*). Las células cultivadas por dos días y sincronizadas de esta manera, fueron utilizadas para los tratamientos.

En el caso de la línea C2C12*shVDR*, se utiliza el mismo procedimiento para cultivo que con C2C12*wt*, solo que en el MdCbg se agrega el antibiótico de selección puromicina (2 µg / ml), con el fin de que sólo puedan sobrevivir y crecer aquellas células que contengan el plásmido con el *shRNA* contra el VDR y el gen de resistencia contra este antibiótico, específicamente.

Las células de RMS humano RD obtenidas del *Núcleo da Cultura da Células* (Instituto Adolfo Lutz, Sao Paulo, Brasil) fueron cultivadas en el medio de cultivo DMEM con alto contenido de glucosa y con rojo fenol, suplementado con 10 % de SFB inactivado por calor, 1 % de nistatina y 2 % estreptomicina-penicilina (MdCag). Las células RD crecen en monocapa a 37 °C bajo atmósfera húmeda de 95,5 % aire / 5,5 % CO₂. No se permitió que las células excedan el 70 % de confluencia durante los pasajes y fueron descartadas después de diez pasaje (aproximadamente 30 días), para minimizar el agotamiento de los cultivos. Se realizaron todos los experimentos independientemente, en diferentes pasajes (entre el primer y el décimo pasaje). Las células fueron sembradas a una densidad adecuada (100.000 células/cm²) en placas de Petri, con MdCag y cultivadas a 37 °C en atmósfera húmeda de 95 % aire / 5 % CO₂. En estas condiciones, las células se dividen dentro de las primeras 48 horas. Las células sub-confluentes se sincronizaron mediante *starving*, por 24 horas. Las células cultivadas por dos días y sincronizadas de esta manera, fueron utilizadas para los tratamientos que se describen en la sección de Resultados.

Tratamientos de las células con 1,25D

La hormona esteroide 1,25D es un compuesto fotosensible en polvo que se vehiculiza en alcohol (etanol o isopropanol) preparándola en un stock de concentración aproximada 10⁻³ M. De este stock se toma una alícuota para generar una solución de uso (aproximadamente 10⁻⁵ M). Se utilizan 150 µl de esta solución para determinar espectrofotométricamente el patrón de absorción en el rango de luz UV de la hormona preparada y establecer por un lado su concentración precisa y por el otro su factor de integridad. La concentración surge de dividir la absorbancia en su pico máximo a una

longitud de onda de 265 nm por 18300 y el factor de integridad se obtiene de dividir la absorbancia en su pico máximo a una longitud de onda de 265 nm, con la absorbancia en su pico mínimo en la longitud de onda 228 nm. Si este Factor da un número superior a 1,68 indica que el anillo beta de este secoesteroide está intacto y que esta hormona es funcional y por lo tanto se utiliza para generar las dosis adecuadas en los tratamientos, siempre en oscuridad. Si bien existe amplia información del uso de 1,25D a 1, 10 y 100 nM, se considera que la menor de las dosis de esta hormona que ejerce efectos es 1 nM. Además, en el laboratorio, previamente ha sido establecido que la hormona 1,25D ejerce la mayoría de sus efectos en células musculares esqueléticas a 1 nM (Buitrago 2002).

Medición de la viabilidad de las células

Para el control de la viabilidad y el conteo celular se utilizó la técnica de coloración con Azul de tripán. Este método se basa en el principio de exclusión donde las células vivas (viables) no incorporan el colorante, mientras que las células muertas (no viables) sí lo hacen (Strober 2015). El uso de este colorante permite además una adecuada visualización de la morfología e integridad celular. A 100 μ l de la suspensión de mioblastos lista para ser sembrada, se le agregó 100 μ l de una solución 0,4 % (p/v) de azul de Tripán (factor de dilución = 5), dejándose reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Con esta mezcla, se cargaron ambas cámaras de un hemocitómetro de Neubauer y se procedió al conteo de las células no teñidas (viables) por observación en microscopio óptico. En base al factor de dilución y al volumen de la cámara de conteo (0,1 mm³), se calcula la cantidad de células por mililitro de suspensión de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Nro. Células/ml} = (\text{Promedio de células} / \text{Cuadrante}) \times \text{Factor de dilución (5)} \times 10^4$$

Diferenciación de células C2C12wt y C2C12shVDR

Las células fueron sembradas a una densidad adecuada (10⁵ células / cm²) en placas de Petri, con MdCbg y cultivadas a 37 °C en atmósfera húmeda de 95 % aire / 5 % CO₂. Bajo estas condiciones, los mioblastos se dividen dentro de las primeras 48 horas.

Luego se les reemplazó el MdCbg por medio DMEM suplementado con 2 % de suero de caballo (horse serum - HS) denominado medio de diferenciación (MdD) por 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se realizaron los tratamientos con el 1,25D (1 nM).

Western blot

Obtención de lisados celulares y desnaturalización de proteínas

Luego de los tratamientos, a las células se les retira el medio por aspiración y las placas de Petri se lavan dos veces con PBS a 4 °C e inmediatamente se sumergen en N₂ líquido. Las cajas de Petri congeladas en N₂ líquido se descongelan a 4 °C. El contenido de cada caja es lisado con 50 - 100 µl de buffer lisis (Tris - HCl pH = 7,4 50 mM, NaCl 150 mM, Na₂VO₄ 0,2 mM, EGTA 2 mM, NaF 25 mM, PMSF 1 mM, Na dextrocholate 0,25 %, NP-40 1%, leupeptina 20 µg/ml, aprotinina 20 µg/ml) y colectado por aspiración con micropipetas. El lisado, se congela y se agita en vortex hasta descongelar nuevamente para favorecer la ruptura de las membranas celulares. Para descartar el material insoluble (*debris*) se centrifuga a 12.000 x g durante 15 minutos, a 4°C. Posteriormente las muestras se mezclan con buffer muestra (Tris - HCl 125 mM - pH = 6,8 -; SDS 4 %; β-mercaptoetanol 10 %; glicerol 20 %; azul de bromofenol 20 µg/ml) y se calientan a 100 °C durante 5 minutos a fin de desnaturalizar todas las proteínas y prepararlas para someterlas a electroforesis.

Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida

Se siembran entre 15 - 30 µg de cada muestra en geles de SDS-poliacrilamida discontinuos (gel de *stacking*: 4 %; gel de separación: 10 - 12 %) de acuerdo al protocolo de Laemmli (Laemmli 1970) y se separan por electroforesis, efectuándose la corrida a 15 mA por gel, empleando buffer de corrida (Tris - HCl 25 mM -pH = 8,3-; glicina 195 mM, SDS 0,1 %). La migración relativa de las proteínas desconocidas se determina con marcadores de peso molecular coloreados que caracterizan el rango de 10 – 225 kDa (*Full-Range Rainbow Molecular Weight marker* - Amersham ECL).

Electrotransferencia

Luego del SDS-PAGE, las muestras se electrotransfieren desde los geles a membranas de Immobilon P (polivinil-difluoruro - PVDF; Millipore 0,45 μm), previamente activadas en metanol por 30 – 60 segundos. La transferencia se realiza durante 2 horas a 300 mA (Towbin *et al.*, 1979) empleando el sistema *semi-dry* (Hoefer MiniVE Blotter, Amersham Pharmacia Biotech, CA, USA) y manteniendo los geles y membranas embebidas en buffer de transferencia (Tris-Base 25 mM (pH = 8,3); glicina 195 mM; metanol 20 %).

Bloqueo de sitios inespecíficos de las membranas

A fin de bloquear los sitios de unión inespecíficos, las membranas se incuban con 5 % de leche descremada en buffer TBS-T (Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, Tween 20 0,1 % v/v) durante una hora a temperatura ambiente.

Incubación con los anticuerpos

Las membranas que ahora poseen las proteínas celulares transferidas, resueltas por sus pesos moleculares, se incuban primero con una dilución adecuada del anticuerpo primario dirigido contra la proteína de interés preparado en 2,5 % de albúmina de suero bovino (BSA) en TBS-T durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las membranas se lavan con TBS-T tres veces (un lavado de 10 minutos y dos lavados de 5 minutos). A continuación se incuban con una dilución adecuada del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (anti-globulina de la especie correspondiente al anticuerpo primario utilizado) en 2 % de leche descremada en TBST-T durante una hora a temperatura ambiente. Se lavan las membranas nuevamente tres veces con TBS-T, se revelan con un sustrato quimioluminiscente (ECL - Amersham), se exponen a films Kodak X-OMAT y finalmente se cuantifican las bandas por densitometría, usando un densitómetro y el programa de análisis imagen ImageJ. Los datos se vuelcan a planillas de Excel para la construcción de los gráficos correspondientes.

Stripping

Para remover los anticuerpos de las membranas y poder exponerlas a un anticuerpo diferente, las membranas se sumergieron durante 30 minutos a 55 °C en 62,5 mM Tris - HCl pH 6,8, 2% SDS y 50 mM β-mercaptoetanol (*buffer stripping*) y luego se lavaron 10 minutos con TBS-T. Posteriormente se realizó el bloqueo continuando con el protocolo explicado anteriormente. Esto suele utilizarse para analizar proteínas cuyos niveles endógenos no varíen entre las muestras, a fin de hacerlo útil como control de siembra (denominadas proteínas totales).

Las membranas se re-utilizan volviéndose a incubar con un anticuerpo primario, siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito, contra alguna proteína cuyo peso molecular sea diferente al anteriormente analizado.

Ensayos de Inmunocitoquímica

Las células se siembran sobre cubreobjetos dentro de las cajas de Petri y se hacen crecer hasta un 50 - 60 % de confluencia. Luego de los tratamientos, se lavan tres veces con PBS atemperado a pH = 7,4 y se fijan durante 15 - 20 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído 0,4 % en PBS recientemente preparado, o con metanol a -20 °C durante 20 minutos.

Luego se lavan tres veces con PBS durante 5 - 10 minutos y de ser necesario, se permeabilizan las células con 0,1 % Tritón X-100 en PBS (cuando la fijación se realiza con metanol, este paso no se incluye). Luego de la permeabilización, se realiza un lavado con PBS y se bloquean los sitios no-específicos de ligado a proteínas con albúmina bovina 5 % en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Las células se incuban luego durante toda la noche a 4 °C, en presencia o en ausencia (control negativo) de los anticuerpos primarios en una dilución adecuada preparados en 2,5 % de BSA en PBS y en oscuridad. Al día siguiente, se realizan tres lavados con PBS de 10 minutos cada uno y las células se incuban por 60 minutos con un cóctel de los anticuerpos secundarios conjugados a un

fluoróforo anti-globulina de la especie correspondiente al anticuerpo primario utilizado (por ejemplo anti-ratón conjugado a Cy3 junto con anti-conejo conjugado a Cy5). Una vez transcurrido el tiempo, se realizan dos lavados con PBS y se incuban 5 - 10 minutos con el colorante nuclear (Yopro), se realizan 3 lavados más con PBS de 5 minutos. Finalmente los preparados se montan sobre portaobjetos usando líquido de montaje a base de glicerina, para su visualización por microscopía, eligiéndose un microscopio de epifluorescencia o uno confocal según la necesidad.

Marcación de las mitocondrias

El *Mitotracker* es un colorante catiónico, lipofílico, fluorescente y específico de la mitocondria. Cuando la sonda ingresa a una célula (en su forma reducida no fluorescente) que respira activamente, es oxidada dentro de la mitocondria (forma reducida), reaccionando con los grupos tioles de las proteínas mitocondriales, de forma específica e irreversible. Las células se siembran sobre cubreobjetos dentro de las cajas de Petri y se hacen crecer hasta un 50 - 60 % de confluencia. Luego de los tratamientos, se incuban con *Mitotracker* (1 μ M) en 15 ml de DMEM sin suero por 30 minutos a 37 °C en atmósfera húmeda de 95 % aire / 5 % CO₂. Luego se lavan dos veces con PBS a pH = 7,4 y se fijan durante 15 - 20 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído 0,4 % en PBS recientemente preparado.

Luego se lavan tres veces con PBS durante 5 - 10 minutos y se permeabilizan las células con 0,1 % Triton X-100 en PBS. Luego de la permeabilización, se realiza un lavado con PBS y se bloquean los sitios no-específicos de ligando a proteínas con albúmina bovina 5 % en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Las células se incuban luego durante 5 - 10 minutos con el colorante nuclear 4',6-diamidino-2-fenylindole (DAPI), se realizan tres lavados más con PBS de 5 minutos. Finalmente los preparados se montan para su visualización por microscopía de epifluorescencia o confocal según sea el caso.

Microscopía de fluorescencia confocal

Se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SP2. Para excitar las muestras se empleó un láser iónico de argón de 488 nm y un láser de helio-neón de 543 nm. Se utilizó el distribuidor de haz acústico-óptico (en inglés: AOB: *Acousto-Optical Beam Splitter*) para separar las señales de fluorescencia y se utilizó el software Meridian para la obtención de imágenes. Es importante destacar que el uso del microscopio confocal nos permite trabajar en un único plano focal y, a través de ensayos inmunocitoquímicos con dos diferentes anticuerpos, es posible detectar la co-localización de dos proteínas de interés. Con el uso de herramientas de software adosadas a este microscopio, es posible trazar una línea a lo largo de una zona celular y cuantificar la fluorescencia punto a punto de cada fluoróforo por separado. Esto se vuelca a un histograma y es un modo de cuantificar la co-localización entre dos proteínas, que sugiere la asociación física entre ellas.

Transfección de ARN de interferencia corto

Los ARNs de interferencia pequeños (*short interfering ribonucleic acid* – siRNA), son una clase ARN de interferencia que provoca una inhibición transitoria de la expresión de una proteína específica. Para realizar la transfección de un siRNA en particular contra el ARNm de una proteína a fin de suprimir específicamente la expresión de la misma; las células se siembran en *multi-wells* de 6 pocillos a razón de 2×10^5 células/pocillo y se incuban hasta lograr un 60 – 70 % de confluencia (usualmente 24 horas). Luego se preparan las siguientes soluciones estériles:

-*Solución A*: 5 μ l de siRNA (equivalente a 0.5 μ g siRNA) en 100 μ l de medio de transfección para siRNA, para cada pocillo.

-*Solución B*: 5 μ l de reactivo de transfección en 100 μ l de medio de transfección, para cada pocillo.

Se mezclan suavemente la solución A con la B y se incuban a temperatura ambiente por 30 minutos. Las células se lavan dos veces con medio de transfección y a

cada pocillo se le agrega 0,8 ml de la mezcla (solución A + solución B). Se deja a las células en el incubador metabólico durante 4 - 6 horas. Finalmente, la mezcla de transfección es removida y se reemplaza por medio DMEM con 1 % de SFB durante 24 horas adicionales, antes de realizar el tratamiento con la hormona o su vehículo.

Citometría de flujo por incorporación de ioduro de propidio (IP)

El IP es el colorante más usado para el análisis del ciclo celular por citometría de flujo. El IP se intercala entre las bases de ADN, de manera estequiométrica, y produce una alta fluorescencia al excitarse a 488 nm y emitir alrededor de los 600 nm, por lo tanto la cantidad de fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de ADN que contiene cada célula en particular. Como el IP puede unirse además al ARN de doble hebra, es necesario tratar a las células con ARNasas. Luego de los tratamientos específicos, las células se tripsinizan y se prepara una suspensión celular libre de grumos. Se lavan con PBS y se fijan en etanol 70% durante 2 horas a -20° C. Las células pueden ser guardadas en etanol 70 % a -20 °C por varias semanas, previo al teñido con IP. El kit comercial *PI/RNase Staining Buffer* (BD Biosciences, NJ, USA) permite la tinción con IP al mismo tiempo que trata a las células con ARNasas a fin de degradar los ARNs de doble hebra. Al momento del análisis, se dejan las muestras a temperatura ambiente, se extrae el alcohol y se lavan dos veces con PBS. Luego se agrega 500 µl del kit a cada muestra y se transfiere a tubos FACS para realizar el análisis por citometría de flujo en el equipo *FacsCalibur* (Biosciences).

Retrotranscripción y PCR cuantitativa en Tiempo Real - qRT-PCR

La retrotranscripción del ARNm a ADN complementario (ADNc) en conjunto con la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qRT-PCR) es una técnica que permite amplificar y simultáneamente cuantificar la cantidad de un ADNc obtenido a partir de una ARNm específico, de una muestra, a medida que la reacción avanza, en “tiempo real”. Esta cuantificación es relativa ya que se compara entre diferentes muestras la cantidad relativa

de ARNm de un gen específico, respecto al ARNm de un gen constitutivo (control endógeno).

Extracción del ARN total.

El ARN total fue aislado luego de los tratamientos empleando el kit comercial *High Pure RNA Isolation* de Roche. Para ello, luego de los tratamientos se lisaron las células con el buffer provisto en el kit y se realizó la retención del ARN en las columnas también provistas en el kit. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se realizaron los lavados, a fin que el ARN retenido se purifique y finalmente se eluyó de las columnas utilizando el *elution buffer* provisto en el kit para tal fin. La cantidad y calidad de ARN aislado se determinó espectrofotométricamente. Esta determinación se basa en la medida de la densidad óptica teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia de 260 nm equivale a 40 µg/ml de ARN. Se chequeó la ausencia de contaminación proteica, considerando que la relación entre las absorbancias de 260 nm / 280 nm debía estar comprendida entre 1,9 - 2,0.

Retrotranscripción de ARNm a ADNc

A partir del ARN obtenido anteriormente se sintetizó el ADN complementario (ADNc) a partir de 1 µg del ARN purificado, utilizando el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*, provisto de *random primers* y de la enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*. La retrotranscripción se realizó en un termociclador Eppendorf Mastercycler® Personal, empleando un programa de 10 minutos a 25 °C - 120 minutos a 37 °C - 5 minutos a 85 °C. La concentración de ADNc, que debe ser equivalente a la cantidad de ARN con el que se comenzó, se determinó por espectrofotometría, empleando un programa para la medición de la densidad óptica teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia equivale a 33 µg/ml de ADNc. El contenido de ADNc obtenido correspondiente a cada condición, se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

Real Time PCR.

Se evaluaron los cambios en la expresión de los genes de interés por Real Time PCR, empleando el reactivo *SYBR Green I*, siguiendo el protocolo del kit comercial KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2x) Universal. Para la cuantificación de la expresión de los genes de interés, se empleó el equipo de Real Time PCR de Applied Biosystems modelo ABI 7500.

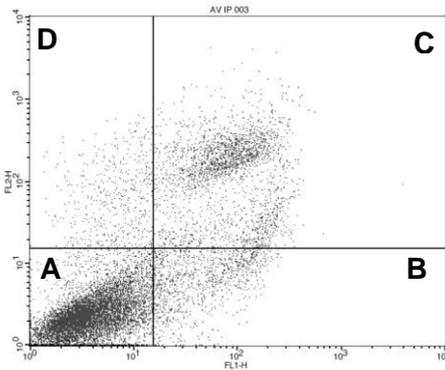
En todos los casos, al finalizar los ciclos de PCR se realizaron curvas de desnaturalización (curvas de *melting*) para confirmar la amplificación del fragmento adecuado, chequeando la generación de un único amplicón por reacción. Los *primers* para la amplificación de los genes estudiados fueron gentilmente donados por la Dra. Verónica González Pardo (Gonzalez-Pardo et al. 2012; Soares et al. 2017).

Para determinar la expresión relativa de los genes de interés, los datos fueron analizados por el método de cuantificación relativa por comparación de CT (*threshold cycle*, umbral de detección establecido) “ Δ CT” (Giulietti et al. 2001; Livak y Schmittgen 2001). El nivel de transcripción del gen en estudio se comparó con un gen de referencia, el cual tiene una expresión constante. En este caso se utilizó el gen de la enzima gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen de referencia. EL nivel de transcripción relativo se determina a partir de la diferencia entre los valores de CT (Δ CT). Los valores se expresan como $2^{-\Delta CT}$

Análisis de apoptosis por citometría de flujo

Los niveles de apoptosis celular fueron analizados por citometría de flujo utilizando la doble marcación con *Annexin V* (AV) conjugada a FITC y con IP. Al terminar el tratamiento, se recolectó el medio y las células que quedaron pegadas a la placa de Petri se tripsinizaron, y se preparó una solución libre de grumos. Se realizaron dos lavados con PBS frío. Luego se resuspendieron las células en el *Annexin V Binding Buffer* provisto en el kit, a una concentración de 1×10^6 células / ml. Se transfieren 100 μ l de la solución (1×10^5

células) a tubos FACS. Luego se agregan 5 μ l de AV conjugada a FITC y 5 μ l de IP. Se mezcla suavemente y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se les agrega 400 μ l del *Annexin V Binding Buffer* a cada tubo y se analiza por citometría de flujo dentro de la hora. El software *CellQuest Pro* del citómetro arroja los siguientes gráficos de dispersión como resultado para cada condición.



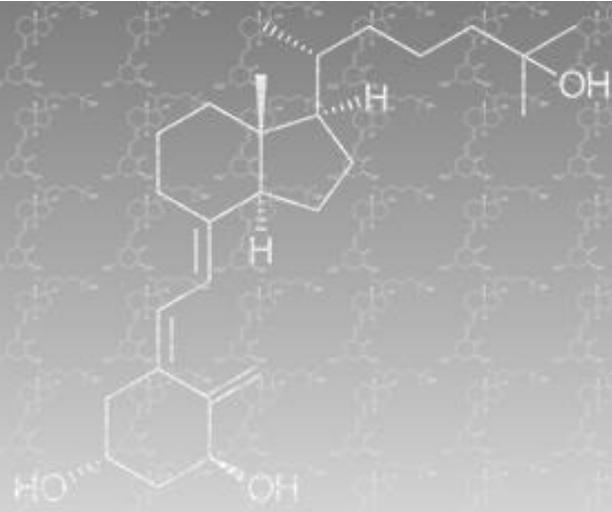
- A. AV⁻/IP⁻ → células vivas.
- B. AV⁺/IP⁻ → células en apoptosis temprana.
- C. AV⁺/IP⁺ → células en apoptosis tardía.
- D. AV⁻/IP⁺ → células necróticas.

Análisis estadísticos

Los resultados se expresan como promedios \pm desvío estándar (DE) y representan la media de al menos tres experimentos independientes con resultados comparables. La comparación de los resultados de las condiciones controles vs tratadas con la hormona fueron analizadas mediante Test T de Student, de dos colas considerándose que las diferencias eran estadísticamente significativas con valores de $p < 0,05$ (*) y muy significativas con valores de $p < 0,01$ (**).

Las diferencias estadísticas entre grupos de condiciones fueron determinadas mediante el análisis de la varianza ANOVA seguido de un test Tuckey. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0,001$.

En las leyendas de cada figura se aclara el valor de p al que se considera que la diferencia es estadísticamente significativa y el test utilizado. En caso que no se encuentre en la leyenda explicitado el test utilizado, se aplicó el Test T de Student.



Capítulo I

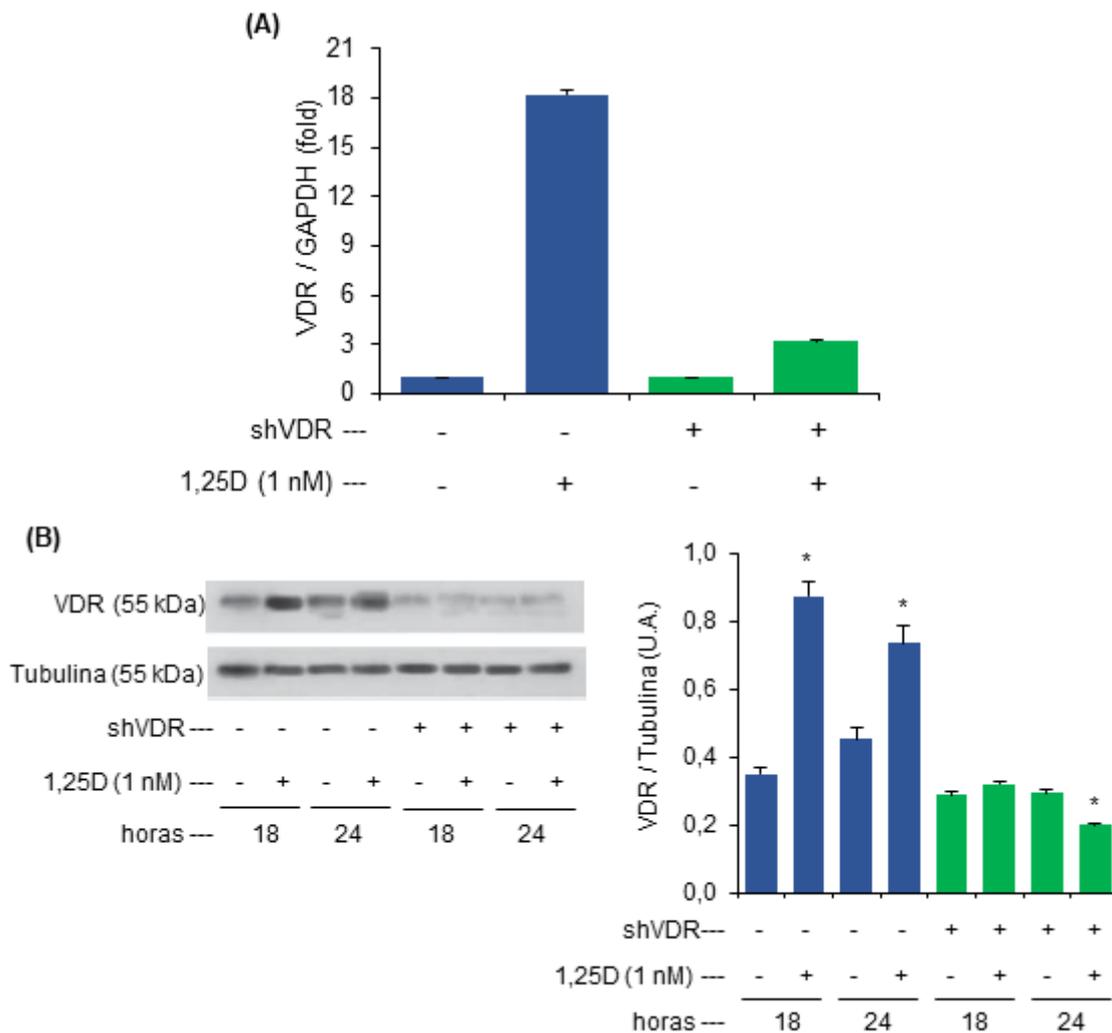
Rol del 1,25D en el ciclo celular de células musculares esqueléticas normales.

Resultados

Efectos de la transfección de un shRNA contra el VDR, a nivel del ARNm y de la proteína

Al transfectar las células C2C12 con un plásmido conteniendo un shRNA contra una región del ARNm del VDR murino, el éxito del silenciamiento debe corroborarse controlando los niveles del VDR. Se conoce que el 1,25D aumenta los niveles proteicos del VDR a partir de las 4 horas de tratamiento y también ha sido corroborado que el shRNA disponible en el laboratorio silencia la expresión del VDR tanto a 4 como a 6 horas (Buitrago, Pardo y Boland 2013). Sin embargo los niveles de expresión del ARNm del VDR en células transfectadas con este shRNA no habían sido determinados. Para controlar que el shRNA elegido inhibe satisfactoriamente la expresión del ARNm del VDR a las 24 horas de estímulo con el 1,25D, se realizó un ensayo de qRT-PCR a fin de medir la cantidad real de ARNm. Los resultados que arrojó este ensayo demuestran claramente que el tratamiento de las células C2C12 con 1,25D (1 nM) durante 24 horas aumenta aproximadamente 18 veces la expresión del ARNm del receptor, sin embargo, en las células en las que el VDR estaba *silenciado* (las células de la línea C2C12shVDR) el estímulo hormonal con 1,25D (1 nM) durante 24 horas logra un aumento mucho menor en la cantidad de ARNm de VDR (Figura 1 - A). Por otra parte, los niveles basales del ARNm de este receptor, sin estímulo hormonal, en ambas líneas son iguales. Mediante ensayos Western blot, puede observarse que las células C2C12wt expresan de manera basal al VDR, pero que el tratamiento con 1,25D durante 18 y 24 horas promueve un aumento significativo y sostenido en la expresión del mismo. Sin embargo, en la línea C2C12shVDR se determina que los niveles proteicos del VDR son significativamente más bajos que en la línea C2C12wt y que el tratamiento con 1,25D (1 nM) no logra aumentar su expresión a 18 horas e incluso a las 24 horas, la expresión disminuye significativamente (Figura 1 - B).

Figura 1. El estímulo con 1,25D aumenta la expresión de VDR en C2C12wt, pero no en las C2C12shVDR



(A) Las células C2C12wt y C2C12shVDR fueron tratadas con 1,25D (1 nM) durante 24 horas. Luego de los tratamientos se extrajo el ARN total, se retrotranscribió a ADNc y se cuantificó por qRT-PCR la cantidad de VDR de cada condición. Se muestran los valores promedios de $2^{-\Delta CT} \pm DS$. **(B)** Las células C2C12wt y C2C12shVDR fueron tratadas con 1,25D (1 nM) durante 18 y 24 horas. Los análisis de Western blot fueron llevados a cabo usando el anticuerpo anti-VDR. Las membranas fueron rehibridadas con anti-tubulina para asegurar la carga pareja de los geles. Se muestran inmunoblots representativos de tres experimentos independientes y cuantificaciones por escaneo densitométrico volumétrico de tres experimentos independientes que muestran la media $\pm DS$.

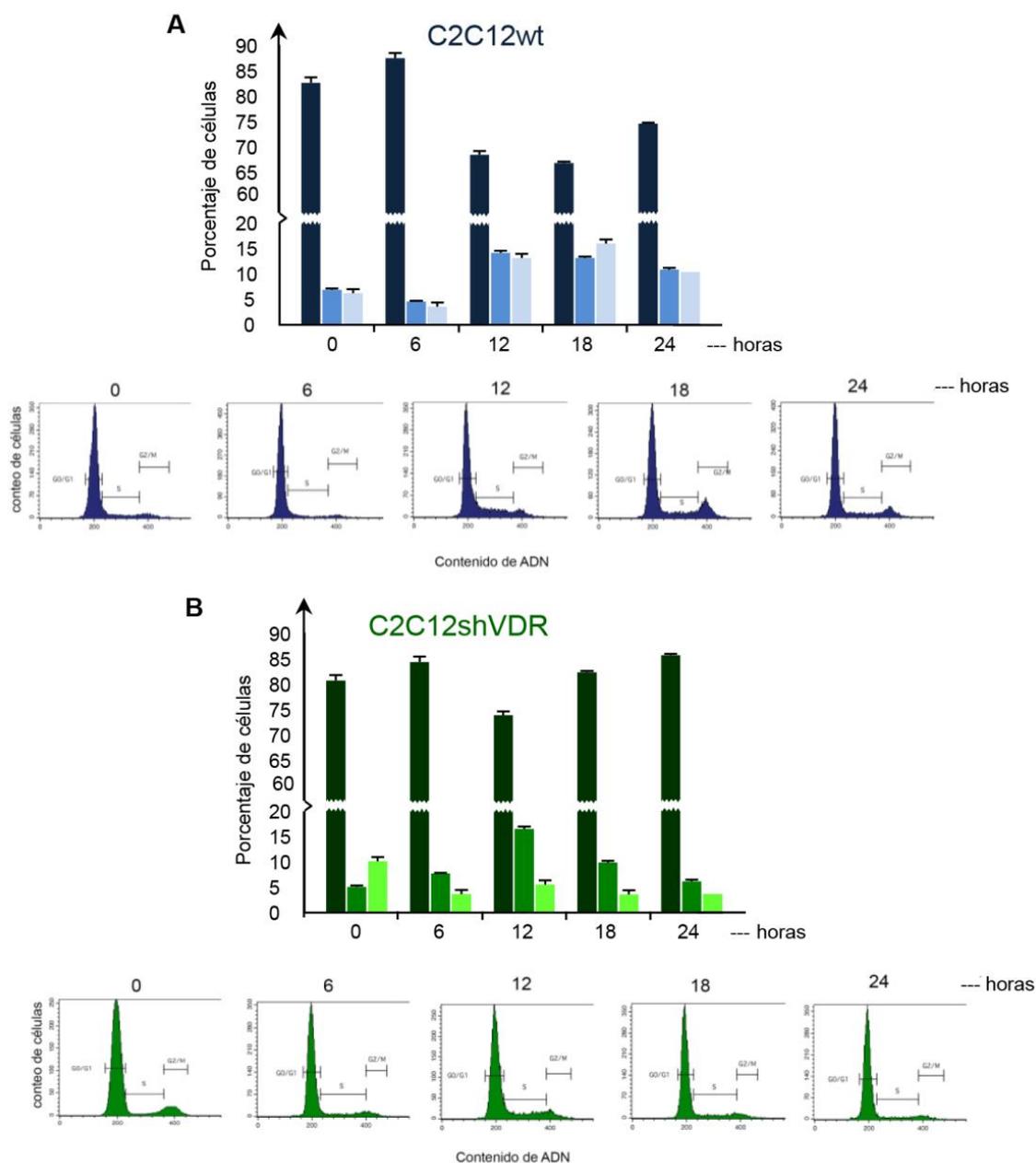
* $p < 0,05$ con respecto a su correspondiente control.

Progresión del ciclo celular en la línea C2C12 bajo el estímulo de suero fetal bovino (SFB)

Dado que se desconocía por completo el ciclo celular en la línea C2C12, para iniciar las investigaciones se consideró necesario caracterizar temporalmente el ciclo celular de las líneas celulares C2C12 wt y C2C12 $shVDR$ siguiendo el protocolo propuesto para células musculares lisas vasculares (Nakano et al. 2005). Para este fin, células sembradas y crecidas hasta alcanzar un 60 - 70 % de confluencia (durante 48 - 72 horas) fueron privadas de suero (*starved*) por 24 horas a fin de sincronizar los cultivos. A este tiempo, aproximadamente el 80 % de las células estaban arrestadas en la fase G0/G1 (Figura 2). Una vez sincronizados los cultivos, las células fueron estimuladas con 10 % SFB por diferentes tiempos (6, 12, 18, y 24 horas) y se analizó la cantidad de ADN mediante tinción y medición de IP por citometría de flujo.

En la Figura 2 se muestra que en ambas líneas, C2C12 wt (Figura 2- A) y C2C12 $shVDR$ (Figura 2 - B), aproximadamente el 90 % de las células estaban en la fase G0/G1 después de 6 horas de estímulo con suero; el ciclo celular progresa, de la fase G1 a S y luego tiene lugar un pico de fase S, que se observa a las 12 horas. Después de completar la fase S, se ve que aumenta la fase G2/M a las 18 horas. Una ronda completa del ciclo celular se completa a las 24 horas, cuando la mayoría de las células están nuevamente en fase G0/G1 y disminuye el porcentaje de células en fase S. Como era de esperar, este patrón de ciclo celular es similar tanto en C2C12 wt y C2C12 $shVDR$ que solo se estimularon con suero fetal bovino.

Figura 2: Distribución de las fases del ciclo celular en líneas C2C12 estimuladas con 10 % SFB.

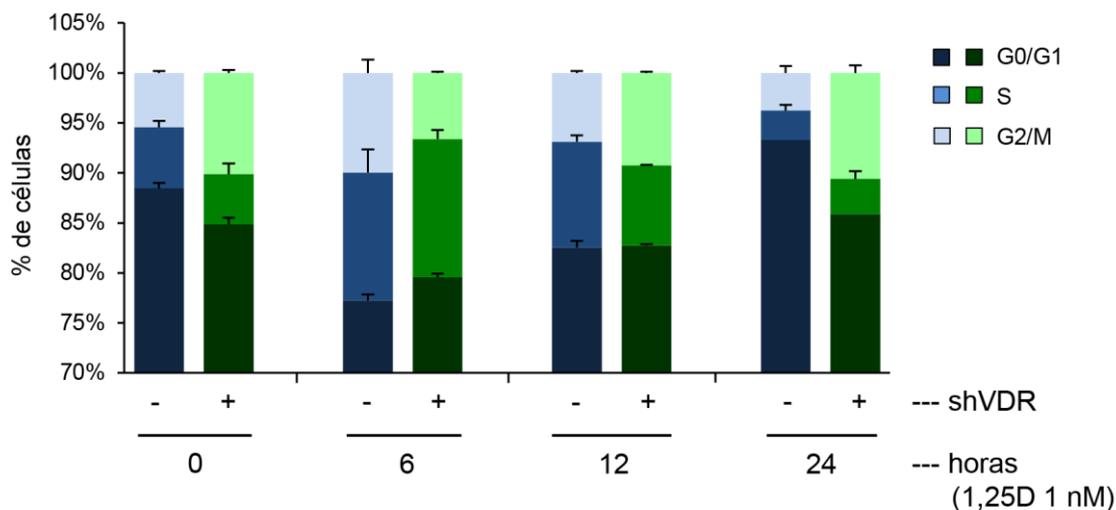


Progresión del ciclo celular de C2C12wt y C2C12shVDR después de la estimulación con suero. Tanto las células C2C12wt como las C2C12shVDR se mantuvieron “starved” por 24 horas y luego estimuladas con 10 % de SFB por 6, 12, 18 y 24 horas. A cada tiempo indicado, las células fueron tripsinizadas, marcadas con IP y el contenido de ADN fue medido por citometría de flujo. Se muestran los histogramas del contenido de ADN (abajo) y las cuantificaciones de cada fase del ciclo, en porcentaje, mostrando la media \pm el DS (arriba), de tres experimentos independientes, de las células C2C12wt (A) y C2C12shVDR (B).

Efectos del tratamiento con 1,25D de las células C2C12.

Se evaluaron los cambios en las fases del ciclo celular de las células C2C12wt y C2C12shVDR, estimuladas a diferentes tiempos con 1,25D y se estableció el rol del VDR en la distribución de los mioblastos en las diferentes fases del ciclo celular. Como se explica en la sección de Materiales y Métodos, las células sub-confluentes fueron sincronizadas mediante la depleción del suero del medio de cultivo durante 24 horas, y luego se las trató con 1,25D (1 nM) por 6, 12 y 24 horas, conservando a cada hora un lote de células tratadas solo con el vehículo de la hormona, etanol. Los análisis de medición de la cantidad de IP unido al ADN por citometría de flujo mostraron que en las células C2C12wt la hormona promueve un aumento del pico de fase S a las 12 horas. Esto fue seguido por una reclusión significativa de las células en la fase G0/G1 a las 24 horas (Figura 3). En los mioblastos C2C12shVDR, donde la expresión del VDR esta significativamente disminuida, los porcentajes de células en fase S a 12 horas fueron menores que en C2C12wt y se mantuvieron sin cambio a las 24 horas. Además, el número de células arrestadas en la fase G0/G1 a 24 horas era significativamente menor que en la línea C2C12wt que expresa el VDR (Figura 3). Estos resultados muestran por primera vez, que el VDR está involucrado en la modulación del ciclo celular que regula la hormona. Es importante resaltar además que estos resultados indican que el VDR es necesario para inducir el arresto de las células en la fase G0/G1 del ciclo celular, el cual es esencial para promover la diferenciación muscular.

Figura 3: Progresión del ciclo celular de C2C12 estimuladas con 1,25D, la expresión de VDR es clave.



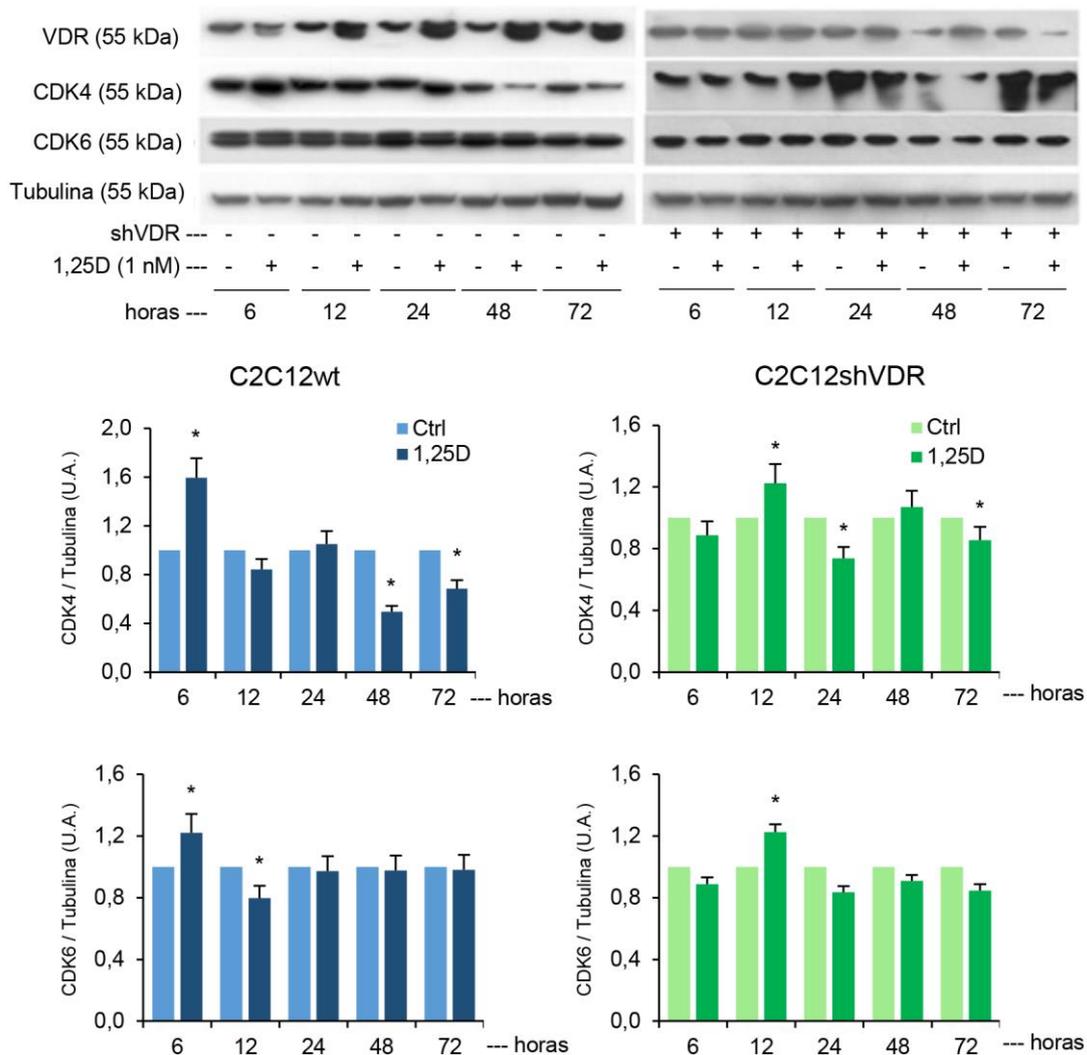
El tratamiento con 1,25D promueve una redistribución de células en las distintas fases del ciclo celular de manera dependiente del VDR. Las células C2C12wt y C2C12shVDR se privaron de suero durante 24 horas y luego se trataron con 1,25D (1 nM) durante 6, 12 y 24 horas. Antes de comenzar el tratamiento (señalado como 0 horas) y a cada tiempo indicado, las células se tripsinizaron, se tiñeron con IP y el contenido de ADN se midió mediante citometría de flujo, en tres experimentos independientes. Se muestra la cuantificación de los histogramas de ADN con porcentajes de células C2C12wt y C2C12shVDR en fases G0/G1, S y G2/M.

La hormona 1,25D modula la expresión de CDK 4/6 en células C2C12 de manera dependiente del VDR.

Las CDK 4/6 son proteínas esenciales para la progresión del ciclo celular en la etapa G1/S por su capacidad de unirse a las ciclinas D (Malumbres and Barbacid, 2009). Debido a la importancia de establecer el patrón de cambios en las CDK 4/6, tanto las células C2C12wt como las C2C12shVDR, ambas líneas celulares se estimularon con 1,25D o su vehículo durante diferentes tiempos (6 a 72 horas). Los resultados muestran que en células C2C12wt la hormona induce los niveles de CDK 4/6 a las 6 horas de tratamiento hormonal. Los niveles proteicos de CDK 4 regresaron a los niveles basales a las 12 y 24

horas de incubación con la hormona pero disminuyeron por debajo de los controles a las 48 y a las 72 horas, mostrando diferencias en el comportamiento de ambas CDKs a estos tiempos. En el caso de CDK 6, se observa que disminuyó su nivel a las 12 horas de estímulo hormonal y permaneció sin cambios respecto de sus valores basales tanto a las 24 horas, como a las 48 y 72 horas de exposición al 1,25D. La ausencia del VDR parece ser un factor importante en la expresión de las CDK 4/6. En las células C2C12*shVDR*, la hormona fue incapaz de inducir el aumento de CDK 4/6 a las 6 horas de tratamiento, sin embargo se observó un aumento de ambas CDKs a las 12 horas de incubación hormonal, mostrando que existe un retraso en la respuesta al 1,25D cuando está silenciado su receptor. CDK4 sufre una caída en sus niveles proteicos a 24 horas de exposición hormonal en células carentes del VDR, pero que es inferior al observado a las 48 horas de tratamiento en células C2C12*wt*. CDK6 no muestra cambios en sus niveles a 24, 48 y 72 horas de tratamiento hormonal en células que poseen silenciado el VDR, en forma similar a lo que se evidencia en células C2C12*wt*. Sin embargo, estos estudios evidencian el papel del VDR en la modulación de las CDK 4/6 durante el transcurso del ciclo celular y determinan que se requiere de la expresión del VDR para la inducción de las CDKs dependientes de 1,25D a las 6 horas de tratamiento (Figura 4).

Figura 4: El 1,25D aumenta los niveles de las CDK 4/6 de manera dependiente de la expresión del VDR, a 6 horas de tratamiento hormonal



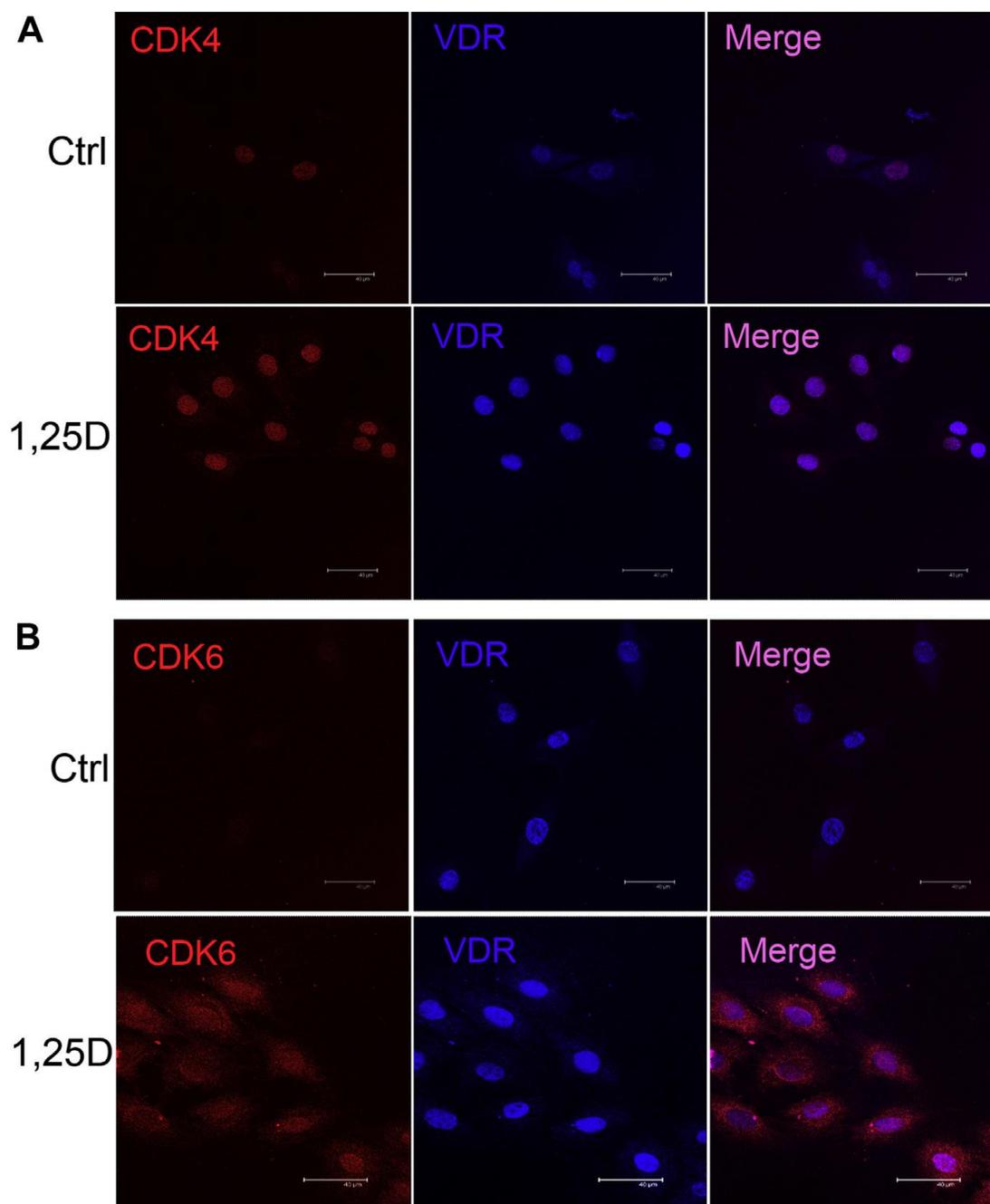
Las células C2C12wt y las C2C12shVDR fueron estimuladas con 1,25D (1 nM) o su vehículo por diferentes tiempos (6 – 72 horas). Los análisis Western blot fueron realizados usando los anticuerpos anti-VDR, anti-CDK4 y anti-CDK6. Las membranas fueron rehibridadas con anti-tubulina para corroborar la carga igualitaria de proteínas en las diferentes calles de los geles. (A). Blots representativos de tres experimentos independientes. (B) Cuantificaciones por escaneo densitométrico volumétrico de los blots de tres experimentos independientes, mostrando la media \pm SD de los niveles proteicos de las CDKs.

* $p < 0,05$ con respecto al control

Los niveles de CDK 4/6 inducidos por el 1,25D a las 6 horas de tratamiento también se evidenciaron por inmunocitoquímica

La información obtenida a partir de ensayos inmunocitoquímicos donde se tomaron micrografías en un microscopio confocal corroboran los resultados obtenidos por Western blot. Las imágenes muestran el aumento en los niveles de CDK 4/6 (evidenciados por un aumento en la cantidad de fluorescencia roja) y la expresión del VDR (evidenciada por el aumento en la cantidad de fluorescencia azul), en células C2C12 wt tratadas durante 6 horas con 1,25D. De relevancia, estas imágenes revelan una localización predominantemente nuclear de CDK 4 (Figura 5 - A) y una localización nuclear y perinuclear de la CDK 6 (Figura 5- B). Ninguna de las CDKs co-localiza con el VDR nuclear a estos tiempos de tratamiento hormonal. (Figura 5).

Figura 5: El tratamiento con 1,25D por 6 horas provoca un aumento en los niveles de las CDK 4/6.

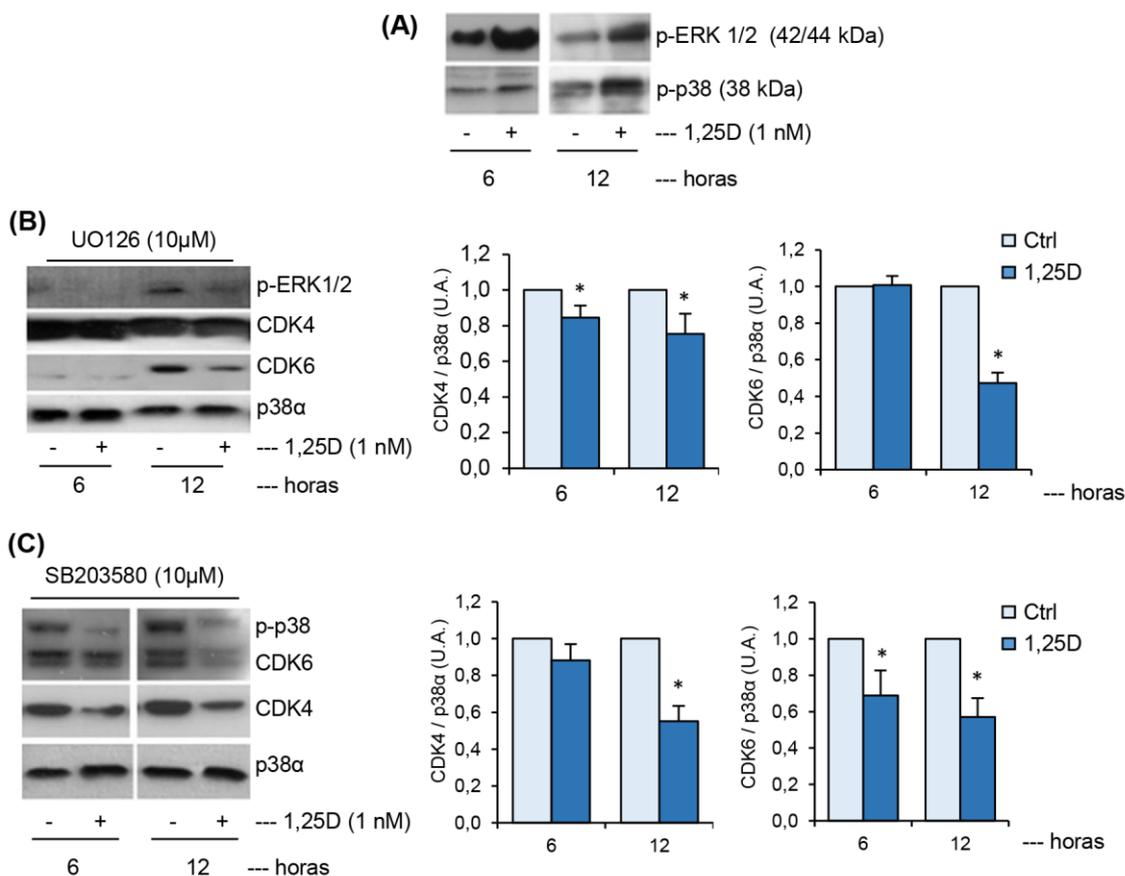


Las células C2C12wt tratadas con 1,25D (1 nM) o su vehículo (etanol 0,001 %) durante 6 horas fueron inmunomarcadas doblemente con anti-VDR y un anticuerpo secundario correspondiente conjugado a un fluoróforo (azul) y con anti-CDK4 (rojo, panel A) o anti-CDK6 (rojo, panel B) con un anticuerpo secundario correspondiente conjugado a un fluoróforo,. El lado derecho de cada panel representa las imágenes fusionadas (Merge). Se muestran imágenes representativas de diferentes campos de tres experimentos independientes.

ERK 1/2 y p38 MAPK participan en la regulación positiva de las CDK 4/6 dependiente de la hormona.

ERK 1/2 son miembros de las MAPKs directamente involucrados en la proliferación de las células de músculo esquelético. Previamente, se ha reportado la participación de ERK 1/2 en la expresión de las CDKs en células tumorales (Malumbres y Barbacid 2009). Pero se desconoce la relación entre ERK 1/2 y las CDKs mencionadas en células de músculo esquelético normal. Para determinar la participación de las MAPKs en la regulación de los niveles de las CDK 4/6, primeramente se evaluó la activación de ERK1/2 y p38 MAPK por la hormona a 6 y 12 horas de tratamiento en células C2C12wt. Se determinó que en las células C2C12wt, el 1,25D induce la fosforilación de ERK 1/2 y de p38 MAPK a 6 y a 12 horas de tratamiento siendo esto sinónimo de su activación y exitosamente se logró inhibir ambas MAPKs con el uso de inhibidores comerciales (Figura 6). Para evaluar el rol de ERK 1/2 en el aumento de la expresión de las CDKs por la hormona, se inhibió a ERK 1/2 con el uso del compuesto farmacológico UO126 (10 μ M). La inducción de ambas CDKs dependiente de la hormona que se observa a las 6 horas de tratamiento fue suprimida cuando ERK 1/2 estaban inhibidas, mostrando que estas MAPKs participan en la modulación de las CDK 4/6 dependiente de la hormona (Figura 6). Cuando la activación de las isoformas α y β de p38 MAPK fue suprimida con el uso del SB-203580 (10 μ M), los niveles proteicos de CDK 4/6 a 6 horas de tratamiento no aumentaron (Figura 6), mostrando también que esta MAPK también está involucrada en el efecto ejercido por el 1,25D en estas células.

Figura 6: ERK1/2 y las isoformas α y β p38 participan en la inducción de las CDK 4/6 dependiente de la hormona.



(A) Las células C2C12wt fueron estimuladas con 1,25D (1 nM) o su vehículo por 6 y 12 horas. El análisis Western blot se llevó a cabo utilizando los anticuerpos anti-p-p38 MAPK y anti-p-ERK 1/2, que solo reaccionan con estas quinasas activas.

(B) Las células C2C12wt fueron pre-incubadas con OU126, inhibidor de ERK 1/2 (10 μ M) por 30 - 40 minutos y luego tratadas con 1,25D (1 nM) o su vehículo (etanol) por 6 y 12 horas. Los análisis Western blot fueron realizados utilizando los anticuerpos anti-p-ERK 1/2, anti-CDK4, anti-CDK6 y anti-p38 α (este último para comprobar que la cantidad de proteína sembrada en cada calle del gel haya sido igual y para asegurarnos que no había cambios en la expresión de esta quinasa). Se muestran blots representativos y las cuantificaciones por escaneo densitométrico volumétrico que muestran la media \pm SD de tres experimentos independientes.

(C) Las células C2C12wt fueron pre-incubadas con SB-203580, inhibidor de las isoformas α y β (10 μ M) por 30 - 40 minutos y luego tratadas con 1,25D (1 nM) o su vehículo (etanol) por 6 y 12 horas. Los análisis Western blot fueron realizados utilizando los anticuerpos anti-p-p38 MAPK, anti-CDK4, anti-CDK6 y anti-p38 α . Se muestran blots representativos y las cuantificaciones por escaneo densitométrico volumétrico que muestran la media \pm SD de tres experimentos independientes.

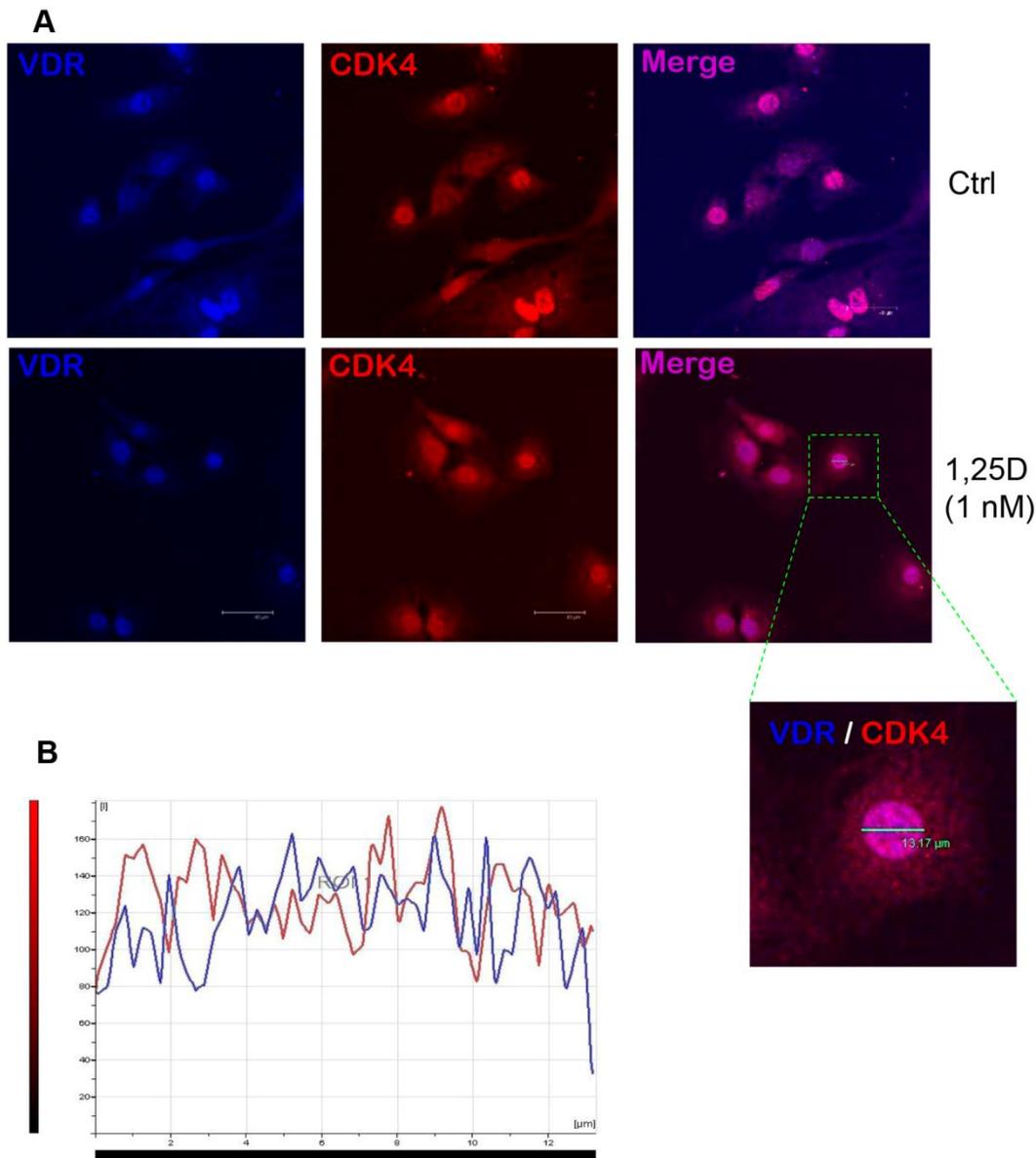
* $p < 0,05$ con respecto al control correspondiente.

CDK 4 co-localiza con el VDR en el núcleo celular después de 12 horas de tratamiento con 1,25D; mientras que CDK 6 aumenta su localización perinuclear en respuesta a la hormona.

Recordemos que CDK4 y CDK6 son quinasas dependientes de ciclinas que, uniéndose a las ciclinas del tipo D, regulan la progresión del ciclo celular. Jian y colaboradores describieron en otro tipo celular que la ciclina D3 interactúa con el VDR para regular su transcripción y que este evento es contrarrestado por cambios en la expresión de las CDK 4/6 (Jian et al. 2005). Habiendo evidenciado la co-localización entre el VDR y la ciclina D3, quisimos enfocar ahora nuestras investigaciones a la observación de la localización intracelular de CDK 4/6 en células musculares esqueléticas. Cuando las células C2C12 son estimuladas con 1,25D durante 12 horas, se determina por microscopía confocal que la hormona provoca que CDK 4 co-localice con el VDR en el interior del núcleo. Esto ha podido ser evidenciado por el color magenta formado por la fusión de los colores rojo y azul en la imagen fusionada (Figura 7 - A, *Merge*) y por el correspondiente histograma realizado cuantificando la intensidad de cada fluorescencia, punto a punto, sobre una línea determinada, según se ha explicado en Métodos (Figura 7 - B).

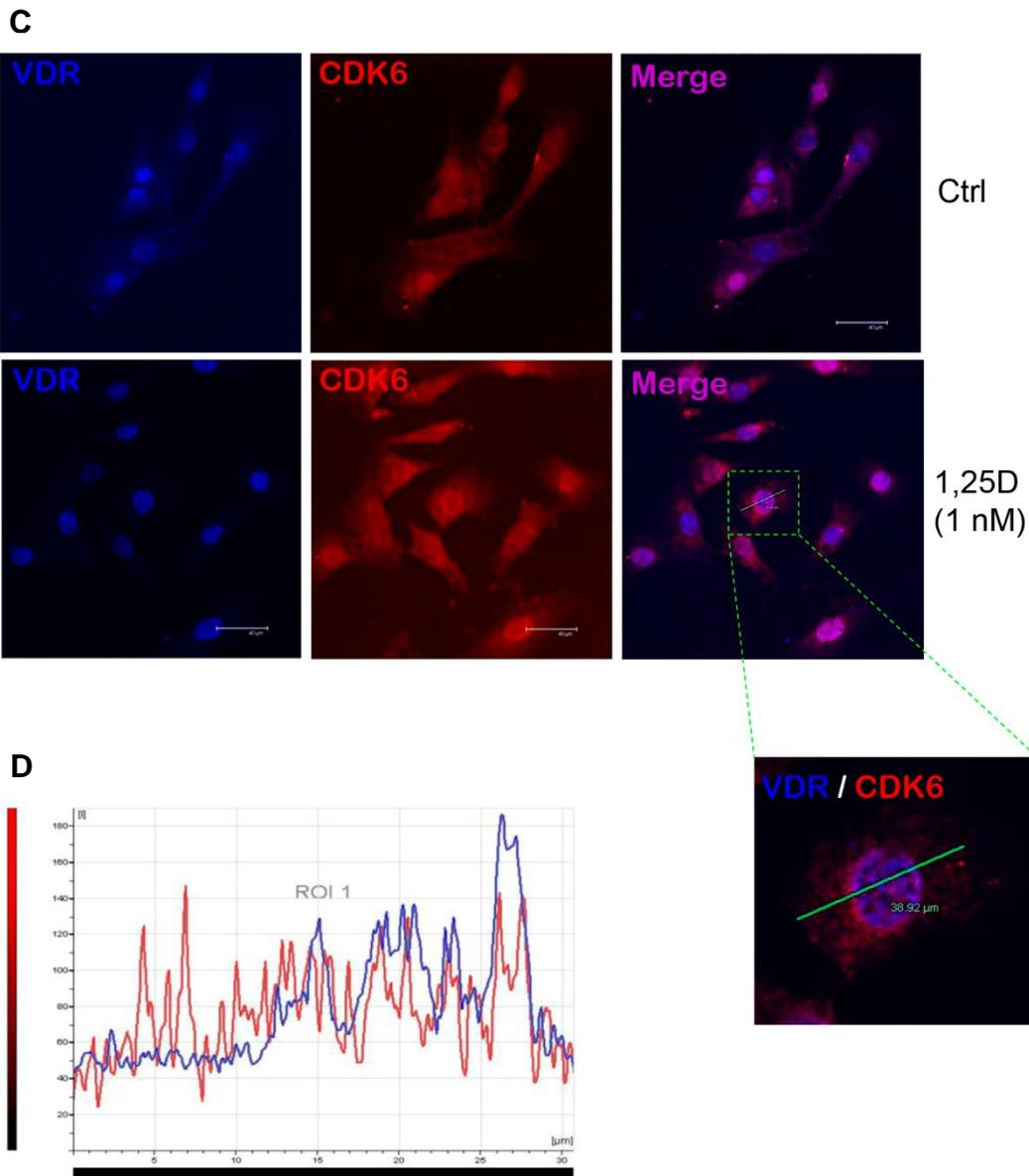
Al estudiar separadamente a la CDK 6, se determina la localización de CDK 6 formando un anillo perinuclear, inmediatamente por fuera del núcleo (evidenciado en color rojo) existente en condiciones basales (sin estímulo) pero que se muestra aumentado a las 12 horas de tratamiento con 1,25D (Figura 7 - C). El histograma correspondiente realizado sobre la línea que se muestra en la Figura 7 D, muestra que aproximadamente durante 12 μm del anillo perinuclear se determina la presencia de color rojo con la ausencia del azul, indicando que no hay co-localización de la CDK 6 con el VDR (Figura 7 - D).

Figura 7: Relación espacial entre las CDKs y el VDR



Las células C2C12wt se sembraron y crecieron sobre cubreobjetos y luego se las estimuló con 1,25D (1 nM) durante 12 horas. Se muestran las imágenes digitales fluorescentes obtenidas por microscopía confocal de las células C2C12wt incubadas con 1,25D (1 nM) o su vehículo (0,001 % de etanol) doblemente marcadas con **(A)** anti-CDK4/anti mouse-alexa fluor 647 (rojo) y anti-VDR/anti-rabbit-alexa fluor 488 (azul) **(B)** muestran un histograma de las imágenes fusionadas (Merge) representativo con las cuantificaciones de la intensidad de fluorescencia de cada color, punto a punto, a lo largo de la línea trazada (en verde) sobre la fotomicrografía. Las imágenes son representativas de diferentes campos de todos los cubreobjetos analizados, habiéndose realizado el

Continuación Figura 7: Relación espacial entre las CDKs y el VDR

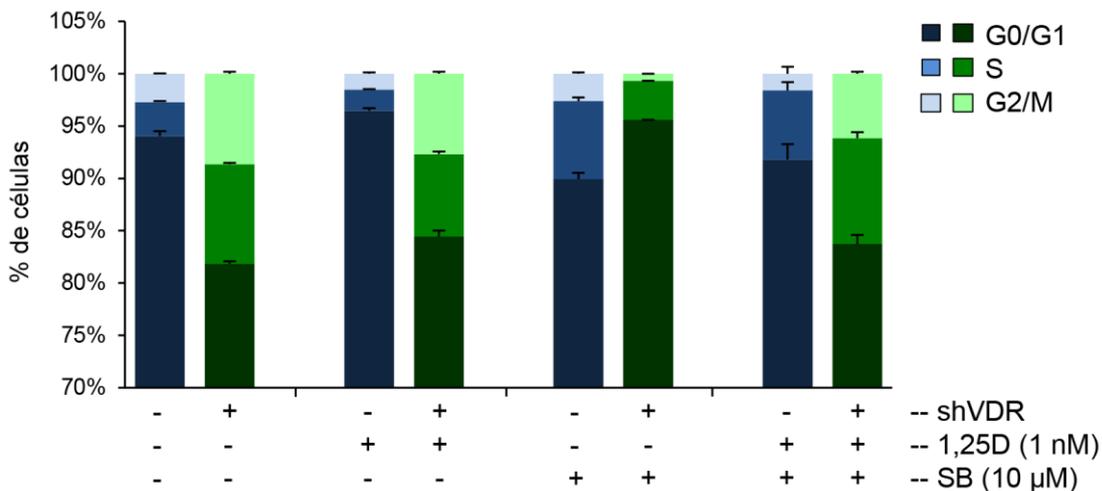


Las células C2C12wt se sembraron y crecieron sobre cubreobjetos y luego se las estimuló con 1,25D (1 nM) durante 12 horas. Se muestran las imágenes digitales fluorescentes obtenidas por microscopía confocal de las células C2C12wt incubadas con 1,25D (1 nM) o su vehículo (0,001 % de etanol) doblemente marcadas con **(C)** anti-CDK6/anti mouse-alexa fluor 647 (rojo) y anti-VDR/anti-rabbit-alexa fluor 488 (azul). **(D)** muestra un histograma de las imágenes fusionadas (Merge) representativo con las cuantificaciones de la intensidad de fluorescencia de cada color, punto a punto, a lo largo de la línea trazada (en verde) sobre la fotomicrografía. Las imágenes son representativas de diferentes campos de todos los cubreobjetos analizados, habiéndose realizado el experimento por

Participación de p38 MAPK en el ciclo celular de la línea C2C12wt y C2C12shVDR

La actividad del p38 MAPK es requerida en la salida de los mioblastos del ciclo celular que precede a la diferenciación muscular (Lee et al. 2002). La activación de las formas α y β de p38 MAPK promueven mayormente la diferenciación, mientras que la isoforma γ está involucrada en la proliferación celular (Lassar 2009). Por lo tanto, para establecer si la activación de p38 MAPK es un requisito en el arresto en la fase G0/G1 promovido por la hormona, investigamos los cambios en las fases del ciclo celular por citometría de flujo en presencia del inhibidor de las isoformas α y β de p38 MAPK, el SB-203580 (10 μ M), tanto en células C2C12wt como en células C2C12shVDR. En la Figura 8 se muestra que el arresto en fase G0/G1 inducido por el 1,25D a 24 horas en células *wild type* es suprimido cuando p38 MAPK es inhibida farmacológicamente, indicando que la vía de p38 MAPK está implicada en la regulación de la diferenciación muscular promovida por la hormona. Además, este efecto se acentúa en las células carentes de la expresión del VDR.

Figura 8: Modulación del arresto celular de células C2C12wt y C2C12shVDR estimuladas con 1,25D: la expresión de VDR y la activación de p38 MAPK son claves

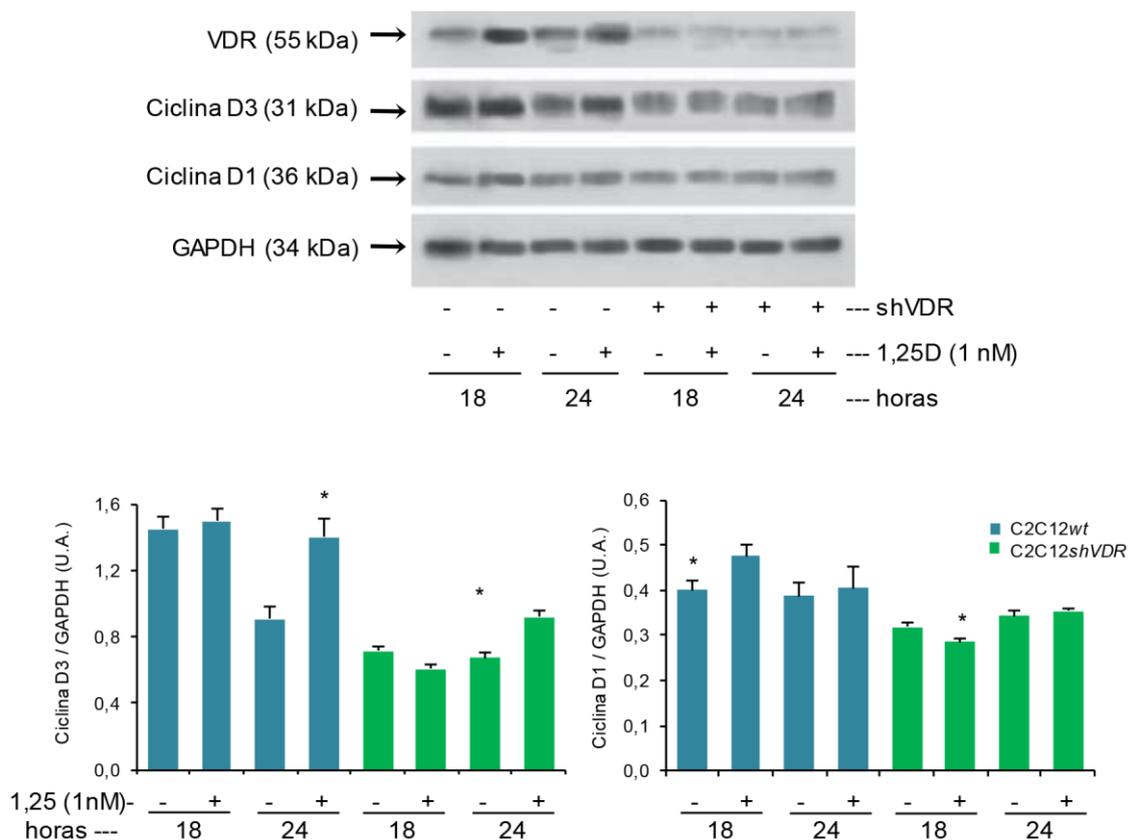


Las células C2C12wt y C2C12shVDR fueron privadas de suero durante 24 horas, preincubadas con 10 μM del compuesto SB-203580 (SB), y luego tratadas con 1,25D (1 nM) durante 24 horas. Las células se tripsinizaron, se tiñeron con IP y el contenido de ADN se midió por citometría de flujo, en tres experimentos independientes. Se muestra la cuantificación de los histogramas de ADN con los porcentajes de células C2C12wt y C2C12shVDR en las fases G0/G1, S y G2/M.

El VDR está implicado en los cambios de expresión de la ciclina D3 y ciclina D1 por estímulo hormonal

La expresión de la ciclina D1 declina en los mioblastos que están arrestados en la fase G0/G1, inducidos a la diferenciación, mientras que la expresión de la ciclina D3 es inducida tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional (Kiess, Gill y Hamel 1995). Se estudió la expresión de las ciclinas D1 y D3 en células C2C12*wt* y C2C12*shVDR* estimuladas con el 1,25D (1 nM). La Figura 9 muestra que la hormona aumenta el nivel de la ciclina D3 a nivel de proteína a las 24 horas de tratamiento mientras que no se observan cambios significativos en el nivel proteico de la ciclina D1 en las C2C12*wt*. Sí se observó un aumento en el nivel proteico de la ciclina D1 a 18 horas de tratamiento en las células C2C12*wt* que fue completamente revertido por el silenciamiento del VDR (células C2C12*shVDR*). El aumento observado en la ciclina D3 inducido por el 1,25D fue disminuído en las C2C12*shVDR*, indicando que el VDR es requerido en el aumento del nivel proteico de ciclina D3 inducido por 1,25D (Figura 9).

Figura 9: El VDR participa en la expresión de la Ciclina D3



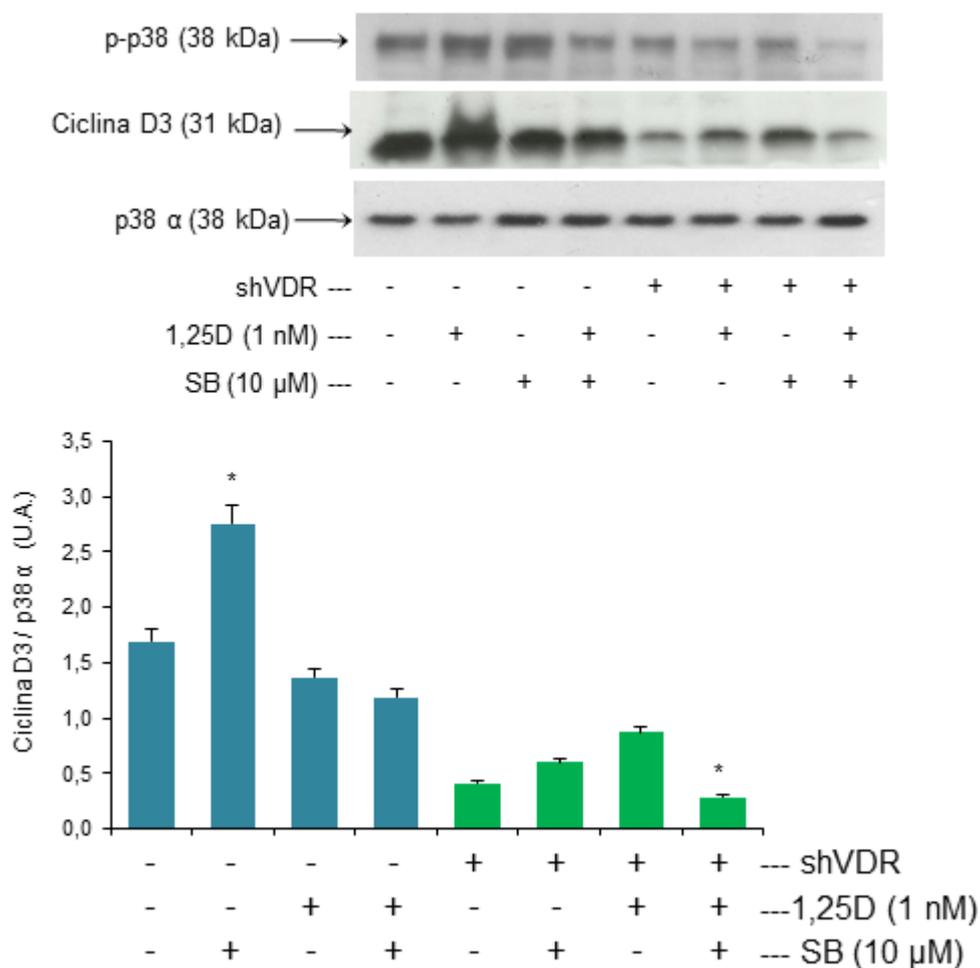
Las células C2C12wt y las C2C12shVDR fueron tratadas con 1,25D (1 nM) o su vehículo (0,001 % de etanol) por 18 y 24 horas. Los análisis Western Blot fueron llevados a cabo usando los anticuerpos anti-VDR, anti-ciclina D3 y anti-ciclina D1. Las membranas fueron rehibridadas con anti-GAPDH para asegurar la carga pareja de los geles. Se muestran Inmunoblots representativos de tres experimentos independientes y cuantificaciones por escaneo densitométrico volumétrico de tres experimentos independientes que muestran la media \pm DS.

* $p < 0,05$ con respecto a su correspondiente control.

Participación de p38 MAPK en el aumento en la expresión de la ciclina D3 promovido por el 1,25D

Siendo p38 MAPK una vía de señalización usada por el 1,25D en las células C2C12, también se investigó si la activación de p38 MAPK estaba involucrada en el aumento de la expresión de la ciclina D3. Los resultados revelan que el 1,25D activa a p38 MAPK a las 24 horas de tratamiento y este efecto es exitosamente eliminado con el uso del inhibidor SB-203580. Es de relevancia que los resultados muestran que el SB-203580 (10 μ M) inhibe completamente la expresión de la ciclina D3 inducida por la hormona a las 24 horas, aportando evidencia de que la expresión de esta ciclina es dependiente de la activación de p38 MAPK. Notablemente también puede observarse el patrón disminuido en la expresión de la ciclina D3 en células carentes de VDR (Figura 10).

Figura 10: Se requiere la activación de p38 MAPK para promover el aumento de la expresión de la ciclina D3



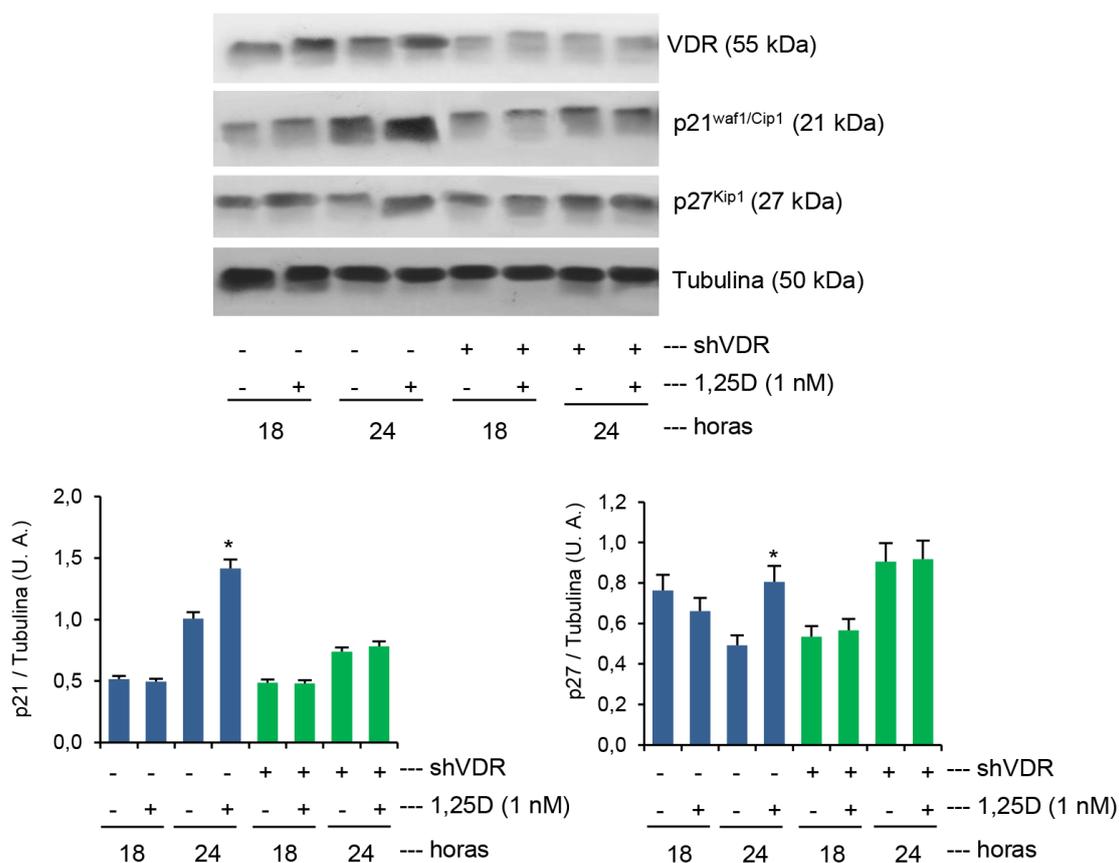
Las células C2C12wt y C2C12shVDR fueron pre-incubadas con SB-203580 (10 μM) y luego tratadas con 1,25D (1 nM) o su vehículo (etanol 0,001 %) por 24 horas. Los análisis Western Blot fueron llevados a cabo utilizando los anticuerpos anti-p-p38 MAPK (que solo reconoce la forma fosforilada y activa de p38 MAPK) y anti-ciclina D3. Las membranas fueron rehibridadas con anti-p38 α para asegurar la carga igualitaria de los geles. Se muestran Inmunoblots representativos de tres experimentos independientes y cuantificaciones por escaneo densitométrico volumétrico de tres experimentos independientes que muestran la media ± DS.

* $p < 0,05$ con respecto a su correspondiente control.

La inducción de los CKIs p21^{Waf1/Cip1} y p27^{Kip1} por el 1,25D es dependiente del VDR.

Los CKIs p21^{Waf1/Cip1} y p27^{Kip1} están sobre-expresados en mioblastos C2C12 que se retiran del ciclo celular y se comprometen en el proceso de diferenciación muscular (Andrés y Walsh 1996; Franklin y Xiong 1996). Por este motivo se investigó primeramente la acción del 1,25D sobre estos inhibidores y luego la participación del VDR en la expresión de los CKIs modulada por la hormona. Para ello, las células C2C12^{wt} y C2C12^{shVDR} se estimularon con 1,25D (1 nM) o su vehículo (etanol) durante 18 y 24 horas. En la Figura 11 se evidencia que no se detectaron cambios significativos en los niveles de CKIs a 18 horas de tratamiento con 1,25D ni en células C2C12^{wt} ni en la línea C2C12 carente de VDR. Sin embargo, la hormona aumenta marcadamente los niveles de los CKIs p21^{Waf1/Cip1} y p27^{Kip1} en las células C2C12^{wt} a las 24 horas de estimulación, tiempo que se corresponde con el arresto en fase G0/G1 y con el aumento en los niveles de la ciclina D3. Como era de esperar, los efectos del esteroide en ambos CKIs no se produjeron cuando la expresión del VDR estaba suprimida en células C2C12^{shVDR} (Figura 11). A modo de comentario, se observa que en células C2C12^{shVDR} la cantidad basal de p21^{Waf1/Cip1} y p27^{Kip1} es mayor a 24 que a 18 horas.

Figura 11: El aumento promovido por el 1,25D en CKI p21^{waf1/Cip1} y p27^{Kip1} es dependiente de VDR.

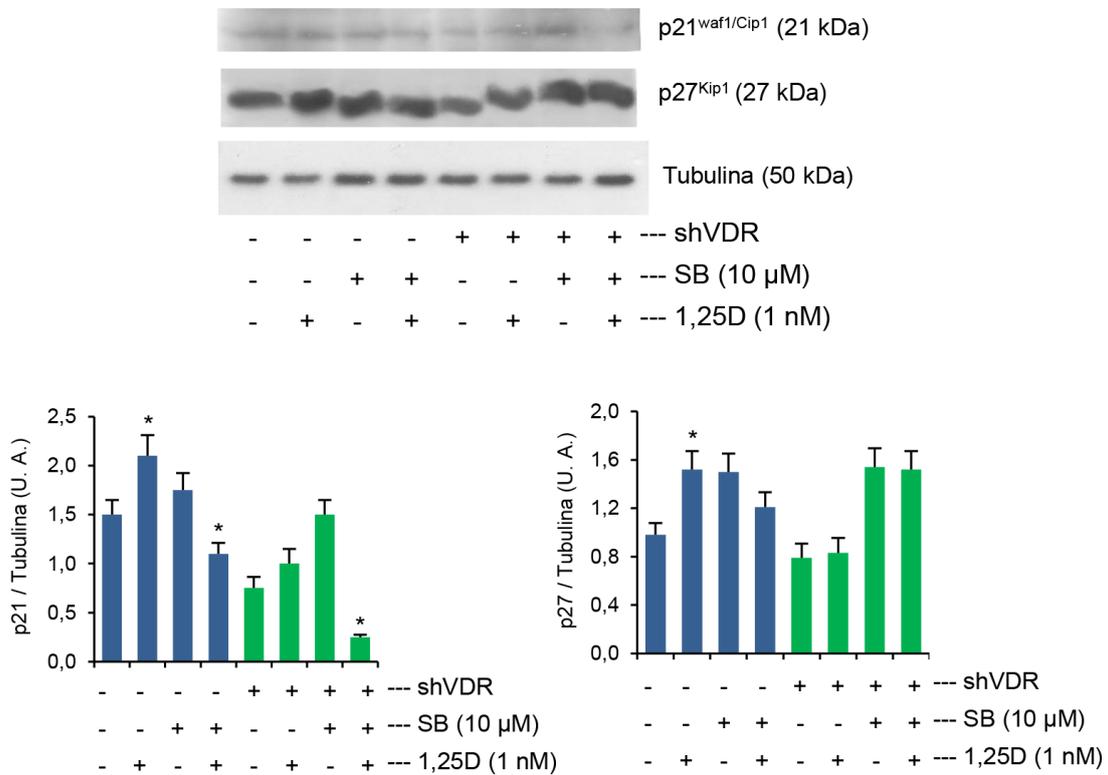


Las células C2C12wt y las C2C12shVDR fueron estimuladas con 1,25D (1 nM) o su vehículo (0,001 % de etanol) por 18 y 24 horas. Los análisis Western Blot fueron llevados a cabo usando los anticuerpos anti-VDR, anti-p21^{Waf1/Cip1} y anti-p27^{Kip1}. Las membranas fueron rehibridadas con anti-tubulina para asegurar la carga pareja de cada calle de los geles. Se muestran inmunoblots representativos de tres experimentos independientes y cuantificaciones por escaneo densitométrico volumétrico de tres experimentos independientes que muestran la media ± DS.

* $p < 0,05$ con respecto a su correspondiente control.

Tomando en cuenta resultados previos que indican la implicancia de p38 MAPK en la modulación del crecimiento celular (Miura et al. 2005; Kim et al. 2002), se investigó la participación del p38 MAPK en los efectos del 1,25D sobre la expresión de CKIs p21^{Waf1/Cip1} y p27^{Kip1}. Para poder estudiar el efecto de la p38 MAPK en la expresión de estos CKIs, las células C2C12^{wt} y C2C12^{shVDR} se incubaron con SB-203580 (10 µM) por 30-40 minutos previamente y durante el tratamiento con 1,25D (1 nM) o su vehículo (etanol 0,001 %) que fue durante 24 horas. El uso del inhibidor SB-203580 (10 µM) prueba que la activación de las isoformas α y β de p38 MAPK es requerida para el aumento en los niveles proteicos de los CKIs p21^{Waf1/Cip1} y p27^{Kip1} en respuesta a la hormona (Figura 12). El aumento de los CKIs p21^{Waf1/Cip1} y p27^{Kip1} durante el arresto de las células en la fase G0/G1 que resultó ser dependiente del VDR y de p38 MAPK apoya nuestra hipótesis de que el 1,25D induce la diferenciación celular a través del VDR y que también involucra la vía p38 MAPK en estos eventos. Como se observa en la Figura 12, los niveles del CKI p21^{waf1/Cip1} caen drásticamente en células donde está silenciado el VDR y al mismo tiempo está inhibida p38 MAPK. Sin embargo, el inhibidor SB no parece afectar a los niveles de p27^{Kip1} en células C2C12^{shVDR}.

Figura 12: El aumento promovido por el 1,25D durante 24 horas en los niveles de CKI p21^{waf1/Cip1} y p27^{Kip1} es dependiente de la activación de p38 MAPK



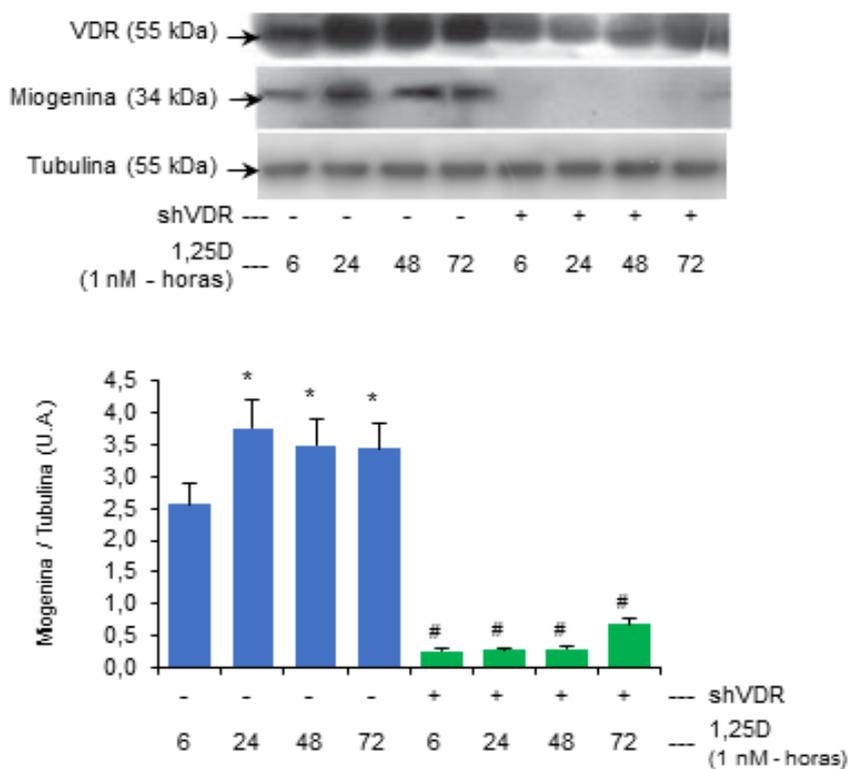
Las células C2C12wt y las C2C12shVDR fueron pre-incubadas con 10 μM de SB y estimuladas con 1,25D (1 nM) o su vehículo (0,001 % de etanol) por 24 horas. Los análisis Western Blot fueron llevados a cabo usando los anticuerpos anti-VDR, anti-p21^{Waf1/Cip1} y anti- p27^{Kip1}. Las membranas fueron rehibridadas con anti-tubulina para asegurar la carga pareja de cada calle de los geles. Se muestran inmunoblots representativos de tres experimentos independientes y cuantificaciones por escaneo densitométrico volumétrico de tres experimentos independientes que muestran la media ± DS.

* $n < 0.05$ con respecto a su correspondiente control.

El VDR y la quinasa p38 MAPK están involucrados en la expresión de miogenina promovida por el 1,25D en las células musculares C2C12

La expresión de la proteína miogenina es indispensable como uno de los primeros pasos de la diferenciación de mioblastos, el cual es seguido de un retiro de las células del ciclo celular (Andrés y Walsh 1996). Como el 1,25D promueve un arresto de las células C2C12 en la fase G0/G1, se investigaron los cambios en los niveles proteicos de miogenina a diferentes tiempos. En la Figura 13 se muestra que el 1,25D induce un marcado incremento en la expresión de miogenina a las 24 horas, el cual es todavía evidente a las 72 horas de tratamiento hormonal en C2C12 wt . Es importante considerar que los niveles de miogenina resultaron indetectables en las células C2C12 $shVDR$ en todos los tiempos estudiados, indicando que el VDR es absolutamente necesario para la síntesis de esta proteína dependiente de la hormona, que es marcadora del proceso de diferenciación temprana.

Figura 13: La expresión de miogenina es inducida por el 1,25D en el músculo esquelético solo cuando el VDR está expresado



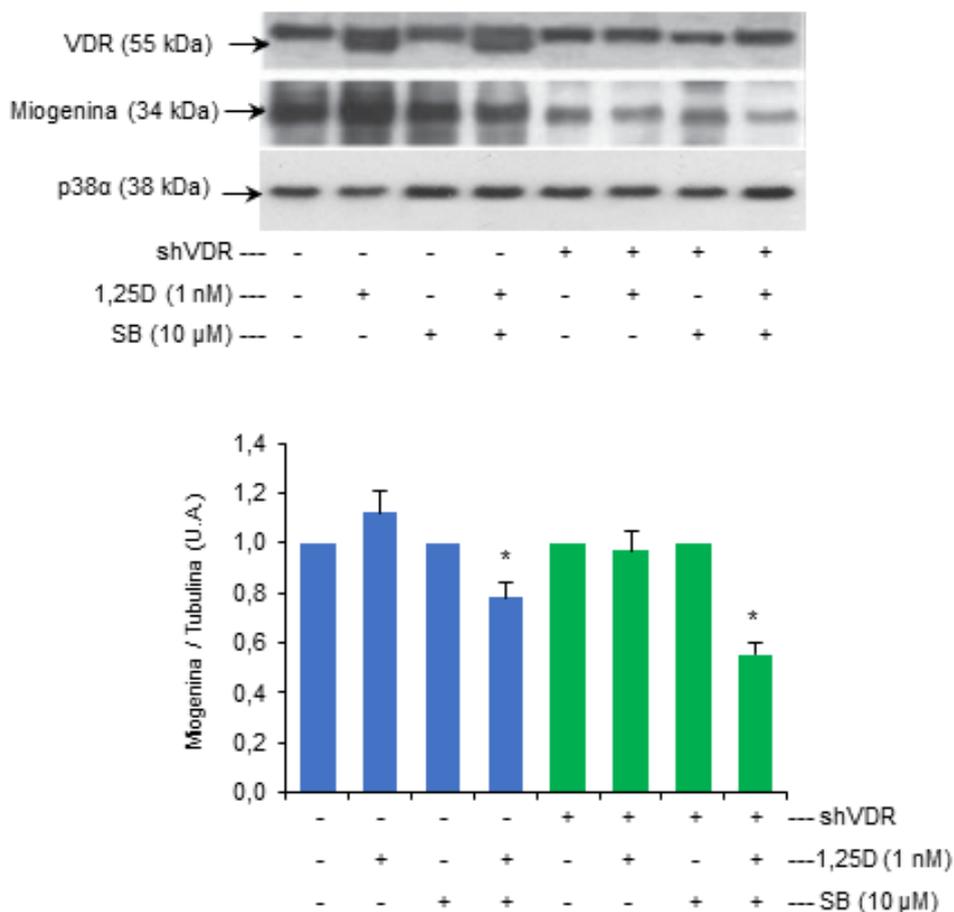
Células C2C12wt y C2C12shVDR fueron incubadas con 1,25D (1 nM) por 6, 24, 48 y 72 horas. Los análisis Western Blot se llevaron a cabo usando los anticuerpos anti-VDR y anti-miogenina. Las membranas fueron rehibridadas con el anticuerpo anti-tubulina para asegurar la carga igualitaria de proteínas en todas las calles de los geles. Se muestran blots representativos (izquierda) y las cuantificaciones por escaneo densitométrico volumétrico (derecha) que muestran la media \pm SD de tres experimentos independientes.

* $p < 0,05$ con respecto a 6 horas.

$p < 0,01$ con respecto al mismo tiempo en la línea C2C12wt

Durante la primera etapa de diferenciación de las células C2C12 es muy importante la participación de Akt activa y se conoce que Akt es activada por 1,25D vía p38 MAPK en este tipo celular (Buitrago, Arango y Boland 2012). Para completar estas investigaciones, se determinó la participación de p38 MAPK en los cambios de expresión de miogenina inducidos por la hormona. Se muestran resultados que indican que la expresión de miogenina inducida por el 1,25D es dependiente de la activación de p38 MAPK y que el silenciamiento del VDR potencia este efecto (Figura 14).

Figura 14. El aumento en la expresión del miogenina promovido por el estímulo hormonal requiere la activación de p38 MAPK



Las células C2C12wt y C2C12shVDR fueron preincubadas por 40 minutos con SB-203580 (10 μM) y luego estimuladas con 1,25D (1 nM) o su vehículo (etanol 0,001 %) por 24 horas. Los análisis Western Blot fueron realizados usando los anticuerpos anti-VDR, y anti-miogenina. Las membranas fueron rehibridadas con el anticuerpo anti-p38α para asegurar la carga igualitaria de los genes. En figuras anteriores se mostró que 10 μM de SB exitosamente inhibe la fosforilación de las isoformas α y β de p38 MAPK. Se muestran blots representativos y las cuantificaciones por escaneo densitométrico volumétrico que muestran la media ± SD de tres experimentos independientes.

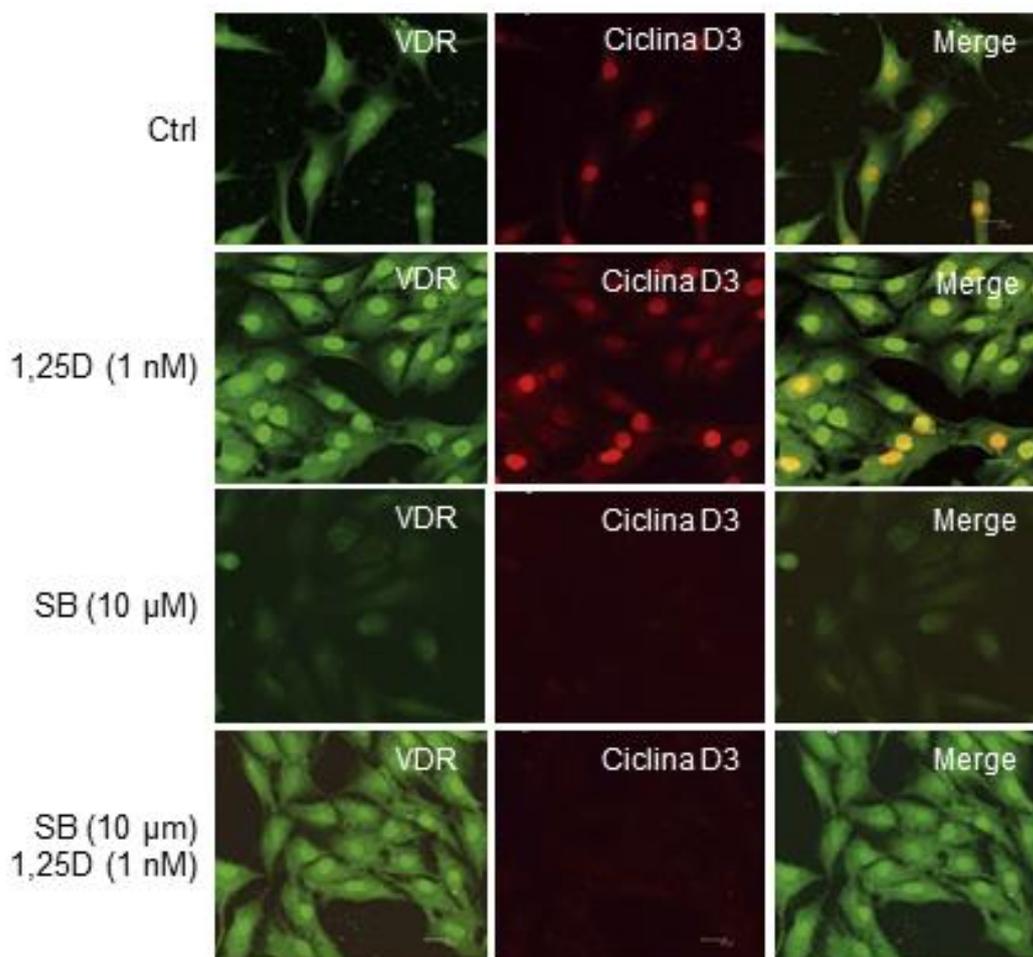
* $p < 0,05$ con respecto al control correspondiente.

Co-localización entre el VDR y la ciclina D3 en las células musculares C2C12:
participación de p38 MAPK

Como se describió previamente, parte de mi trabajo de esta Tesis Doctoral está enfocado a investigar el rol del VDR y de la p38 MAPK en la modulación del ciclo celular de células de músculo esquelético por la hormona 1,25D. Aquí se demostró que tanto la expresión del VDR como la activación de p38 MAPK son requeridas para la regulación positiva de la ciclina D3 dependiente del 1,25D en células C2C12 (Figura 9 y 10, respectivamente). En un solo trabajo científico previo a mis investigaciones, se reportó la interacción de la ciclina D3 con el VDR en otro modelo celular diferente a la línea C2C12 (Jian et al. 2005). Por esto, se consideró importante evaluar los posibles cambios en la localización intracelular del VDR y la ciclina D3 y la participación de p38 MAPK, en células C2C12. En mis investigaciones, se usó inmunocitoquímica con análisis de microscopía confocal para examinar la localización intracelular del VDR y de la ciclina D3 en células C2C12 comprometidas a la diferenciación. En C2C12*wt* estimuladas con 1,25D por 24 horas, las imágenes tomadas con un microscopio confocal confirman que la hormona induce la expresión del VDR y aumenta los niveles proteicos de la ciclina D3 (Figura 15), como ya se había mostrado en la Figura 1 y 9, respectivamente. En condiciones basales (sin estímulo de la hormona) no se detectó co-localización significativa entre la ciclina D3 y el receptor (Figura 15). Sin embargo, el tratamiento con 1,25D promueve la co-localización nuclear del VDR con la ciclina D3 y además una redistribución del VDR, que ahora se observa en la región cercana a la membrana nuclear (Figura 15). De relevancia, se observó que las células C2C12*wt* incubadas solamente con el inhibidor de las isoformas α y β de p38 MAPK, SB-203580, muestran tanto a la fluorescencia asociada al VDR como a la asociada a la ciclina D3 significativamente disminuida, confirmando que la activación de p38 MAPK es importante para lograr la expresión de VDR y de la ciclina D3, ya determinada en la Figura 6 (Figura 15). Aunque la estimulación de las células con 1,25D en conjunto con el tratamiento con el inhibidor de p38 MAPK, SB-203580, permite la expresión de VDR, su

distribución resultó ser diferente a la observada en las células estimuladas con la hormona únicamente (Figura 15). La exposición al 1,25D después de una pre-incubación con SB-203580 no promueve un aumento de los niveles proteicos de la ciclina D3, como se determinó en la Figura 6, y las imágenes fusionadas nos permiten concluir que la activación de p38 MAPK es requerida para generar la interacción entre VDR-ciclina D3 inducida por la hormona (Figura 15).

Figura 15: La co-localización del VDR y la ciclina D3 es dependiente de la activación de la p38 MAPK.

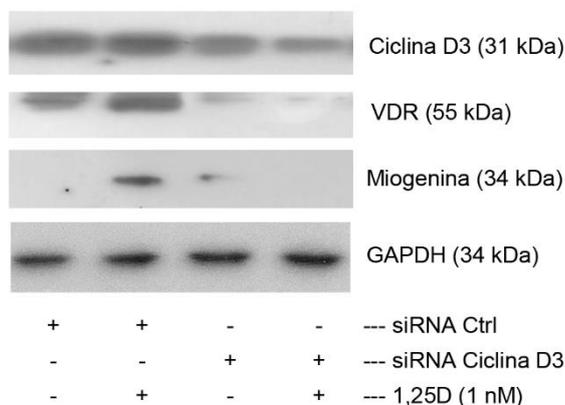


Las células C2C12wt fueron pre-incubada, o no, con SB-203580 (10 μ M) por 30 - 40 minutos, seguido del tratamiento con 1,25D (1 nM) o su vehículo por 24 horas. Luego fueron doblemente marcadas con los anticuerpos anti-VDR / anti-rabbit-alexa fluor 488 (verde) y anti-ciclina D3 / anti-mouse-alexa fluor 647 (rojo). El fenómeno de co-localización de ambas proteínas es evidenciado por la aparición de color amarillo-anaranjado en las micrografías fusionadas (denominadas Merge). Las micrografías mostradas son representativas de diferentes campos de tres experimentos independientes.

El silenciamiento de la ciclina D3 inhibe la expresión del VDR y el aumento de miogenina, provocados por el 1,25D en células de músculo esquelético

En vista del rol central de la ciclina D3 en el músculo esquelético y su estrecha relación con el VDR, se investigó por primera vez para cualquier tipo celular, si la ciclina D3 se relaciona con la expresión del VDR y la miogenina. Para lograr esto primeramente se obtuvo un siRNA adecuado que al transfectarse al interior de las células C2C12 pudiese suprimir la expresión de la ciclina D3 y un siRNA control que no afectara en absoluto la expresión de ninguna de las proteínas a analizar. Exitosamente se logró silenciar en un 60 % aproximadamente la expresión de la ciclina D3 usando este siRNA en células C2C12^{wt}, en un efecto transitorio. La Figura 16 muestra que el silenciamiento de la ciclina D3 provoca una disminución de la expresión del VDR así como también la inhibición total de la expresión de la miogenina inducida por el 1,25D a 24 horas de tratamiento y que la introducción al interior celular de un siRNA control no afecta la respuesta celular a la hormona.

Figura 16: El silenciamiento de la ciclina D3 afecta la expresión del VDR y de la miogenina en células musculares.



Las células C2C12wt fueron transfectadas con 50 pmol de siRNA dirigido contra el ARNm de la ciclina D3 o con siRNA control (Ctrl) durante 6 horas de acuerdo a las especificaciones del producto adquirido. Las células fueron incubadas por un período adicional de 18 horas en medio fresco hasta que los tratamientos fueron administrados por 24 horas (como se indicó previamente). Los análisis Western blot fueron llevados a cabo con los anticuerpos anti-ciclina D3, anti-VDR y anti-miogenina. Las membranas luego fueron rehibridadas con el anticuerpo anti-GAPDH para asegurar la carga igualitaria de los geles. Se muestran blots representativos de tres experimentos independientes.

Discusión

Las células C2C12 pertenecen a una línea celular murina mioblástica altamente miogénica que permanece en estado proliferativo al cultivarse en un medio conteniendo entre 10 y 20 % de SFB (denominado comúnmente “medio de crecimiento”). Estos mioblastos alcanzan la confluencia y si se realiza el cambio a MdD, este estímulo provoca que las células se elonguen, se vuelvan multinucleadas, se fusionen y finalmente se diferencien en miotubos (Florini, Ewton y Magri 1991). Previamente fue reportado que el 1,25D activa a la familia de las proteínas MAPK en los mioblastos C2C12 en cultivo e influye en la expresión de los genes tempranos que involucran la proliferación y la diferenciación muscular (Ronda et al. 2007). Se observó para las células C2C12 (en medio de crecimiento) que la incubación con 1,25D 10^{-7} M estimula la diferenciación a través de la inhibición de la

proliferación y la modulación de la expresión de factores de crecimiento promiogénicos y de la miostatina (Garcia et al. 2011). Sin embargo, estos resultados contradicen un reporte anterior que describe la regulación negativa del ARNm de la miogenina y de Myf5 en células C2C12 tratadas con 1,25D por 48 y 96 horas (Endo et al. 2003). Es altamente posible que las diferencias en los diseños y en las condiciones experimentales (es decir, los estados de sub-confluencia celular, los tiempos de privación de suero, los tiempos de tratamiento y las concentraciones del 1,25D, entre otros factores) sean las variables responsables de estos hallazgos contradictorios. Por otro lado, en otros trabajos previos, se indica que la adición de 1,25D en altas concentraciones (10^{-7} y 10^{-5} M) inhibiría la formación de miotubos y disminuiría la cantidad de ARNm que codifica para factores reguladores miogénicos claves (Ryan et al. 2013; Girgis, Clifton-Bligh, et al. 2013). En el laboratorio de Química Biológica de la Universidad Nacional del Sur, se demostró durante años la expresión del VDR en células de músculo esquelético y la inducción a la proliferación y a la diferenciación de mioblastos por acción del 1,25D (Zanello et al. 1997; Buitrago, Arango y Boland 2012). En este trabajo de Tesis Doctoral, se estudió el ciclo celular de la línea C2C12 y se obtuvo evidencia de que cambios en la expresión del VDR no afectan el progreso del ciclo celular cuando las células se encuentran bajo el estímulo de SFB. Sin embargo, al investigar cómo el 1,25D modulaba el ciclo celular, se observó que 10^{-9} M (1 nM) de esta hormona esteroide promueve un aumento en la fase S (a 12 horas) seguido de un arresto en la fase G0/G1 (a 24 horas) y que estos eventos disminuyen significativamente en las células que carecen de VDR, mostrando, por un lado, un efecto dual del 1,25D y por otro lado la dependencia del VDR en la respuesta biológica a la hormona. En vista de resultados previos, se esperaba que el pico del estadio proliferativo se observase a las 24 horas de tratamiento con 1,25D (Buitrago, Arango y Boland 2012). Sin embargo, mis investigaciones muestran reproduciblemente el pico en fase S de las células a 12 horas de tratamiento hormonal. Esta posible discrepancia se explica claramente por el hecho de que ahora las células estuvieron privadas de suero durante 24 horas, en lugar de solo las 2

horas reportadas previamente (Buitrago, Arango y Boland 2012). La inhibición de la proliferación por el 1,25D en los mioblastos crecidos en MdC también fue reportada previamente, donde además también se reafirma la expresión del VDR en las células C2C12 (Srikuea et al. 2012; Okuno et al. 2012), a pesar de la existencia de un trabajo científico que niega la existencia de este receptor en células de músculo esquelético (Wang y DeLuca 2011). También en 2011, Boland explica claramente que los niveles basales del VDR en células musculares son bajos y que es posible que sean indetectables bajo algunas condiciones experimentales (Boland 2011). Sin embargo, ya en el año 2002 se evidencia que el 1,25D no solo aumenta los niveles proteicos del VDR sino que provoca su “reverse trafficking” a la membrana plasmática (Capiati, Benassati y Boland 2002). Diez años más tarde, se reporta que la estimulación por 48 horas con 1,25D 10^{-8} M, aumenta la expresión del VDR y disminuye de manera significativa la proliferación celular (Srikuea et al. 2012) y que el tratamiento por 72 horas con 1,25D 10^{-8} M provoca un aumento de la cantidad de células en la fase G0/G1 (Okuno et al. 2012). De relevancia, en el año 2013 se reporta que tratamientos por 4 y 6 horas con 1,25D provocan un aumento en los niveles proteicos del VDR en células C2C12 (Buitrago, Pardo y Boland 2013) y mis investigaciones evidencian que la hormona induce un aumento tanto a nivel de la proteína como a nivel del ARNm del VDR a 18 y 24 horas de estímulo en estas mismas células.

Como parte de la señalización intracelular necesaria para la miogénesis, la activación de las formas α y β de p38 MAPK han sido reportadas como promotoras de la diferenciación, mientras que la isoforma γ está involucrada en la proliferación celular (Lassar 2009). Por otro lado, ya hace casi dos décadas se evidenció que las isoformas α y β de p38 MAPK están implicadas en el arresto celular en fase G0/G1 que es un evento promotor de la diferenciación de las células C2C12 (Wu et al. 2000). Mis investigaciones demuestran que las isoformas α y β de p38 MAPK participan en el arresto en la fase G0/G1 de estas células que es promovido por el 1,25D y dependiente de la expresión del VDR. De acuerdo

con esta información, se ha mostrado previamente que la activación de p38 MAPK resulta en un arresto en la fase G1 y la subsecuente diferenciación celular (Puri et al. 2000).

Para comenzar los estudios sobre las proteínas involucradas en el ciclo celular, se indagó si el 1,25D afectaba los niveles de las ciclinas D1 y D3. En el caso especial de los mioblastos, se ha reportado un aumento en los niveles de la ciclina D3 acompañados de una disminución en la ciclina D1, cuando están comprometidos a diferenciarse (Rao y Kohtz 1995). En el caso de las células C2C12, un aumento en los niveles proteicos de la ciclina D3 promueve la diferenciación miogénica (Gurung y Parnaik 2012) y además se encuentra aumentada en células que están en diferenciación (Kiess, Gill y Hamel 1995). Esto concuerda con los reportes aquí presentados que muestran en la Figura 5 un incremento en los niveles de la ciclina D3 inducidos por el 1,25D a 24 horas de tratamiento. Sin embargo, en los resultados que aquí son presentados no se observan cambios significativos en los niveles proteicos de ciclina D1 en células C2C12 estimuladas con 1,25D durante el arresto celular pro-diferenciativo. El hecho de que la hormona promueve un arresto en la fase G0/G1 de mioblastos C2C12 sin cambios en la expresión de la proteína ciclina D1 indicaría que no se requiere esta proteína en particular para llevar a cabo las acciones de esta hormona y de ningún modo se contradice con observaciones previas realizadas por otros colegas. De relevancia la modulación de ambas ciclinas D resultó dependiente de la expresión del VDR. Dado que la diferenciación de las células precursoras de músculo esquelético está siempre acompañada por un aumento en la expresión de la ciclina D3 (De Santa et al. 2007; Gurung y Parnaik 2012; Kiess, Gill y Hamel 1995) como observamos en las células C2C12^{wt}, proponemos que el arresto en fase G0/G1, dependiente de VDR y p38 MAPK es un evento promotor de diferenciación.

Ha sido reportado anteriormente que la ciclina D3 interactúa con el VDR, regulando su actividad transcripcional, y que el VDR activado por su ligando específico, el 1,25D, induce a una acumulación de la ciclina D3 en la región nuclear, aunque el trabajo es acotado a solo una dosis hormonal y no se registra ningún otro reporte congruente hasta la

fecha (Jian et al. 2005). Como fue mencionado en este trabajo de Tesis, se han obtenido evidencias de que la expresión del VDR inducida por la hormona es suprimida cuando la ciclina D3 se encuentra silenciada por un siRNA. La ciclina D3 es un gen *target* corriente abajo de p38 MAPK en células hepáticas (Sun et al. 2013); en células C2C12 la evidencia ha sido obtenida mediante el silenciamiento de isoformas específicas de p38 MAPK que afectaron a la expresión de la ciclina D3 (Wang et al. 2008). Es de relevancia la evidencia de la participación de p38 MAPK en la expresión de la ciclina D3 inducida por la hormona, que es presentada aquí por primera vez para células musculares. Además, los resultados evidencian que el 1,25D induce la co-localización entre el VDR y la ciclina D3 de manera dependiente de la activación de p38 MAPK.

En las células leucémicas se demostró que un análogo del 1,25D induce una detención del ciclo celular en fase G1, acompañado de la disminución en la expresión de las CDK 4/6 (Yoon et al. 2008). Otro reporte muestra que otro análogo del 1,25D, el EB1089, actúa como un inhibidor de la proliferación donde los niveles de las CDK 4/6 disminuyen en células NCI-H929 (Park et al. 2002). Aquí se ha evidenciado que el 1,25D (10^{-9} M) aumenta los niveles proteicos de las CDK 4/6 a las 6 horas de tratamiento, de acuerdo con la fase S de ciclo celular anteriormente observado. Este efecto sólo se observó a las 6 horas. Mientras que 12 y 24 horas de estimulación no mostraron cambios en los niveles proteicos de CDK 4 inducidos por la hormona. La caída de CDK 4 a las 48 y 72 horas coincide con el avance del proceso de diferenciación. En cambio el comportamiento de la CDK 6 es diferente, ya que aumentó a las 6 horas de tratamiento con 1,25D y disminuyó sus niveles a las 12 horas de estimulación hormonal, sin mostrar cambios significativos a las 24, 48 y 72 horas. Es de importancia resaltar que en las células que carecen de VDR (C2C12shVDR) la hormona no fue capaz de regular la expresión de las CDK 4/6 a las 6 horas, ni provocar los aumentos estadísticamente significativos observados en las C2C12wt a las 12 horas de tratamiento. Los resultados muestran que se requiere este receptor para aumentar los niveles proteicos de CDK 4/6 durante la proliferación. Por todo esto se sugiere que las CDK

4/6 son parte del mecanismo por el cual la hormona regula la proliferación celular en este tipo de tejido. Los datos aquí presentados evidencian además la intervención de ERK 1/2 en la expresión de las CDK 4/6 durante la proliferación celular, así como fuera descrita para otros tipos celulares (Malumbres y Barbacid 2009) y la participación de p38 MAPK en los cambios de expresión de las CDKs mencionadas también se ha evidenciado en otro tipo celular (Calvo et al. 2014). Se evidencia que el tratamiento con la hormona (en este estado de proliferación) permite la interacción entre VDR y CDK 4 para regular su actividad transcripcional, tal vez de forma similar a como lo hace con la ciclina D3, y previamente se reportó que esta interacción neutraliza la interacción del VDR con la ciclina D3 (Jian et al. 2005). En conjunto, los resultados presentados en este trabajo muestran que el VDR, ERK 1/2 y p38 MAPK están implicados en la inducción de los niveles proteicos de las CDK 4/6 por el 1,25D a las 6 horas de tratamiento. El 1,25D modula la localización intracelular de las CDKs y promueve la co-localización de la CDK 4 y del VDR, tal vez como un modo de regular la actividad transcripcional de este receptor hormonal.

Tanto el p21^{Waf1/Cip1} como el p27^{Kip1} son CKIs, sin embargo cada uno tiene acciones específicas durante el proceso de diferenciación miogénica (el-Deiry et al. 1994; Guo et al. 1995). La inducción de la expresión del CKI p27^{Kip1} es un paso crítico temprano de la señalización dependiente de N-cadherina quien está involucrada en la miogénesis, mostrando un rol activo de este CKI en la decisión de los mioblastos a diferenciarse (Messina et al. 2005). Es de relevancia que cuando los mioblastos C2C12 comienzan a expresar los CKIs, p21^{Waf1/Cip1} (Andrés y Walsh 1996) y p27^{Kip1} (Franklin y Xiong 1996), se retiran del ciclo celular y se determinan en la diferenciación de células musculares maduras. En los estudios de esta Tesis, se mostró que el 1,25D aumenta los niveles proteicos de los CKIs p21^{Waf1/Cip1} y p27^{Kip1} durante el arresto en fase G0/G1 y de manera dependiente de la activación de p38 MAPK y de la expresión del VDR. De acuerdo con estos resultados, se ha demostrado previamente que el 1,25D regula positivamente los CKIs p21^{Waf1/Cip1} y p27^{Kip1} (Verlinden et al. 1998) y, más interesante, se ha descrito al gen del CKI p21^{Waf1/Cip1} como un

target transcripcional del VDR (Freedman 1999), con un VDRE funcional ubicado en su promotor (Liu et al. 1996). En células musculares lisas vasculares, la actividad de p38 MAPK media la transcripción del gen del CKI p21^{waf1/Cip1} (Moon, Jung y Kim 2004). Sin embargo, la participación de p38 MAPK en la expresión del CKI p21^{waf1/Cip1} inducida por la hormona, no había sido previamente reportada y hasta hoy, este resultado es inédito. Con respecto al CKI p27^{Kip1}, se conoce que el VDR funciona como el componente de transactivación del complejo VDR-Sp1 que dispara la expresión de su gen (Cheng et al. 2006). Además, la regulación positiva del CKI p27^{Kip1} que genera el tratamiento con el 1,25D, es bloqueada por el inhibidor de p38 MAPK (Miura et al. 2005), en forma análoga a mis resultados. En forma similar a lo mencionado para el CKI p21^{waf1/Cip1}, los resultados presentados en esta Tesis doctoral, son los primeros reportes que muestran que el 1,25D induce al CKI p27^{Kip1} con la necesaria activación de p38 MAPK.

La regulación de la diferenciación de mioblastos aviares por 1,25D fue descrita por primera vez en nuestro laboratorio (Capiati, Téllez-Iñón y Boland 1999). Más tarde, fue demostrado que el VDR era necesario para el normal desarrollo del músculo esquelético y la correcta expresión de factores de transcripción mioregulatorios en ratones y en células murinas (Endo et al. 2003), Además, previamente se demostró que la hormona induce la expresión de MHC y la miogenina en los estadios tempranos de la diferenciación de células C2C12 cultivadas en MdD (Buitrago, Arango y Boland 2012). La presencia de miogenina asegura la expresión de MHC y modula el subsecuente desarrollo del miotubo, demostrando que la miogenina actúa más temprano en la determinación de la diferenciación de mioblastos (Davie et al. 2007). En este trabajo, hemos podido demostrar que el 1,25D induce un mantenido aumento en la expresión de miogenina de células C2C12^{wt}, mientras que los niveles proteicos de miogenina permanecen indetectables en las células C2C12^{shVDR}, al igual que cuando la p38 MAPK está inhibida, reafirmando el rol determinante que tiene el VDR y la p38 MAPK en la diferenciación muscular llevada a cabo por el 1,25D. Además, se evidenció que en células C2C12 transfectadas con un siRNA

contra el ARNm de la ciclina D3, la expresión de la miogenina es suprimida. Esto muestra claramente que el comienzo del programa de diferenciación inducido por el 1,25D en células C2C12, requiere de la expresión del VDR y de la activación de p38 MAPK. Sin embargo, en mioblastos C2.7 deficientes de ciclina D3, los cambios en la expresión de miogenina no pudieron determinarse (De Luca et al. 2013). Esto podría explicarse dadas las diferencias en los diseños experimentales (como el uso de un MdD para el crecimiento y el abordaje experimental) o, quizás, de otras vías de señalización que no están reguladas por el 1,25D y que están involucradas en la expresión de la miogenina.

Conclusiones

La acción de la hormona esteroide 1,25D en la proliferación y diferenciación de células de músculo esquelético antes reportada (Buitrago, Arango y Boland 2012) ha sido exitosamente confirmada y ampliada en las investigaciones de esta Tesis Doctoral. En el comienzo del proceso de diferenciación de las células C2C12 inducido por el tratamiento con el 1,25D es evidente que el VDR y la p38 MAPK están significativamente involucrados ya que conducen a un arresto de las células en la fase G0/G1, acompañado de un aumento en la expresión de la ciclina D3 y de los CKIs, p21^{waf1/Cip1} y p27^{kip1}. Además, el 1,25D promueve la colocalización del VDR y la ciclina D3 en forma dependiente de la activación de la p38 MAPK, y esta ciclina es necesaria para la inducción de la expresión del VDR y la proteína miogenina inducida por el 1,25D. Estos hallazgos avanzan en la elucidación de los mecanismos por los cuales la hormona desencadena la diferenciación de los mioblastos, los cuales suman en sus conocidos efectos sobre el crecimiento y la regeneración del músculo esquelético, pero sin duda gracias a estas investigaciones se ve revelando un importante rol del VDR y de la p38 MAPK en las acciones fisiológicas del 1,25D en el músculo esquelético normal.

Además, los resultados presentados en este trabajo muestran que el VDR, ERK 1/2 y p38 MAPK están implicados en la inducción de los niveles proteicos de las CDK 4/6 dependiente de la hormona. El 1,25D modula la localización intracelular diferencial de las

CDK 4/6 y promueve la colocación del VDR con CDK 4, probablemente con el objetivo de regular la actividad transcripcional del receptor hormonal.

Resumen

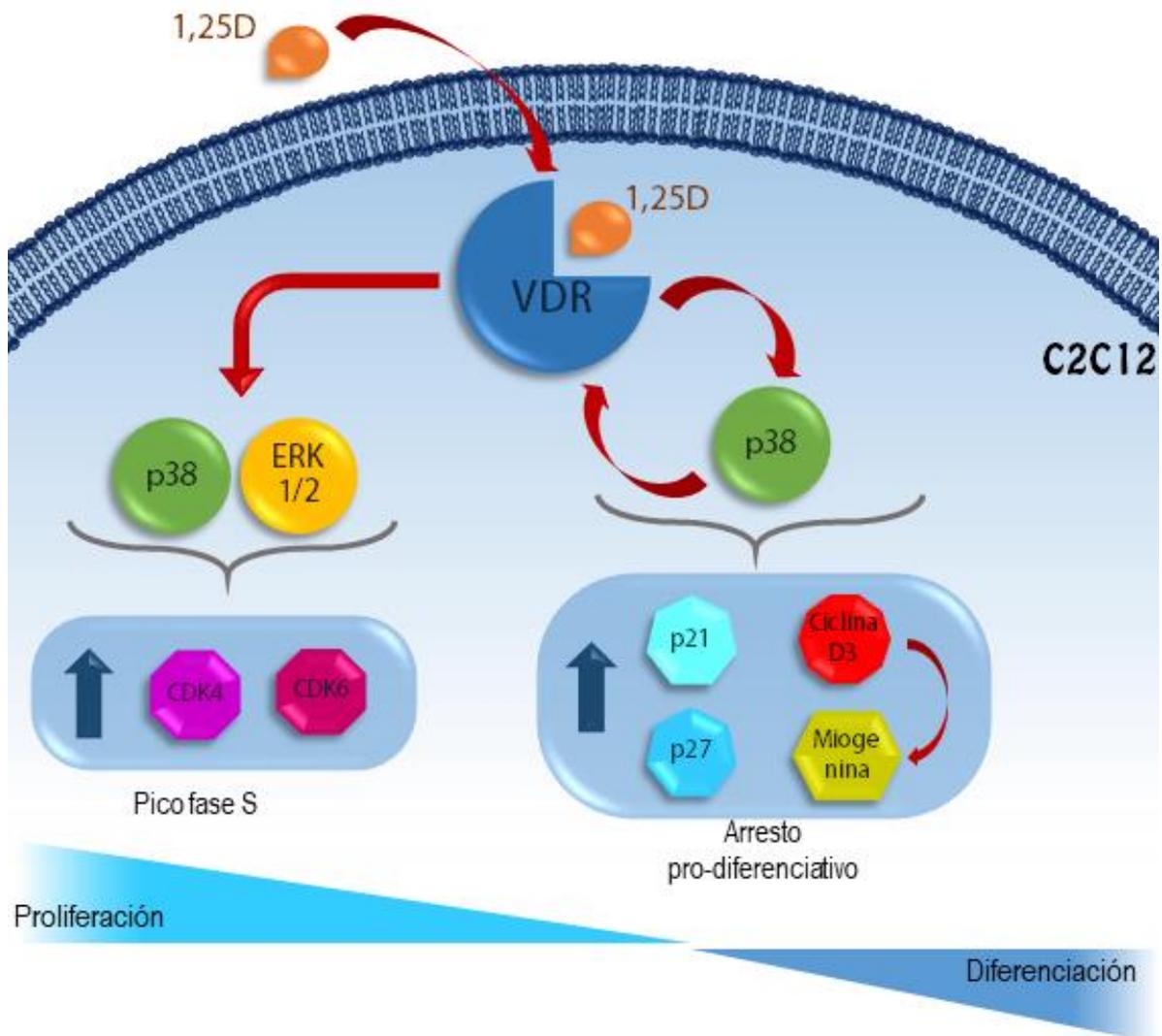
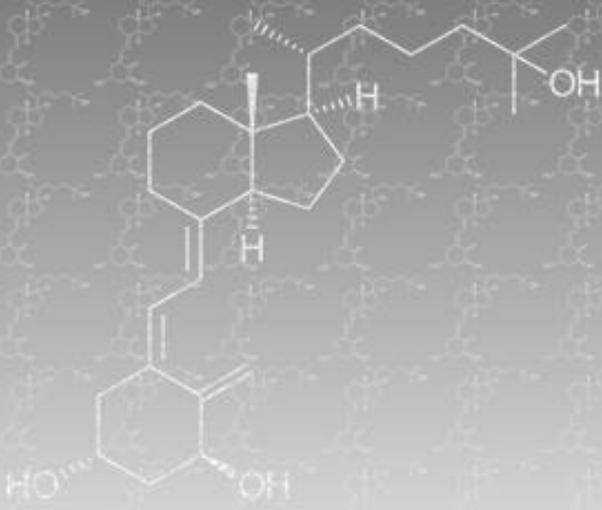


Ilustración 15. Resumen del Capítulo I. Durante la fase proliferativa, el tratamiento con 1,25D promueve la expresión del VDR y la activación de la p38 MAPK y ERK 1/2, que promueven la expresión de las CDK 4/6. Más tarde, durante el arresto promotor de diferenciación, iniciado por el 1,25D, la expresión del VDR y la activación de la p38 MAPK son esenciales para promover el aumento en la expresión de la ciclina D3, de los CKIs p21 y p27, y del marcador de diferenciación muscular miogenina, el cual también necesita que la ciclina D3 se exprese.



Capítulo II

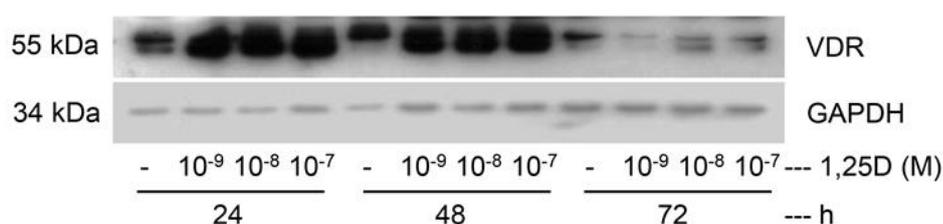
Rol del 1,25D en el ciclo celular de células musculares esqueléticas transformadas.

Resultados

Expresión del VDR en células RD.

Shabahang y colaboradores reportaron la expresión del VDR en células de RMS diferentes a la línea celular RD (Shabahang et al. 1996) y años después se reportó la expresión del VDR en cultivo celular primario de RMS embrionario (Uhmann et al. 2012). Sin embargo no existen otras investigaciones y nunca ha sido reportada la expresión de VDR en células RD. Dado que el cultivo de células RD son uno de mis modelos experimentales, se consideró absolutamente necesario evaluar la expresión de VDR en células RD, tanto en su estado basal (sin tratamiento) como estimuladas con diferentes dosis de 1,25D. Para ello se expuso a las células RD al tratamiento con 1,25D (1, 10 y 100 nM) por diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) y su vehículo etanol y se evidenció que las células RD expresan VDR en condición basal y que el tratamiento hormonal induce un aumento en la expresión de este receptor a 24 y 48 horas. Además, el tratamiento con la hormona durante 72 horas disminuye la expresión del VDR y esta reducción es más pronunciada cuando las células son tratadas con 1 nM de 1,25D (Figura 17).

Figura 17. Las células RD expresan VDR.

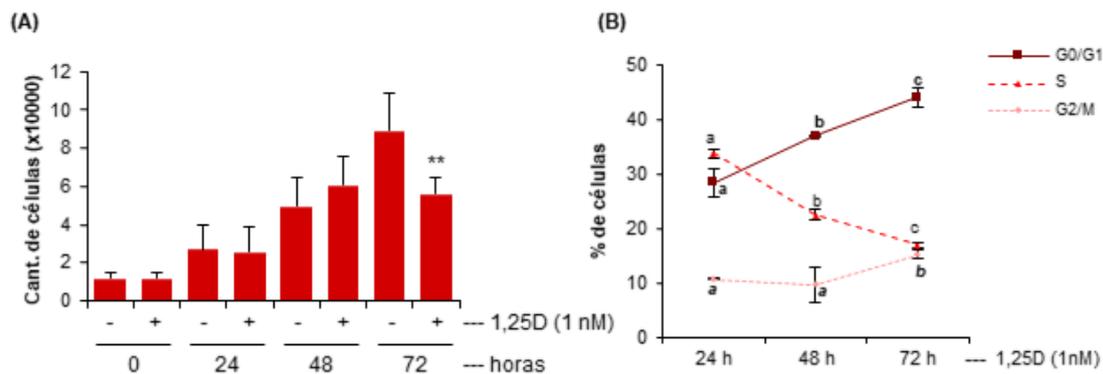


Las células RD fueron estimuladas con 1,25D (1, 10 y 100 nM) o su vehículo (etanol al 0,001 %) por 24, 48 y 72 horas. Los análisis Western Blot fueron llevados a cabo con el anticuerpo anti-VDR. Las membranas fueron rehibridadas con el anticuerpo anti-GAPDH para asegurar la carga igualitaria de los geles. Se muestran los inmunoblots representativos de tres experimentos independientes.

El tratamiento con 1,25D inhibe la proliferación de las células.

Conociendo el desempeño del receptor en este tipo celular, a continuación se evaluó la cantidad de células viables durante el tratamiento hormonal. Usando la tinción de azul de Tripán se evidenció que no existen diferencias significativas en la cantidad de células viables entre los controles (etanol 0,001 %) y los tratamientos a 24 y 48 horas. Además en este resultado se puede observar que las células RD duplican su población cada 24 horas. Sin embargo, a las 72 horas de tratamiento con 1,25D (1 nM) la cantidad de células vivas disminuye significativamente en un 37,2 % (8933 ± 677 células en la condición control vs 5600 ± 312 células en el tratamiento con 1,25D) (Figura 18 - A). A la luz de estos resultados se analizó la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular por marcación con IP y citometría de flujo. Estos resultados muestran claramente una disminución en el porcentaje de las células en fase S a las 48 y 72 horas de tratamiento hormonal, siendo este último tiempo el que presenta el menor porcentaje de células en fase S analizada. De acuerdo con esto, la fase G0/G1 aumenta a las 48 horas y muestra un pico a las 72 horas de tratamiento. Curiosamente, se observa un aumento significativo del porcentaje de células en fase G2/M a las 72 horas de tratamiento (Figura 18 - B).

Figura 18: Las células RD se arrestan a las 72 horas de tratamiento con 1,25D

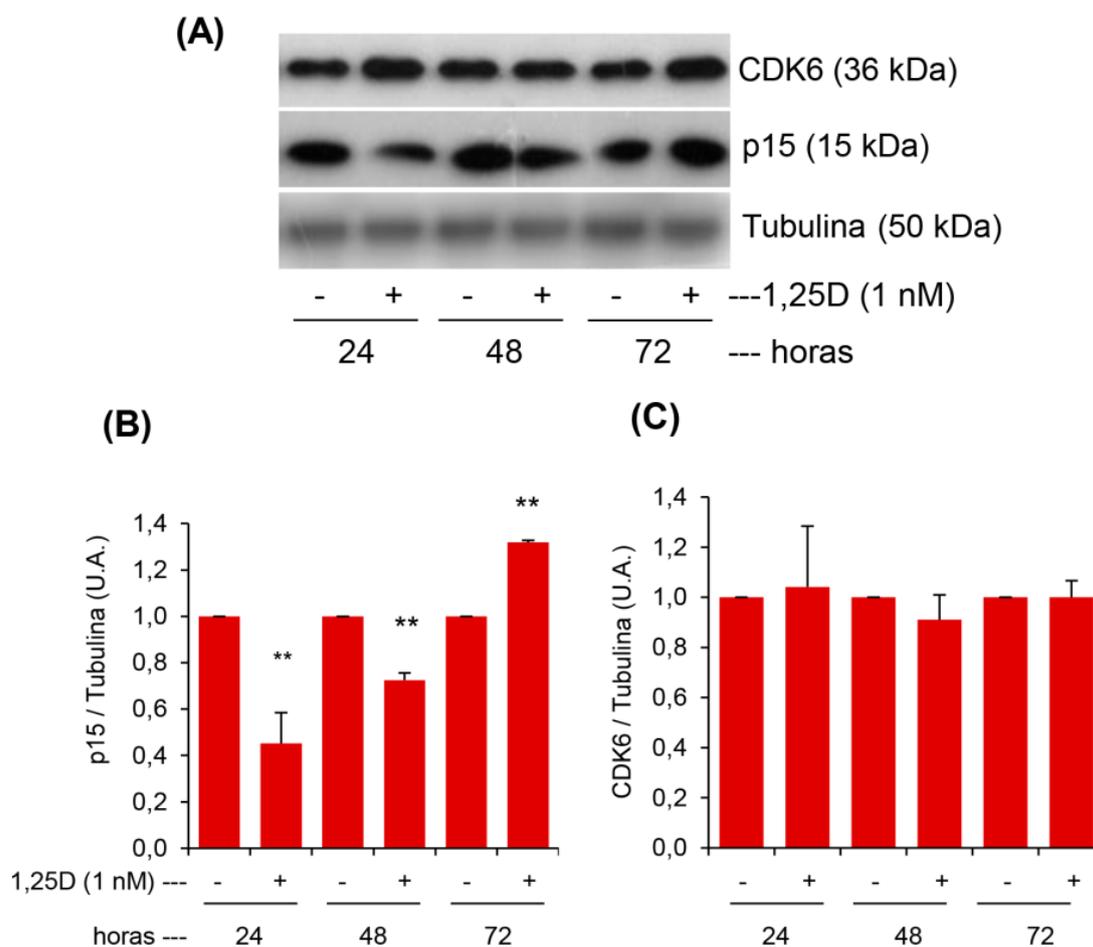


Las células RD fueron estimuladas por el 1,25D (1 nM) o su vehículo (0,001 %) por 24, 48 y 72 horas. **A.** el tratamiento con 1,25D reduce el número de células vivas a las 72 horas. Las células muertas fueron marcadas con el colorante azul de Tripán, y se contaron las células vivas usando una cámara de Neubauer. ** $p < 0,01$. **B.** Distribución de las células RD en las diferentes fases del ciclo celular. El ciclo celular fue analizado por marcación con IP y citometría de flujo. a,b,c = $p < 0,001$.

La hormona provoca cambios en la expresión de proteínas claves en la detención del ciclo celular en células RD.

Aunque los resultados previamente expuestos mostraban sin duda que la hormona no promueve la proliferación de las células RD, se analizó la expresión de dos proteínas importantes relacionadas al estado de proliferación: el CKI $p15^{INK4b}$ y la CDK6. Entre los mecanismos de inhibición del crecimiento, es muy conocido el aumento de la expresión de $p15^{INK4b}$ (Krimpenfort et al. 2007). Por otro lado, esta reportado que los niveles de CDK6 se mantienen relativamente estables durante el ciclo celular (Duronio y Xiong 2013). Cuando analizamos el desempeño de $p15^{INK4b}$ en estas células, se evidenció que su expresión disminuye significativamente a las 72 horas de estímulo hormonal (Figura 19.B) y, como se esperaba, la expresión de la CDK6 no mostró ningún cambio (Figura 19.C). Estos resultados muestran una inhibición de la proliferación inducida por el tratamiento hormonal.

Figura 19: Cambios en la expresión del CKI p15^{INK4b} y de CDK6 en células RD



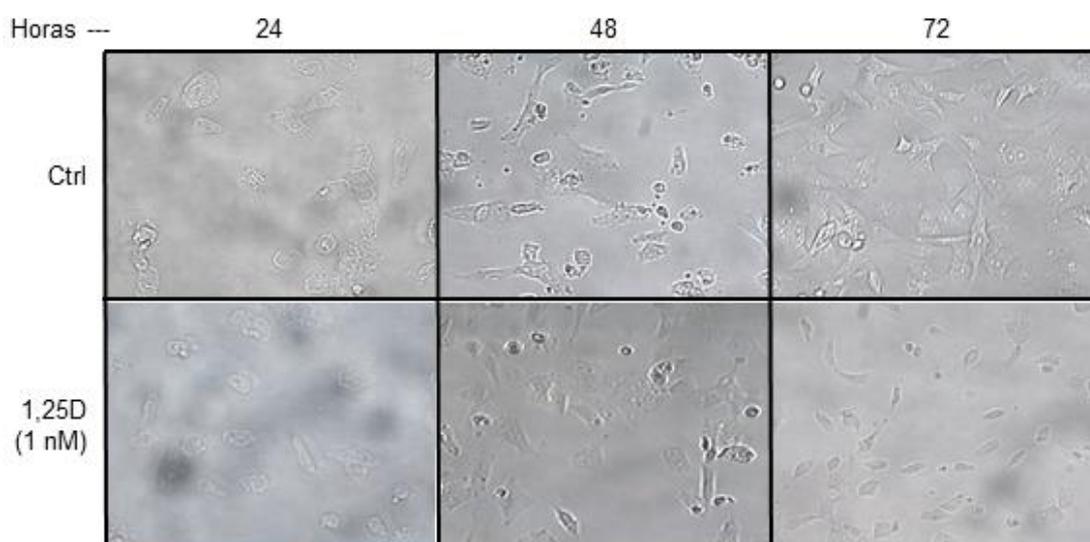
Las células RD fueron estimuladas por el 1,25D (1 nM) o su vehículo (0,001 %) por 24, 48 y 72 horas. Los análisis Western Blot fueron llevados a cabo con los anticuerpos anti-p15^{INK4b} y anti-CDK6. Las membranas fueron rehibridadas con el anticuerpo anti-GAPDH para asegurar la carga igualitaria de los geles. Se muestran los inmunoblots representativos **(A)** y las cuantificaciones de p15^{INK4b} **(B)** y CDK6 **(C)** de tres experimentos independientes.

El tratamiento con 1,25D no provoca cambios en la morfología de las células RD

Dado los cambios morfológicos que sufren los mioblastos durante la diferenciación a miotubos multinucleados, se consideró necesario realizar un seguimiento de observación de la morfología de las células RD tanto en estado basal como durante diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) de estimulación hormonal (1 nM). Como se puede observar en la Figura 20 las células durante todo momento presentan una morfología poligonal con un único

núcleo redondo central y tamaño adecuado y ninguno de los tiempos ni tratamientos provoca cambios morfológicos detectables en un microscopio óptico de contraste de fase. Si se destaca que a 72 horas de tratamiento con la hormona se puede observar una notoria disminución en la cantidad de las células adheridas, resultado que concuerda con los ensayos de viabilidad celular presentados anteriormente, y que en general son de tamaño más pequeño.

Figura 204. Seguimiento de la morfología de las células RD estimuladas con 1,25D o su vehículo



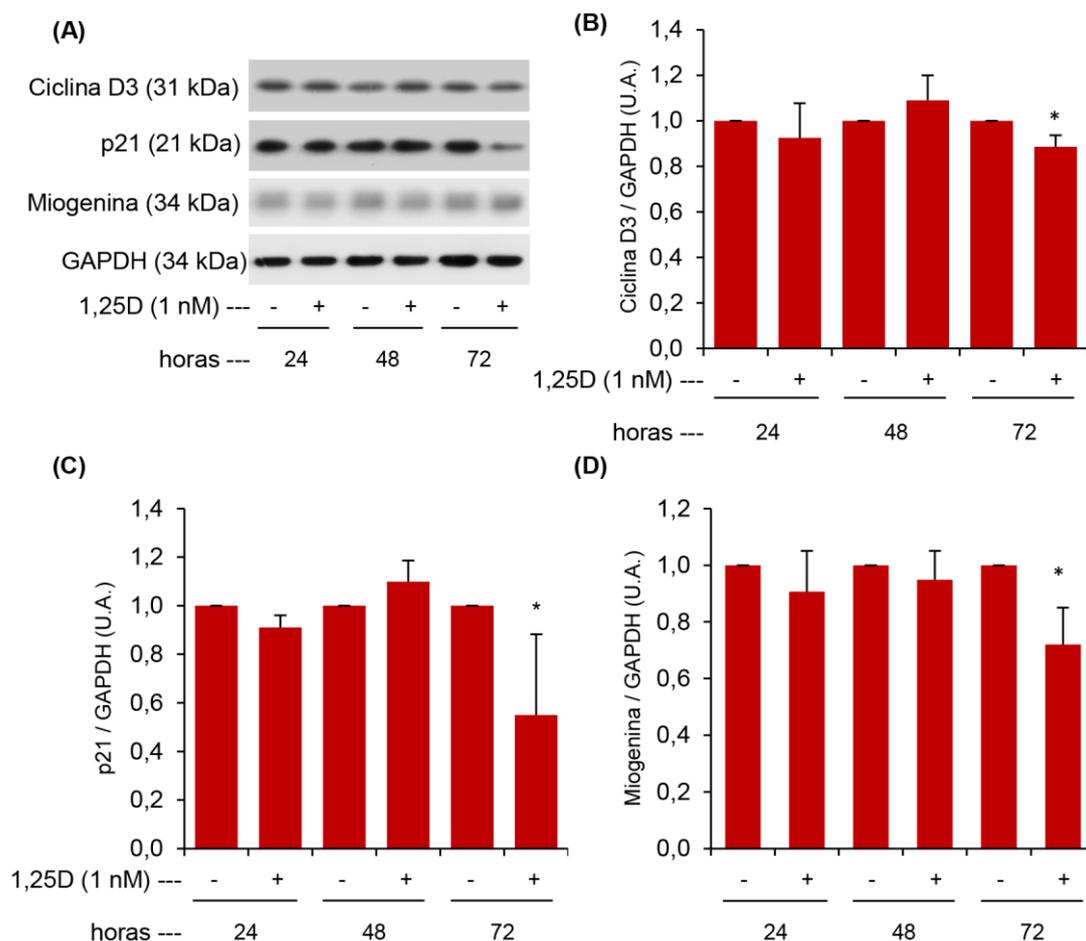
Las células RD fueron estimuladas con 1,25D (1 nM) o su vehículo (etanol 0,001 % - Ctrl) durante 24, 48 y 72 horas. A cada tiempo indicado, las células fueron fijadas con paraformaldehído 0,4 % y luego fotografiadas. Se muestran micrografías representativas de diez campos por condición.

El tratamiento de las células RD con la hormona disminuye la expresión de marcadores de la diferenciación muscular.

Sabiendo que el tratamiento con 1,25D inhibe la proliferación de las células RD y desencadena el arresto significativo de células en la fase G2/M se evaluó si este arresto celular dependiente del 1,25D era la entrada en el programa de diferenciación disparado por la hormona, como hemos determinado en las células de músculo esquelético normales C2C12. Para abordar este objetivo, se analizaron los niveles proteicos de ciclina D3,

p21^{Waf1/Cip1} y de miogenina. Estas proteínas están reportadas como marcadores tempranos de la diferenciación del músculo esquelético (Gurung y Parnaik 2012; Parker et al. 1995; Andrés y Walsh 1996) que aparecen en las células comprometidas a la diferenciación, aun cuando no presentan cambios morfológicos (Irazoqui, Boland y Buitrago 2014). Se supuso entonces que, a las 72 horas de tratamiento con la hormona, cuando se observaron las células RD al microscopio óptico no presentaban cambios morfológicos detectables, si el proceso de diferenciación se estaba desencadenando por estímulo del 1,25D, debería estar en una etapa temprana. Llamativamente, cuando se determinaron los niveles de las proteínas ciclina D3, p21^{Waf1/Cip1} y miogenina por Western blot se determinó que la expresión de estos marcadores no variaba ni a 24 ni a 48 horas de tratamiento. Sin embargo, pudimos determinar que a las 72 horas de estímulo con la hormona la expresión de la ciclina D3, el p21^{Waf1/Cip1} y la miogenina se encontraban significativamente disminuidas (Figura 21). Estos resultados muestran claramente que el 1,25D no está promoviendo el programa de re-diferenciación en las células RD y que el arresto celular observado no es parte del proceso de diferenciación celular.

Figura 21: El tratamiento con 1,25D disminuye la expresión de marcadores tempranos de diferenciación muscular a 72 horas de tratamiento



Las células RD fueron tratadas con 1,25D (1 nM) o su vehículo (0,001 % de etanol) durante 24, 48 y 72 horas. Los análisis Western Blot fueron llevados a cabo utilizando los anticuerpos anti-ciclina D3, anti-p21 y anti-miogenina. Las membranas fueron rehibridadas con el anticuerpo anti-GAPDH para asegurar la carga igualitaria de los geles. Se muestran los inmunoblots representativos de tres experimentos independientes (A) y la cuantificación mostrando la media \pm el DS de ciclina D3 (B), p21 (C) y miogenina (D).

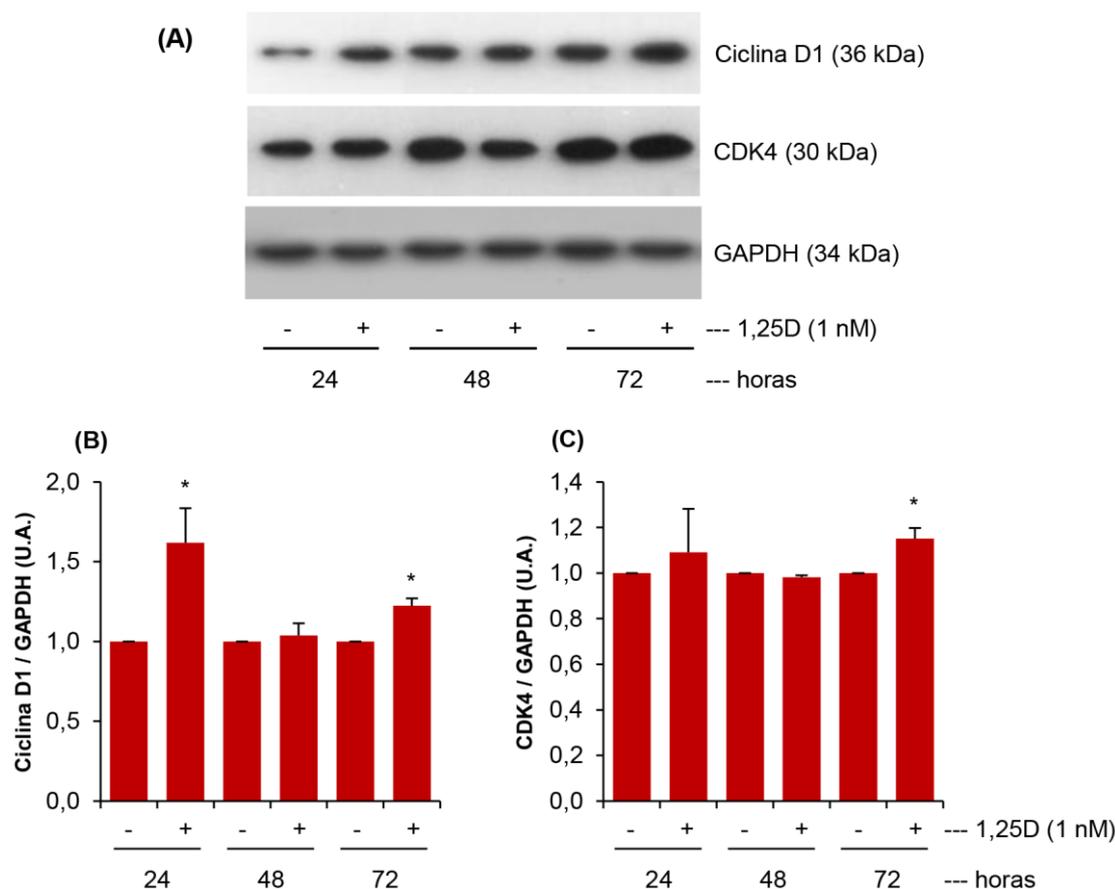
El tratamiento con 1,25D provoca el aumento de dos proteínas: CDK4 y ciclina D1 considerados reguladores de la apoptosis

Teniendo en cuenta que las células RD arrestadas en la fase G2/M no se estaban diferenciando y que el tratamiento hormonal por 72 horas disminuye significativamente el

número de células vivas, hipotetizamos que el 1,25D a este tiempo está conduciendo a las células RD a la muerte celular y decidimos, en primer lugar evaluar signos de apoptosis temprana.

Para abordar este objetivo, primeramente se analizó la expresión de CDK4 y de ciclina D1, ya que estas proteínas han sido reportadas como reguladores claves de la apoptosis (Katayama et al. 2003). Al realizar análisis de estas proteínas por Western blot usando anticuerpos específicos se evidenció un aumento a las 24 horas de tratamiento con respecto al control en la ciclina D1, que junto con la disminución significativa en p15, observada a este mismo tiempo, pueden significar un intento de supervivencia desencadenado por la célula, ante el tratamiento con 1,25D. Sin embargo, no se encontraron diferencias de expresión con respecto a la condición control ni a 48 horas de tratamiento. De relevancia, a 72 horas de tratamiento con 1,25D se evidenció un aumento significativo en la expresión de la CDK4 y también en la ciclina D1 (Figura 22).

Figura 22: El 1,25D induce reguladores claves de la apoptosis a 72 horas de tratamiento



Las células RD fueron tratadas con 1,25D (1 nM) o su vehículo (0,001 % de etanol) por 24, 48 y 72 horas. Los análisis Western Blot fueron llevados a cabo utilizando los anticuerpos anti-ciclina D1 y anti-CDK4. Las membranas fueron rehibridadas con el anticuerpo anti-GAPDH para asegurar la carga igualitaria en las calles de los geles. Se muestran los inmunoblots representativos de tres experimentos (A) y la cuantificación mostrando la media \pm el DS de ciclina D1 (B) y CDK4 (C).

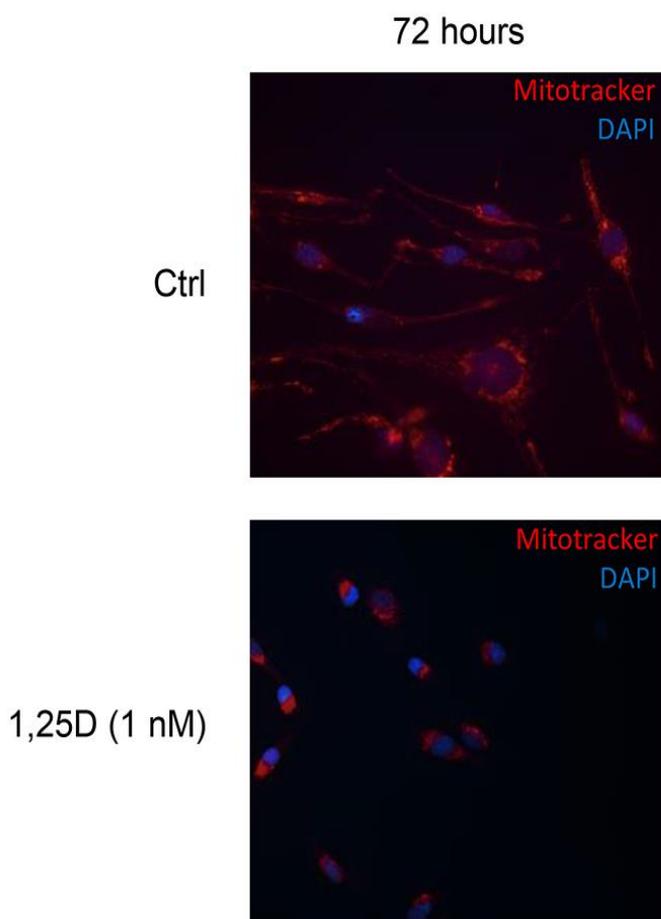
* $p < 0,05$ vs control.

Desorganización de la red mitocondrial promovida por el 1,25D.

En una célula saludable, las organelas encargadas de la producción de energía son las mitocondrias. Estas se encuentran distribuidas uniformemente en el interior celular formando una red, denomina “red mitocondrial” cuando las células están metabólicamente viables. Uno de los eventos tempranos que ocurre cuando se dispara la apoptosis es el agrupamiento perinuclear de las mitocondrias y una reducción de su tamaño acompañada de una hiperdensidad de la matriz, características conocidas como “pícnosis mitocondrial”

(Desagher y Martinou 2000). Dado que el aumento de los niveles de CDK4 y ciclina D1 nos indicaba que el 1,25D dispara reguladores claves de la apoptosis a las 72 horas de tratamiento, se quiso confirmar la inducción de eventos apoptóticos por el 1,25D a este tiempo. Para ello, pusimos nuestra atención en la red mitocondrial celular a través de estudios basados en la inmunocitoquímica. A las 72 horas de tratamiento hormonal, las células RD mostraron una disrupción de la red mitocondrial normal (observada en estado basal) y la consecuente picnosis mitocondrial y redistribución alrededor del núcleo, a diferencia de la red de mitocondrias normales que se observó en las células control que aún permanecían saludables (Figura 23).

Figura 23: El 1,25D promueve la picnosis mitocondrial y la relocalización de las mitocondrias a las 72 horas de tratamiento.



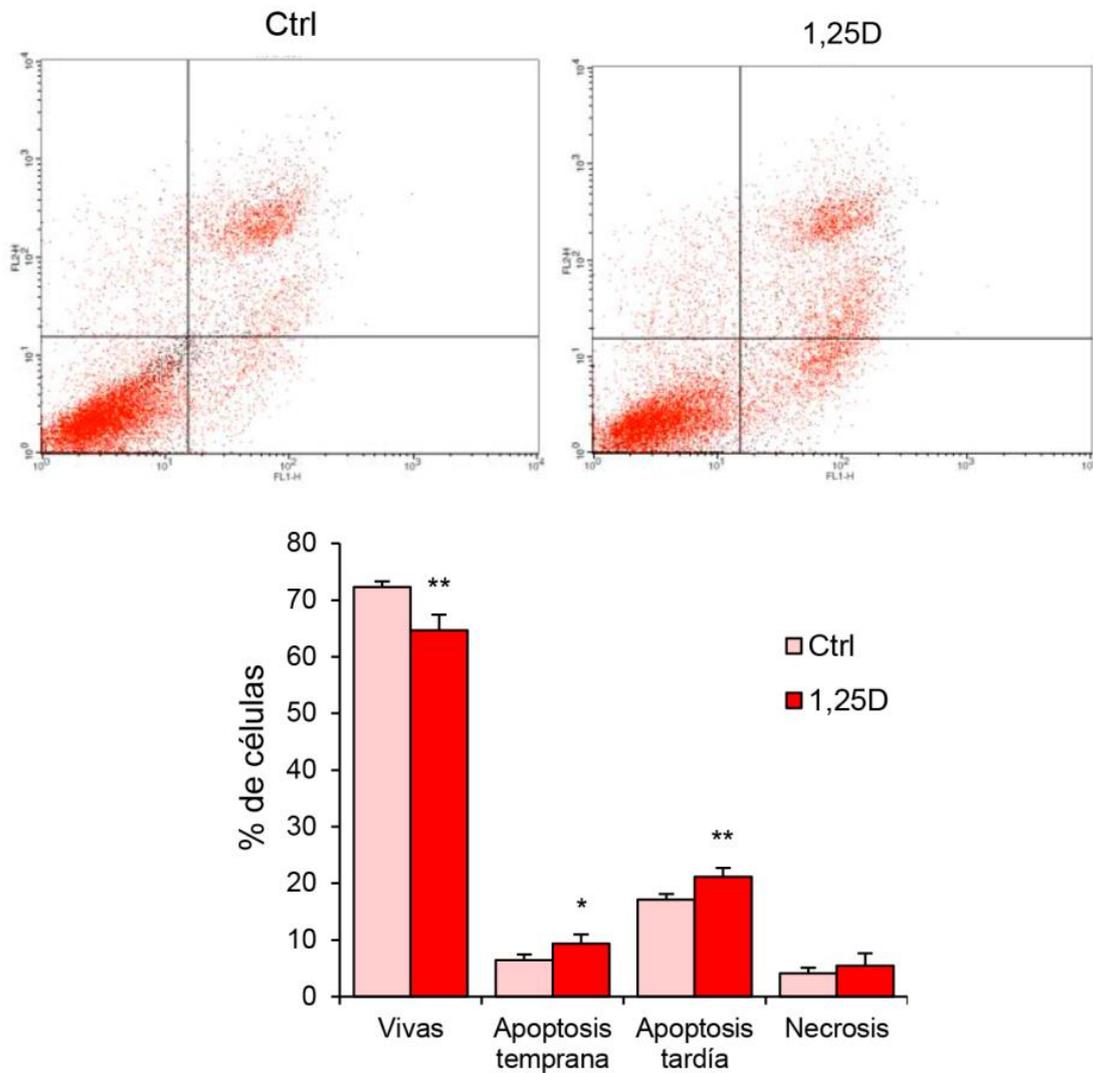
Las células RD se trataron con 1,25D (1 nM) o su vehículo (0,001 % etanol) por 72 horas e inmediatamente se desarrollaron ensayos de inmunocitoquímica usando Mitotracker (rojo) para marcar las mitocondrias y DAPI (azul) para marcar los núcleos. Las micrografías fueron tomadas con una cámara Nikon acoplada a un microscopio de epifluorescencia. Se muestran las micrografías representativas de tres experimentos independientes, donde se tomaron 10 fotos de cada condición, en cada experimento.

El tratamiento con 1,25D de células RD disminuye el porcentaje de células vivas y aumenta la apoptosis temprana y tardía.

El progreso de la apoptosis está caracterizado por diferentes eventos. Cuando una célula está entrando en apoptosis, uno de los primeros eventos que sucede es la externalización de la PS, que en una célula saludable se encuentra únicamente en la hemicapa interna de la membrana plasmática (Vermes et al. 1995). Este proceso de

externalización es fácilmente detectable por citometría de flujo, utilizando AV conjugada a un fluoróforo, ya que ésta se une a la PS. Pero, este proceso de detección de PS no es exclusivo de apoptosis, sino que se da también durante la necrosis. La diferencia entre estas dos formas de muerte celular es que durante las etapas iniciales de la apoptosis la membrana celular se mantiene intacta, mientras que en todo momento de la necrosis la membrana plasmática pierde su integridad y se perfora. Por lo tanto la medición de la unión de la AV a la superficie celular como indicativo de la apoptosis tiene que estar acompañado de una prueba con colorante de exclusión que permita establecer la integridad de la membrana celular. El ensayo de detección de AV conjugada a FITC en conjunto con IP, como marcador de integridad de la membrana plasmática, muestra que el tratamiento con 1,25D (1nM) durante 72 horas disminuye el porcentaje de células vivas y aumenta tanto la apoptosis temprana como la tardía en comparación al control (Figura 24).

Figura 24. El estímulo de 1,25D durante 72 horas disminuye el porcentaje de células vivas y aumenta el porcentaje de células RD en apoptosis.



Las células RD fueron tratadas con 1,25D (1 nM) durante 72 horas. Luego del tratamiento las células fueron tripsinizadas y marcadas con AV conjugada a FITC y con IP, y analizadas por citometría de flujo. Se muestran los gráficos de puntos representativos (A) y sus cuantificaciones mostrando la media \pm DS (B) de tres experimentos independientes.

* $p < 0,05$ vs control; ** $p < 0,01$ vs control.

Discusión

El metabolito activo de la vitamina D, el 1,25D, es un reconocido potente regulador del crecimiento celular y de la diferenciación. Sin embargo, también existe enorme cantidad

de evidencia de sus efectos opuestos provocando la muerte celular, inhibiendo la invasión tumoral y la angiogénesis en células transformadas, convirtiendo a este metabolito en un excelente agente candidato para la regulación del cáncer (Vuolo et al. 2012). A pesar de esto, no existe una relevante cantidad de investigaciones sobre el uso de 1,25D en rhabdomyosarcomas. En 1996, Shabahang y colaboradores demostraron la existencia del VDR en células de sarcoma de tejido blando, entre las que incluían dos líneas de RMS diferentes a las RD, y sugerían una correlación entre los niveles del VDR en las células y el grado de inhibición del crecimiento celular que impartía el 1,25D, en altas concentraciones de 10^{-6} y 10^{-7} M (Shabahang et al. 1996). En este trabajo, se reporta por primera vez que las células RD expresan el VDR y que el tratamiento con 1,25D a dosis de 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} M induce un incremento de su expresión tanto a 24 como a 48 horas de tratamiento. Sin embargo, a las 72 horas de exposición hormonal, la expresión del VDR disminuye notablemente. A este mismo tiempo, se evidencia una aguda disminución en el número de células viable / vivas y, de relevancia, también se evidencia una marcada reducción en el porcentaje de células en fase S, con los porcentajes de células arrestadas en las fases G0/G1 y G2/M, aumentados, todos de manera significativa. Además, la sobreexpresión del CKI p15^{INK4b}, muestra la inhibición de la proliferación indudable, así como Krimpenfort *et al.*, habían reportado previamente (Krimpenfort et al. 2007). Por otro lado, al analizar el perfil de expresión de CDK6, no se observó ningún cambio, lo cual es consistente con lo reportado previamente, que los niveles de CDKs en general, se mantienen constantes a lo largo de ciclo celular (Morgan 1995).

Una terapia ampliamente aceptada contra los sarcomas es la re-diferenciación de las células con crecimiento anormal a su tejido original, aún más en eRMS, como las células RD, ya que se trata de un cáncer no muy agresivo (Dancsok, Asleh-Aburaya y Nielsen 2016). Los resultados del capítulo I mostrados (en concordancia con otros trabajos previamente publicados del laboratorio donde he desarrollado esta tesis) y de otros grupos de investigación reportaron previamente que el tratamiento de mioblastos normales con

1,25D (10^{-9} M) induce la diferenciación y la formación de miofibrillas funcionales (Garcia et al. 2011; Boland, Buitrago y De Boland 2005; Girgis, Clifton-Bligh, et al. 2013; Garcia et al. 2013; Ryan et al. 2013; Olsson et al. 2016; Irazoqui et al. 2015; Buitrago, Arango y Boland 2012; Girgis, Clifton-bligh, et al. 2013; Pojednic y Ceglia 2014; Buitrago et al. 2006; Irazoqui, Boland y Buitrago 2014). Sin embargo, es importante recordar que, en diferentes tipos de cáncer, el 1,25D promueve la apoptosis. Los resultados aquí expuestos muestran claramente que no hay cambios morfológicos observables en las células RD estimuladas con 1,25D (1 nM) por 24, 48 o 72 horas. Sin embargo, al analizar marcadores tempranos de la diferenciación muscular como son la ciclina D3 (Irazoqui, Boland y Buitrago 2014; Gurung y Parnaik 2012; De Luca et al. 2013), p21^{Waf1/Cip1} (Lee et al. 2008; Parker et al. 1995) y la miogenina (Andrés y Walsh 1996; Olguin y Olwin 2004), los análisis Western Blot no detectaron ningún cambio en sus niveles a las 24 o 48 horas, pero sí se evidenció una significativa disminución de estas tres proteínas marcadoras de diferenciación a las 72 horas de estímulo hormonal. Por lo tanto las células RD arrestadas en fase G0/G1 y también en la fase G2/M a las 72 horas de estimulación con la hormona esteroide 1,25D no estaban siendo conducidas a la diferenciación, como ocurre en las células musculares esqueléticas normales C2C12 (Irazoqui, Boland y Buitrago 2014). De relevancia, debe tenerse en cuenta que las células tumorales de eRMS más diferenciadas, resultan ser altamente migratorias, capaces de invadir tejido normal adyacente e incluso intravasarse y dispersarse por vía sanguínea (Ignatius et al. 2012). Estos resultados muestran un aumento de la muerte celular a las 72 horas.

En diferentes tipos de cáncer, el 1,25D promueve la apoptosis (Wang y Tenniswood 2014; Walentowicz-Sadłęcka et al. 2013; Chiang y Chen 2013). Lohberger et al. reportaron previamente que un extracto de *Quiscalis indica* induce un arresto celular en la fase G2/M seguido de apoptosis en células de sarcoma de tejido blando (Lohberger et al. 2015). En este trabajo de tesis se evidencia que a las 72 horas de tratamiento con 1,25D, las células RD muestran un arresto en la fase G2/M y una sobreexpresión de marcadores

de apoptosis tempranos, como la ciclina D1 y la CDK4, tal como ocurre en el cáncer de pulmón (Dobashi et al. 2004). En las primeras etapas de la apoptosis, la mitocondria sufre una reducción en el tamaño y se condensa generando la hiperdensidad de su matriz, características que a menudo se refieren como “picnosis mitocondrial”. Además, al mismo tiempo se observa que las mitocondrias se redistribuyen alrededor del núcleo (Desagher y Martinou 2000). En el desarrollo de estos estudios científicos, se reporta que la estimulación hormonal de las células RD por 72 horas induce una re-localización de las mitocondrias hacia el la periferia del núcleo con la asociada picnosis mitocondrial, mostrando claramente que los eventos tempranos de inducción de la apoptosis han sido disparados, en estas células por la hormona 1,25D.

La externalización la PS es un evento temprano y generalizado durante la apoptosis de una variedad de tipos de células murinas y humanas, independientemente del estímulo iniciador, aunque la membrana plasmática permanece íntegra (Martin et al. 1995). A medida que el proceso de apoptosis avanza, se pierde la integridad en la membrana celular y se vuelve permeable, perdiendo la capacidad de excluir al colorante catiónico fluorocromo IP (Smolewski et al. 2002). De esta forma, el uso de AV en conjunto con el IP es un método ampliamente utilizado para clasificar a las células en las diferentes etapas de la apoptosis (Demchenko 2012; Bertho, Santiago y Coutinho 2000). En este trabajo se evidenció que el tratamiento con 1,25D (10^{-9} M) durante 72 horas promueve una disminución significativa de las células vivas en conjunto con un aumento de las células en apoptosis temprana y tardía, tal como está reportado para diferentes tipos de cáncer, donde el calcitriol actúa como anti-neoplásico, al inducir la apoptosis (Ma et al. 2013; González-Pardo et al. 2014; Díaz et al. 2015)

Conclusión

Los resultados obtenidos en células RD, en su conjunto, demuestran que el 1,25D en concentración de 1 nM durante 72 horas causa la entrada en apoptosis de este tipo celular.

Resumen

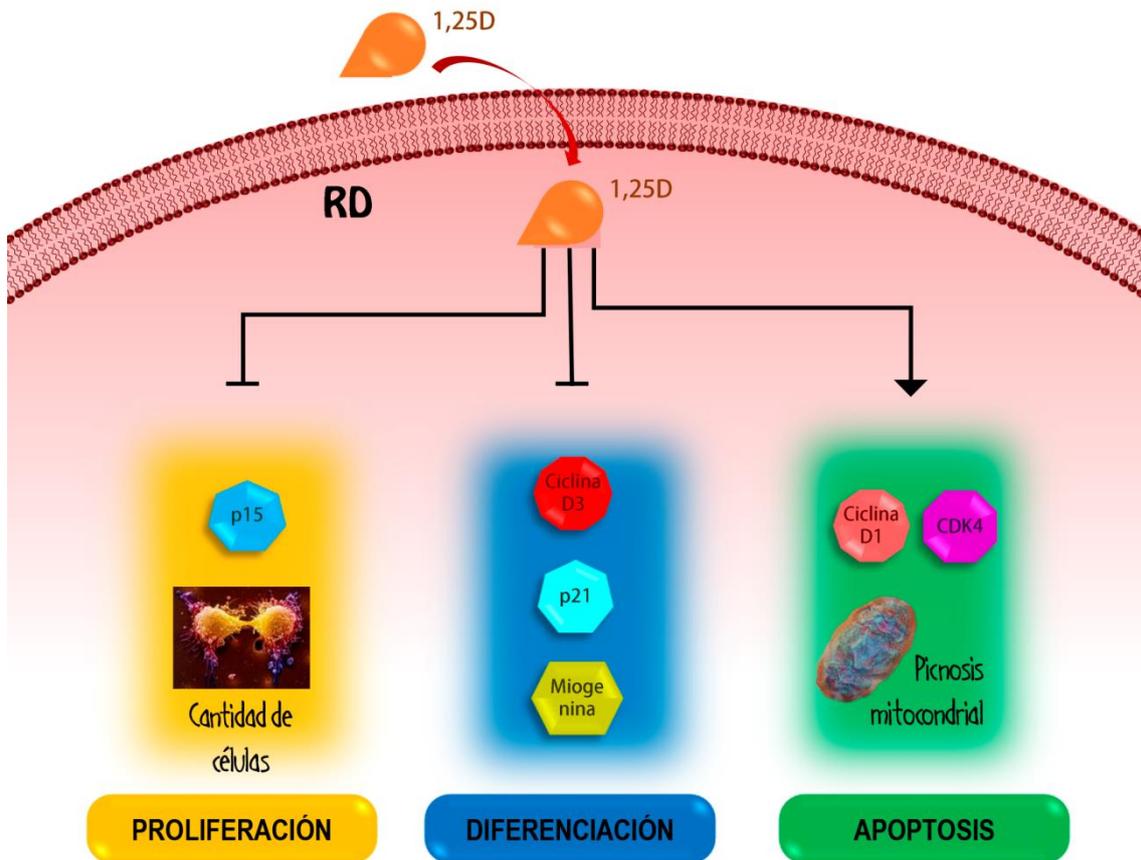
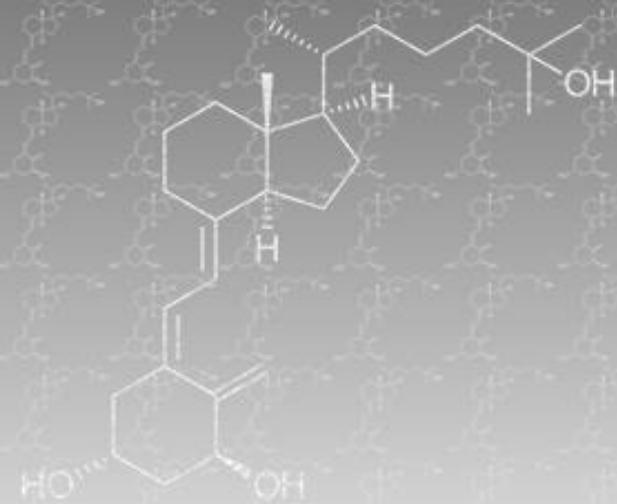


Ilustración 16: Resumen del Capítulo II. El tratamiento con 1,25D durante 72 horas provoca una inhibición en la proliferación (ya que disminuye la cantidad de células vivas y aumenta la expresión de p15), no promueve la diferenciación (ya que no se observan cambios morfológicos y disminuye la expresión de marcadores de diferenciación tempranos) y estimula la apoptosis (aumentando la expresión de los mediadores ciclina D1 y CDK4 y causando picnosis mitocondrial).



Capítulo III

Acciones rápidas no genómicas del 1,25D en células musculares normales y de rhabdomiosarcoma.

Resultados

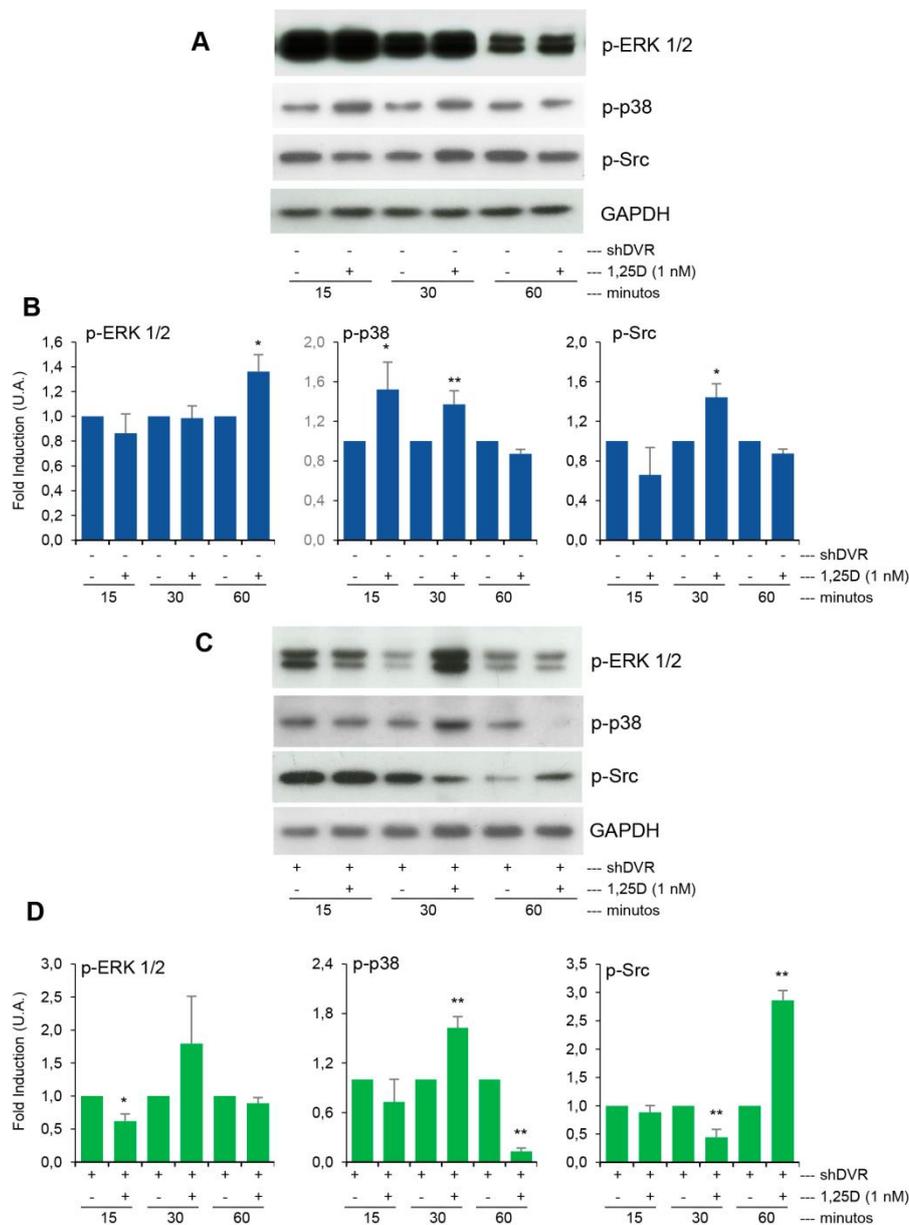
Modulación de ERK 1/2, p38 MAPK y Src en células C2C12 en proceso de diferenciación: rol del VDR

Previamente fue reportado la participación de Src en la señalización rápida no-genómica del 1,25D que conduce a la activación de ERK 1/2 y p38 MAPK en células C2C12, tanto en estado proliferativo como durante la diferenciación tardía (Ronda, Buitrago y Boland 2010; Buitrago et al. 2006). En las investigaciones de esta sección, el enfoque experimental que se ha seguido fue dejar crecer las células C2C12 durante 48 horas en MdC y luego cambiarlas a MdD, en donde permanecieron por 24 horas más, previo a la realización de los tratamientos. Esto permite que las células hayan entrado en el programa de diferenciación, pero aún permanezcan en una etapa temprana siendo poligonales y mononucleares, tal como se muestra en Materiales y Métodos, en las micrografías de la Ilustración 14, panel central. Bajo este diseño experimental obtuvimos resultados que muestran en C2C12*wt* que las MAPKs ERK 1/2 disminuyen progresivamente su estado de fosforilación basal (activación) con el avance del tiempo a 15, 30 y 60 minutos (Figura 25 - A). Al comparar las condiciones control con las condiciones estimuladas por la hormona 1,25D (1 nM) a cada tiempo experimental, podemos determinar que no existen cambios significativos en la activación de ERK 1/2 ni a 15 ni a 30 minutos de exposición hormonal, pero que el 1,25D provoca un aumento significativo en la fosforilación de ERK 1/2 a los 60 minutos de estimulación (Figura 25- B). Contrariamente al perfil de actividad de ERK 1/2, se evidenció que los niveles basales de p38 MAPK activa no variaban a lo largo del tiempo (15, 30 y 60 minutos) y que esta quinasa respondía al tratamiento hormonal aumentando su fosforilación de manera significativa tanto a 15 como a 30 minutos de estimulación con 1,25D, pero no se observaron cambios dependientes del 1,25D en la activación de p38 MAPK a 60 minutos de exposición hormonal. Respecto del comportamiento de Src, se pudo determinar que el 1,25D no provoca cambios significativos a 15 minutos, induce un pico en

la activación de esta quinasa a 30 minutos de estímulo con el esteroide y esto retorna a niveles basales a los 60 minutos de tratamiento con el esteroide (Figura 25 - B).

Para determinar la participación del VDR en la regulación de las quinasas mencionadas, se realizaron las mismas estimulaciones hormonales en células C2C12*shVDR*. Se determinó que el patrón basal de activación de ERK 1/2 fue similar al observado en las células C2C12*wt*, ya que a 15 minutos en la condición control hay una mayor cantidad de ERK 1/2 fosforilada que a 30 y a 60 minutos (Figura 25 - C). La activación de ERK 1/2 dependiente del 1,25D disminuyó en forma significativa a 15 minutos de tratamiento, fue muy variable a los 30 minutos en los distintos experimentos, no permitiendo estos resultados mostrar un cambio con valor significativo en la activación de ERK1/2 y permaneció inalterable a 60 minutos de estimulación hormonal (Figura 25 - D). En cuanto al perfil de activación de p38 MAPK, se pudo evidenciar un pico de activación significativo a los 30 minutos de exposición hormonal y además se determinó una caída abrupta en la fosforilación de esta quinasa a los 60 minutos de tratamiento con 1,25D. La activación de Src cayó de manera significativa a los 30 minutos de inducción hormonal, pero aumentó muy significativamente a los 60 minutos con el esteroide, con respecto al control.

Figura 25: El 1,25D promueve la activación de ERK 1/2, p38 MAPK y Src rápidamente en C2C12. El silenciamiento del VDR modifica la regulación de estas quinasas.



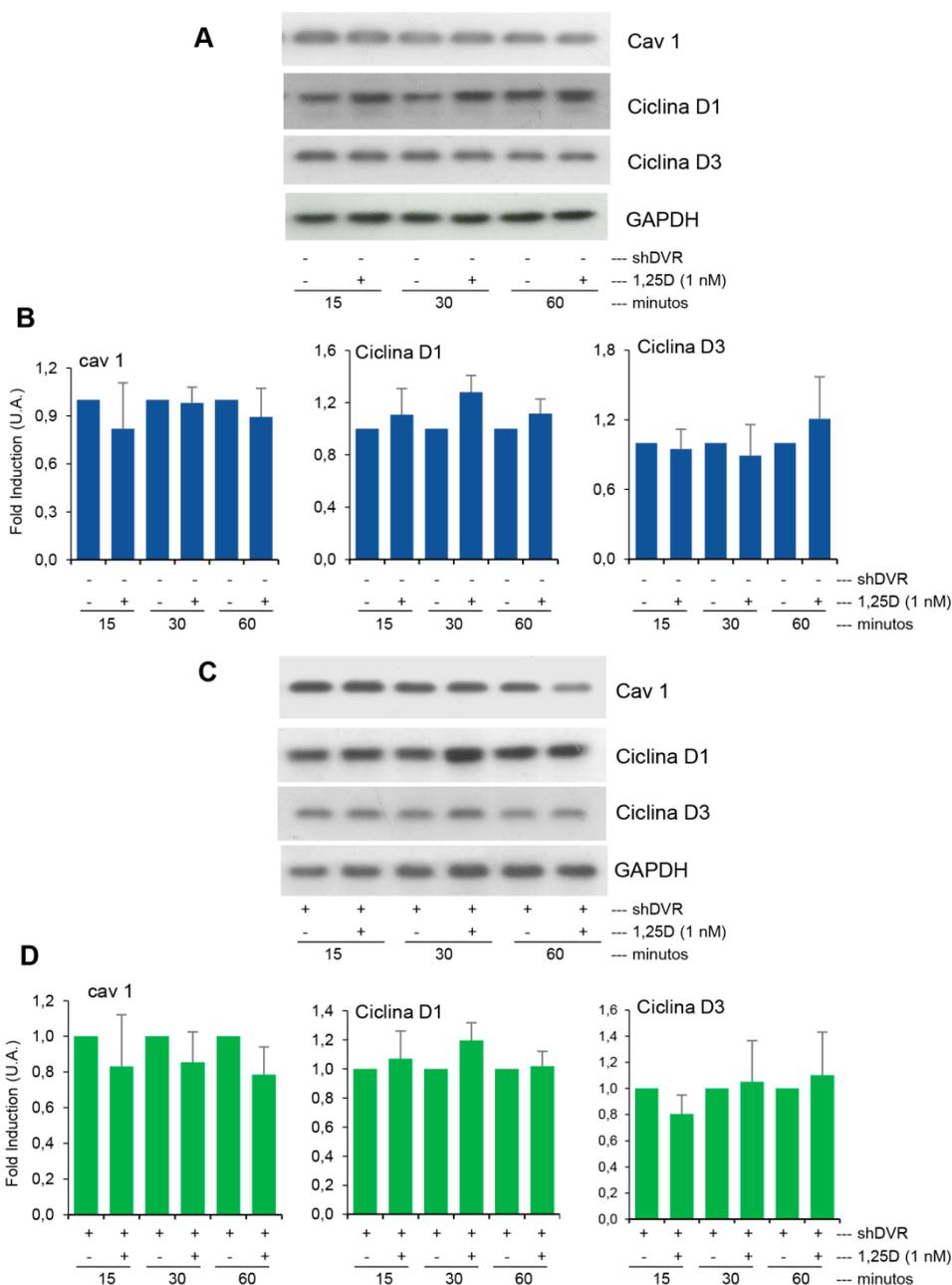
Las células C2C12wt y C2C12shVDR en diferenciación temprana fueron estimuladas por 15, 30 y 60 minutos con 1,25D (1 nM) o su vehículo (0,001 % de etanol). Los análisis Western Blot se realizaron utilizando los anticuerpos anti-p-ERK 1/2, anti-p-p38 y anti-p-Src (cada uno de los cuales solo reconoce la forma activada de la proteína correspondiente). Las membranas fueron rehibridadas con el anticuerpo anti-GAPDH para asegurar que la carga de los geles haya sido igualitaria. Se muestran los inmunoblots representativos de tres experimentos independientes de C2C12wt (**A**) y de C2C12shVDR (**C**). Además se muestran las cuantificaciones mostrando las medias \pm los DS de las C2C12wt (**B**) y de las C2C12shVDR (**D**).

* $p < 0,05$ vs control; ** $p < 0,01$ vs control.

Expresión de las ciclina D1 y D3 y de caveolina-1 durante tratamientos cortos con 1,25D: participación del VDR

Cuando el programa de diferenciación muscular es disparado, se observa un aumento en la expresión de la ciclina D3 mientras que la expresión de la ciclina D1 disminuye (Gurung y Parnaik 2012). Por otro lado, también ha sido reportado que la expresión de cav-1 aumenta cuando las células musculares satélites se activan en respuesta a una lesión y también durante su diferenciación (Volonte 2004). Los resultados que se muestran en esta Tesis, evidencian que tanto la expresión de cav-1 como la de las ciclinas D1 y D3, no varían en respuesta al tratamiento hormonal con el 1,25D (1 nM) durante 15, 30 y 60 minutos en células normales C2C12wt (Figura 26). La ausencia del VDR en las células C2C12 (C2C1shVDR) tampoco provocó ningún cambio en cav-1 ni en las ciclinas mencionadas, a ninguno de los tiempos de estimulación hormonal estudiados (15, 30 o 60 minutos). Probablemente, el hecho de que estas proteínas se mantengan sin variaciones significativas esté relacionado a los tiempos muy cortos de estimulación con 1,25D analizados.

Figura 26: El tratamiento con 1,25D en células C2C12wt y en células C2C12shVDR no provoca cambios en la expresión de cav-1, ciclina D1 o ciclina D3.



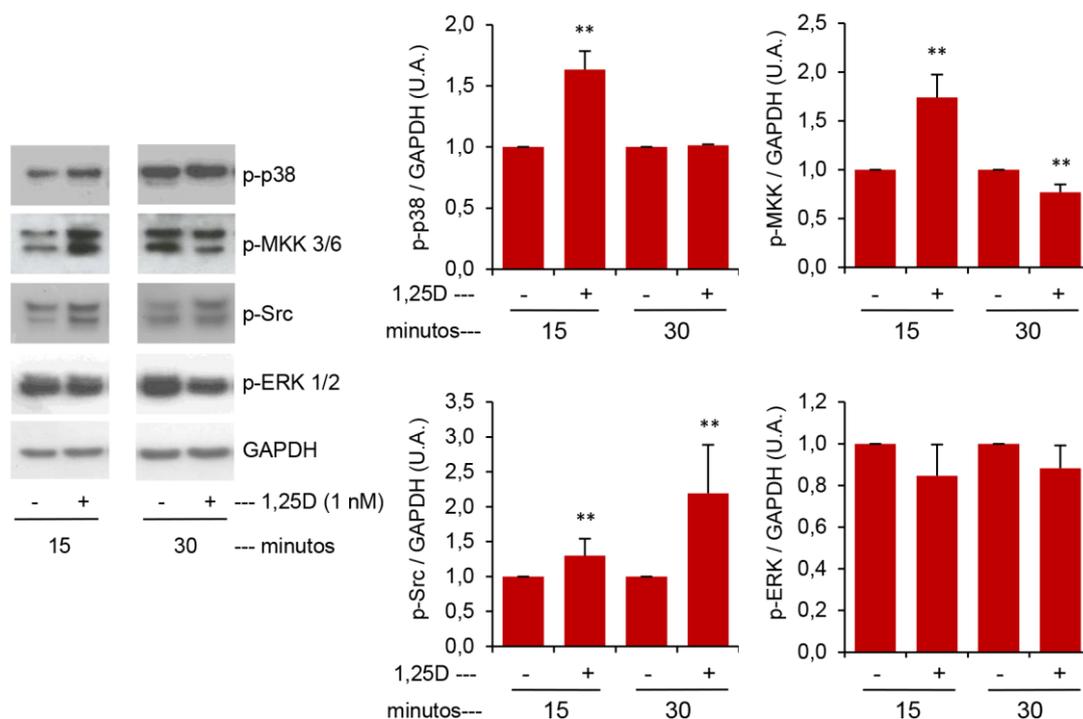
Las células C2C12wt y C2C12shVDR fueron estimuladas por 15, 30 y 60 minutos con 1,25D (1 nM) o su vehículo (0,001 % de etanol). Los análisis Western Blot se realizaron utilizando los anticuerpos anti-cav-1, anti-ciclina D1 y anti-ciclina D3. Las membranas fueron rehibridadas con el anticuerpo anti-GAPDH para garantizar que el cargado de cada calle del gel haya sido equitativo. Se muestran los inmunoblots representativos de tres experimentos independientes de C2C12wt (**A**) y de C2C12shVDR (**C**). Además se muestran las cuantificaciones con los valores medios \pm los DS de las C2C12wt (**B**) y de las C2C12shVDR (**D**).

Modulación de ERK 1/2, p38 MAPK y Src por el 1,25D en células RD

Como se ha mencionado anteriormente, las células RD sometidas a tratamientos con 1,25D a diferentes tiempos, mayores de 24 horas, no muestran ningún signo de inducción a la diferenciación. Ha sido reportado inclusive que el estímulo con medio suplementado con suero de caballo, no es capaz de inducir la diferenciación en este tipo celular (Knudsen et al. 1998). Por lo tanto, para evaluar los efectos rápidos del 1,25D en este tipo celular se decidió realizar los ensayos en las células RD en MdCag y sin cambiar este medio de cultivo. Tanto la tirosina quinasa no receptora Src como la de p38 MAPK, están involucradas en diferentes procesos celulares como crecimiento, diferenciación, forma celular, migración, supervivencia y apoptosis (Zarubin y Han 2005; Parsons y Parsons 2004). Ha sido reportado que Src se activa por el tratamiento con 1,25D en el orden de los minutos en células musculares normales (Buitrago et al. 2000; Morelli et al. 2000), así como también ocurre la activación rápida de la vía p38 MAPK, a través de Ras / Src / MKK 3/6 (Gocek, Kielbiński y Marcinkowska 2007; Buitrago et al. 2006) en células musculares esqueléticas normales. Por otro lado, la vía de ERK 1/2 puede inducir tanto la proliferación celular como la apoptosis dependiendo de su localización intracelular (Mebratu y Tesfaigzi 2009) y también está reportado que esta quinasa se activa rápidamente (en el orden de los minutos) después del estímulo hormonal en células C2C12 (Ronda et al. 2007).

Los resultados aquí mostrados indican que en células RD, el 1,25D (1 nM) provoca la rápida activación de Src a los 15 minutos de tratamiento, siendo mayor este estímulo a los 30 minutos (Figura 27). Tanto p38 MAPK como su quinasa inmediata anterior (*upstream*) MKK 3/6 se activan significativamente a los 15 minutos de estimulación con 1,25D, pero la fosforilación de MKK 3/6 cae significativamente a los 30 minutos de exposición a la hormona, mientras que la activación de p38 MAPK se mantiene con los mismos niveles del control (Figura 27). En esta misma figura también puede evidenciarse que ERK 1/2 no presenta cambios significativos en su activación con respecto al control a ninguno de los tiempos de estimulación hormonal analizados (15 y 30 minutos) (Figura 27).

Figura 27: El tratamiento con 1,25D promueve la activación de Src, MKK 3/6 y p38 MAPK



Las células RD fueron estimuladas con 1,25D (1 nM) o su vehículo (0,001 % de etanol) por 15 y 30 minutos. Los análisis Western Blot se llevaron a cabo utilizando los anticuerpos anti-p-p38, anti-p-Src, anti-p-ERK 1/2 y anti-p-MKK 3/6. Las membranas fueron luego rehibridadas utilizando el anticuerpo anti-GAPDH para asegurar que los geles hayan sido cargados con la misma cantidad de proteínas en cada una de sus calles. Se muestran los inmunoblots representativos de tres experimentos diferentes (izquierda) y las cuantificaciones de los escaneos por densitometría volumétrica con los valores promedio \pm los DS (derecha).

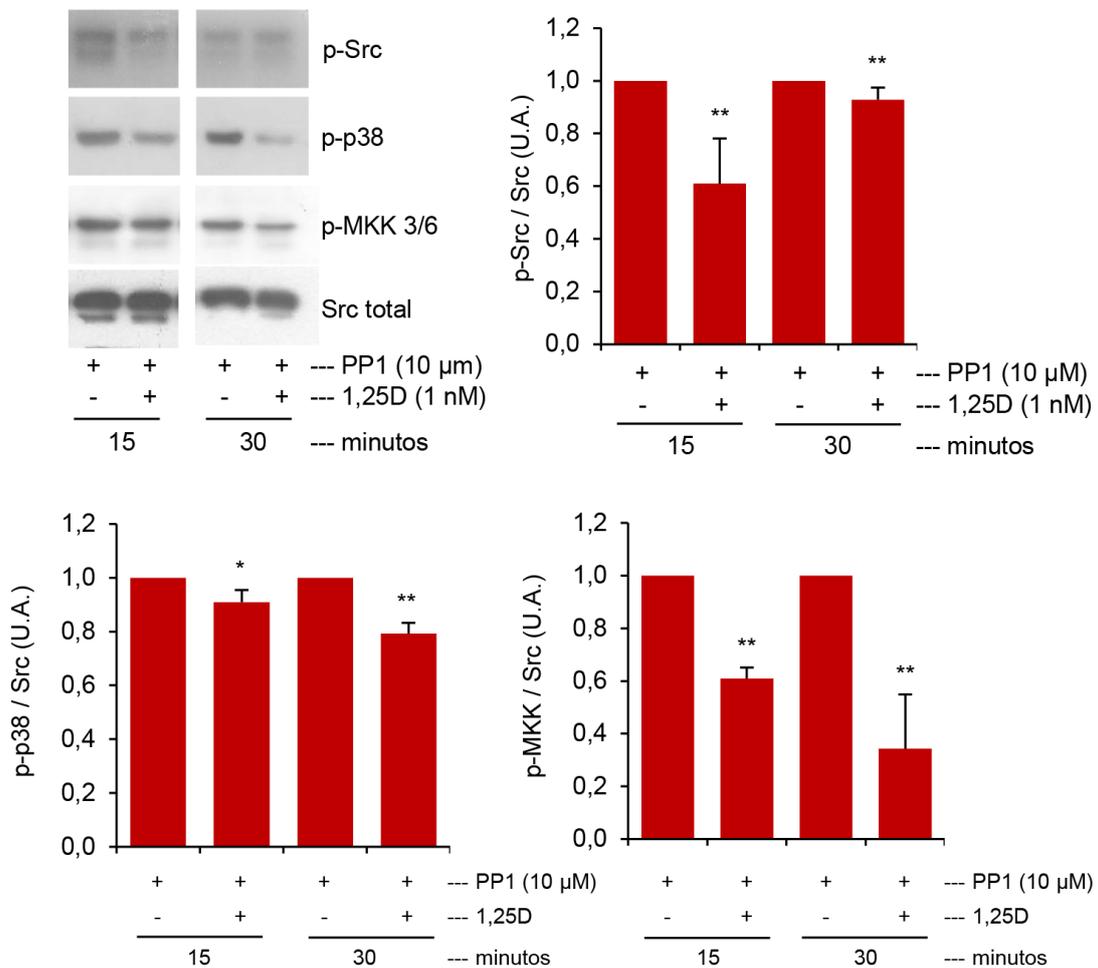
* $p < 0,05$ vs control; ** $p < 0,01$ vs control.

La activación de Src es requerida para la fosforilación de MKK 3/6 y p38 MAPK inducida por el 1,25D en células RD.

A diferencia de las células C2C12, las vías de señalización que modula el 1,25D se desconocen por completo en células RD. El uso del inhibidor PP1 en una concentración 10 μ M, inhibe eficazmente la activación de la tirosina quinasa Src en células de músculo esquelético en desarrollo (Buitrago, Boland y de Boland 2001; Ungefroren et al. 2011; Dubińska-Magiera et al. 2014).

Este inhibidor PP1 (10 μ M) logró suprimir la activación de Src inducida por el 1,25D (1 nM) tanto a 15 como a 30 minutos en células RD (Figura 28). Se usó un anticuerpo dirigido contra la totalidad de la proteína Src con la finalidad de establecer que el tratamiento hormonal no estuviera provocando cambios en los niveles proteicos de Src total y, de este modo, atribuir una caída de Src fosforilada al usar el inhibidor PP1, a una supresión en la activación de esta quinasa y no a una diferencia en la cantidad total de esta proteína. Esta inhibición provoca que las quinasas corriente abajo de Src, MKK 3/6 y p38 MAPK, no logren su activación con el tratamiento con 1,25D, e incluso los niveles basales de activación en el control caen muy significativamente, revelando por primera vez la participación de Src en la modulación de la vía p38 MAPK por el 1,25D en células de RMS.

Figura 28: Participación de Src en la activación de MKK 3/6 y de p38 MAPK

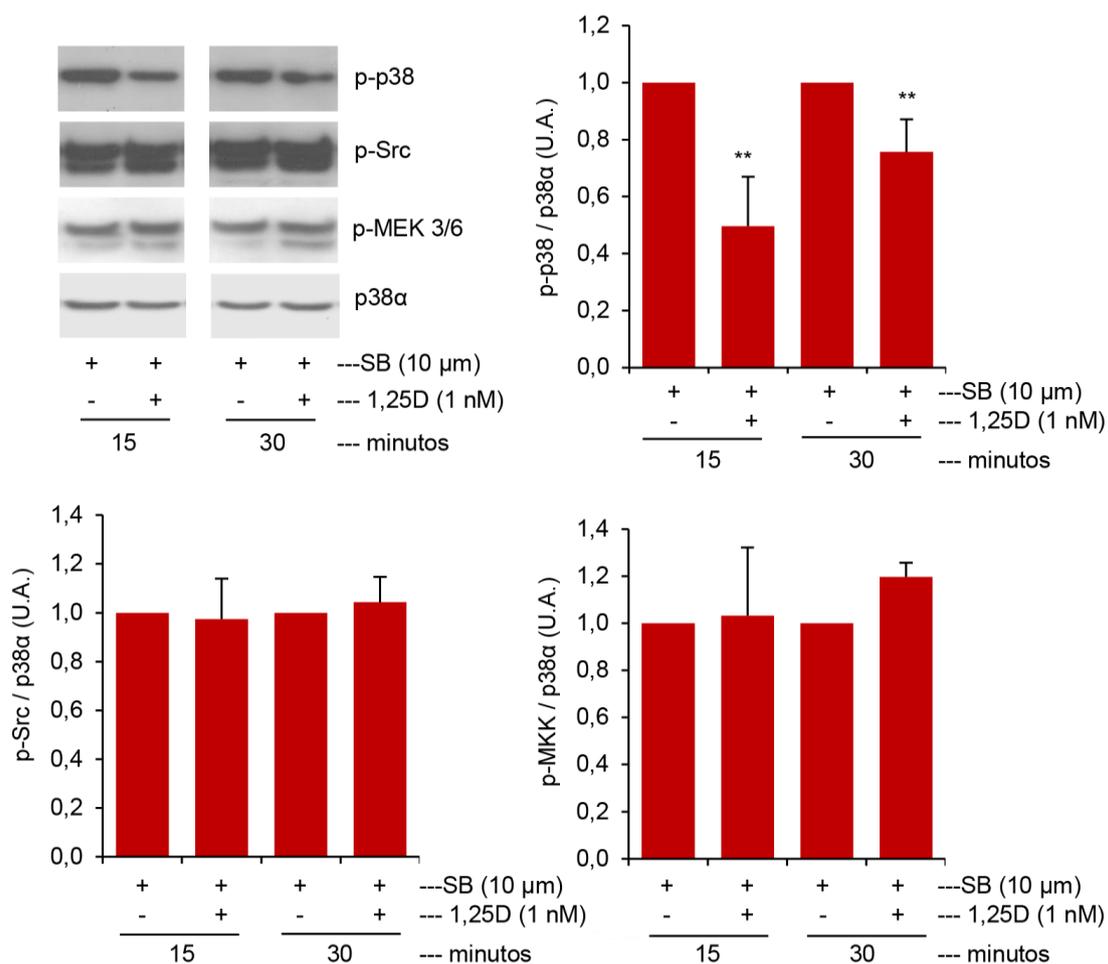


Las células RD fueron pre-incubadas con PP1 (10 μM) y luego estimuladas con 1,25D (1 nM) o su vehículo (0,001 % de etanol) por 15 y 30 minutos. Los análisis Western Blot se llevaron a cabo utilizando los anticuerpos anti-p-Src, anti-p-p38, y anti-p-MKK 3/6. Las membranas fueron luego rehibridadas utilizando el anticuerpo anti-Src total para asegurar que todas las calles de los geles hayan sido cargadas con la misma cantidad de proteínas. Se muestran los inmunoblots representativos de tres experimentos independientes (izquierda arriba) y las cuantificaciones de los escaneos por densitometría volumétrica mostrando los valores de medias ± los DS (derecha arriba y abajo).

La activación de p38 MAPK es requerida en la activación de Src y MKK 3/6 por el 1,25D

Está reportado que la tirosina quinasa no receptora Src promueve la activación de MKK 3/6 y esta quinasa es la encargada de activar a p38 MAPK (Gocek, Kielbiński y Marcinkowska 2007). La Figura 29 muestra que el inhibidor SB-203580 (10 μ M) suprime eficazmente la activación de la p38 MAPK inducida por el 1,25D (1 nM) tanto a los 15 como a los 30 minutos de tratamiento en las células RD. La inhibición de la p38 MAPK, llamativamente suprime la activación de Src y de la quinasa MKK 3/6 en forma significativa a los 15 y a los 30 minutos de tratamiento con la hormona. Nuevamente, el uso del anticuerpo anti-p38 α permite, además del control de cargado de cada calle del gel, determinar que no hay cambios en la expresión de p38 MAPK que provocaran falsos negativos en la inhibición de esta quinasa (Figura 29).

Figura 29: la inhibición de la p38 MAPK, no permite la activación de las quinasas Src y MKK 3/6



Las células RD fueron pre-tratadas con SB 203580 (10 μM) y posteriormente estimuladas con 1,25D (1 nM) o su vehículo (0,001 % de etanol) durante 15 y 30 minutos. Los análisis Western Blot se llevaron a cabo utilizando los anticuerpos anti-p-p38, anti-p-Src, y anti-p-MKK 3/6. Las membranas fueron luego rehibridadas utilizando el anticuerpo anti-p38α para corroborar que cada calle de los geles posee igualitaria cantidad de proteínas totales y que la expresión de p38 MAPK no varía. Se muestran los inmunoblots representativos de tres experimentos independientes (izquierda, arriba) y las cuantificaciones de los escaneos por densitometría volumétrica mostrando los valores promedio ± los DS (derecha arriba, y abajo).

** p < 0,01 vs control.

Discusión

Durante la proliferación de los mioblastos o la diferenciación tardía del músculo esquelético, los tratamientos con 1,25D provocan una rápida activación de Src, ERK 1/2, y

p38 MAPK en células de músculo esquelético normales (Buitrago, Boland y de Boland 2001; Ronda, Buitrago y Boland 2010; Buitrago et al. 2000; Boland et al. 2002; Buitrago et al. 2003; Buitrago, Costabel y Boland 2011; Buitrago y Boland 2010; Buitrago, Pardo y Boland 2013; Buitrago et al. 2006; Morelli et al. 2001). Estas vías han sido implicadas en una amplia y diversa variedad de procesos tales como proliferación, diferenciación, migración y hasta muerte celular programada (Parsons y Parsons 2004; Zarubin y Han 2005; Mebratu y Tesfaigzi 2009), dependiendo del tipo celular en cuestión, de si las células son cancerosas o normales e incluso según la localización sub-celular de la proteína que es activada. Los tratamientos cortos con 1,25D inducen en mioblastos la translocación reversa del VDR desde el núcleo hacia inmediaciones de la membrana plasmática (Capiati, Benassati y Boland 2002; Buitrago, Arango y Boland 2012). De acuerdo a esto, se postuló la formación de un complejo multiproteico de señalización en las caveolas, asociando a la proteína cav-1 con el VDR unido al 1,25D. Este complejo modula las cascadas de fosforilación en tirosina y regula en consecuencia el complejo VDR / Src (Buitrago, Arango y Boland 2012). A través de estos mecanismos, el 1,25D jugaría un rol importante en la miogénesis del músculo esquelético. Los resultados aquí presentados evidencian que el tratamiento con 1,25D de mioblastos aún mononucleares, pero arrestados y comprometidos en el programa de diferenciación (etapa de diferenciación temprana), promueve la activación rápida (15 minutos) de la p38 MAPK, la que se mantiene significativamente activa a los 30 minutos de estímulo hormonal. Esto concuerda con resultados previos que otorgan a p38 MAPK un rol importante en la diferenciación celular (Lassar 2009). Aunque la tirosina quinasa no receptora Src se activa recién significativamente a los 30 minutos de tratamiento, es muy probable que posea otro pico de activación a un tiempo menor, no investigado en esta Tesis pero sí evidenciado en estudios anteriores en mioblastos (Buitrago et al. 2000). La secuencia temporal de activación de Src y ERK 1/2 que he reportado en este trabajo es coincidente a lo reportado previamente en otros tipos celulares (Gocek, Kielbiński y Marcinkowska 2007).

Resultaron muy interesantes los hallazgos establecidos en células musculares carentes de la expresión del VDR (C2C12*shVDR*). Cuando la expresión del VDR se encuentra silenciada y estas células están en una etapa de diferenciación temprana, la activación de Src no se produce a los 30 minutos de inducción con 1,25D y sí se observa más tardía, a los 60 minutos de tratamiento, donde probablemente es necesitada en la expresión de proteínas promotoras de la diferenciación, no analizadas en el desarrollo de esta Tesis. De relevancia, no se determina la activación de ERK1/2 mostrando la dependencia del VDR en la fosforilación de esta quinasa, en forma análoga a lo reportado previamente en mioblastos proliferativos (Boland et al. 2002). El comportamiento de la fosforilación de p38 MAPK reafirma su rol clave durante todas las etapas de la diferenciación muscular, ya que si bien al no expresarse el VDR, p38 MAPK no se activa a 15 minutos de estímulo hormonal, si logra sobrellevar su fosforilación a 30 minutos, decayendo en forma muy significativa a 60 minutos de tratamiento con 1,25D, en mioblastos ya comprometidos a la diferenciación. La activación de p38 MAPK es un evento relevante e imprescindible para la entrada en el programa de diferenciación de los mioblastos inducidos por el tratamiento con el 1,25D y además existe una retroalimentación positiva entre la activación de la p38 MAPK y la expresión del VDR (Irazoqui, Boland y Buitrago 2014).

Durante los primeros pasos de la diferenciación de músculo esquelético, se produce la sobreexpresión de la ciclina D3, que es usada por los mioblastos comprometidos para prevenir que Rb se fosforile, manteniendo a las células arrestadas. En cambio la ciclina D1 mantiene constantes sus niveles proteicos o incluso puede disminuir su expresión (Saab, Spunt y Skapek 2011). Por otro lado, la cav-1 está presente en las caveolas de los mioblastos C2C12 y está implicada en la regulación de los eventos rápidos de activación de las vías de Src, p38 MAPK y ERK 1/2, inducidos por el tratamiento con la hormona esteroide, 1,25D (Buitrago y Boland 2010). El hecho de no determinar cambios en la expresión de cav-1 ni de las ciclinas D1 y D3, tanto en las células C2C12wt como en las carentes del VDR nos indica que la hormona no está a estos tiempos provocando cambios

en los niveles proteicos de estas proteínas y podría tener dos explicaciones alternativas: o bien estas proteínas no estén involucradas en forma directa en la diferenciación temprana de los mioblastos regulada por el 1,25D o bien habría que ampliar el intervalo de tiempo de estímulo hormonal a fin de poder observar el momento en el cual la hormona aumentaría en forma transitoria la expresión de, al menos ciclina D3.

En células de RMS, la activación de Src ha sido asociada al crecimiento celular tanto *in vitro* como *in vivo*, y su inhibición promueve el frenado del desarrollo celular (Casini et al. 2015; Abraham 2016). El receptor de productos finales de glicación avanzada (*receptor for advanced glycation end products* - RAGE) es un receptor multi-ligando con un papel positivo o negativo en la progresión del cáncer y metástasis en función del tipo de tumor. Existen evidencias reportadas de que el RAGE posee un rol importante en la regulación de la expresión/fosforilación de cav-1 y cav-3 y en la activación de Src en varios tipos celulares (Rossi et al. 2011; Perrone, Peluso y Melone 2008). En células de RMS, la capacidad de RAGE de activar a Src es un evento predictivo de la reducción de la proliferación, de la invasividad y del aumento de la diferenciación (Riuzzi, Sorci y Donato 2007). Aquí se ha determinado que el tratamiento con 1,25D durante 15 minutos, es suficiente para iniciar la activación de Src, siendo ésta máxima a los 30 minutos de estimulación. A 15 minutos de estimulación con 1,25D también se observa la fosforilación de MKK 3/6 y de p38 MAPK. Según Riuzzi *et al.*, el eje Src / MKK 3/6 / p38 MAPK promueve la diferenciación de las células de RMS (Riuzzi, Sorci y Donato 2007). Si bien los resultados evidencian un aumento en la activación de Src, MKK 3/6 y p38 MAPK a los 15 minutos de tratamiento con el 1,25D (1 nM), nunca fue observado ningún patrón de diferenciación celular, por el contrario mis resultados sostienen que el 1,25D está induciendo apoptosis a las 72 horas de tratamiento con 1,25D. Llamativamente, en los resultados se muestra además que existe una retroalimentación positiva entre la activación de Src y p38 MAPK, ya que al inhibir a p38 MAPK utilizando el inhibidor SB-203580, Src no es capaz de activarse por encima del control en respuesta al tratamiento corto con 1,25D (1

nM) y al inhibir a Src con PP1, p38 MAPK no logra su activación dependiente de la hormona. Considero que son necesarias mayores investigaciones para poder interpretar estos últimos resultados comentados.

Conclusión

Cuando el 1,25D ingresa en el interior de los mioblastos C2C12 en diferenciación temprana, promueve la activación de las vías de p38 MAPK y Src, de manera dependiente del VDR, ya que cuando éste se encuentra silenciado, los patrones de activación de las quinasas se producen más tardíamente.

A diferencia de células normales, en células de RMS, el 1,25D al ingresar a su interior activa rápidamente el eje Src / MKK 3/6 / p38 MAPK, y se observa un interesante fenómeno de autorregulación donde p38 MAPK posee un rol preponderante ya que al inhibirse farmacológicamente, no se determina activación de MKK 3/6 ni de Src.

Resumen

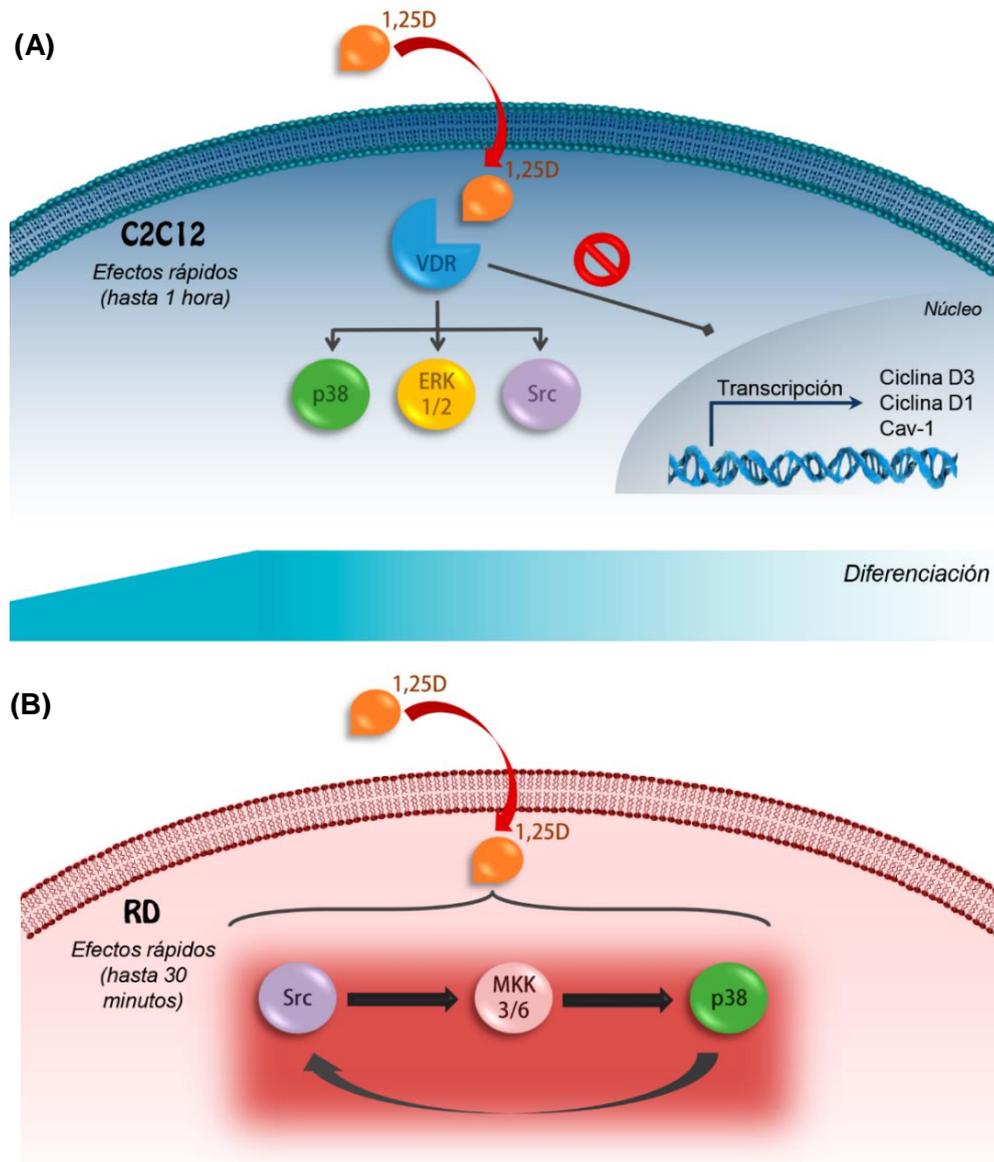
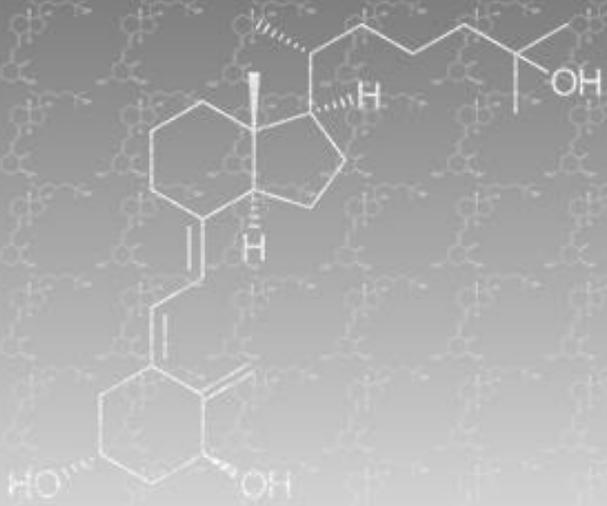


Ilustración 17. Resumen del capítulo III. (A) En las células C2C12 que están en la etapa de diferenciación temprana, en la fase de alineación (previa a la fusión para la formación del miotubo), la hormona esteroide 1,25D unida a su receptor tiene la capacidad de activar la tirosina quinasa no receptora Src y las MAPKs ERK 1/2 y p38 MAPK, a tiempos cortos (hasta de una hora), sin embargo no es capaz de modificar la expresión de proteínas claves en este proceso (como las ciclinas D1 y D3 y la cav-1) a tiempos tan cortos. **(B)** En las células RD, el 1,25D promueve la activación de p38 MAPK, vía su quinasa *upstream* inmediata MKK 3/6 y Src a tiempos cortos. De relevancia, se observó que la activación de p38 MAPK es necesaria para la activación de Src, pese a ser esta una quinasa *downstream* Src y MKK 3/6.



Conclusiones Generales

Rol del 1,25D en el ciclo celular de células musculares esqueléticas normales.

- El estímulo con 1,25D aumenta la expresión de VDR en C2C12wt, pero no en las C2C12shVDR, reafirmando que el silenciamiento del VDR con el shRNA elegido fue exitoso
- La distribución de las fases del ciclo celular en líneas C2C12wt y C2C12shVDR estimuladas con 10 % SFB, es similar. Sin embargo, el estímulo con 1,25D promueve un aumento en la fase S a las 12 horas y un arresto promotor de la diferenciación a 24 horas; eventos en los cuales la expresión de VDR es clave. Durante el arresto pro-diferenciativo, es necesaria la activación de p38 MAPK.
- El 1,25D aumenta los niveles de las CDK 4/6 de manera dependiente de la expresión del VDR, a 6 horas de tratamiento hormonal, y en este aumento participan ERK1/2 y las isoformas α y β de p38 MAPK.
- El tratamiento con la hormona esteroide 1,25D durante las 12 horas, promueve la co-localización de la CDK 4 con el VDR y provoca una relocalización de la CDK 6 en la periferia del núcleo.
- El VDR y p38 MAPK participan en la expresión de la Ciclina D3. Además, el estímulo hormonal promueve la co-localización del VDR y la ciclina D3 de manera dependiente de la activación de la p38 MAPK.
- El aumento promovido por el 1,25D de CKI p21^{waf1/Cip1} y de p27^{Kip1} es dependiente del VDR y de la activación de p38 MAPK
- La expresión de miogenina es inducida por el 1,25D en el músculo esquelético solo cuando el VDR está expresado y requiere la activación de p38 MAPK. Además, El

silenciamiento de la ciclina D3 afecta la expresión del VDR y de la miogenina en células musculares.

Rol del 1,25D en el ciclo celular de células musculares esqueléticas transformadas

- Se determinó que las células de RMS de la línea RD expresan el VDR y el tratamiento con 1,25D a diferentes dosis promueve un aumento de su expresión tanto a 24 como a 48 horas, aunque a 72 horas provoca una disminución en la expresión de este receptor.
- El tratamiento de células RD con 1,25D disminuye la cantidad de células viables a 72 horas y promueve aumentos en las fases G0/G1 y G2/M. Mostrando una inhibición en la proliferación, confirmada por el aumento en la expresión del CKI p15^{INK4b} a este mismo tiempo.
- El tratamiento con 1,25D durante 72 horas, no provoca cambios morfológicos en las células RD y disminuye la expresión de marcadores tempranos de diferenciación muscular, demostrando que este estímulo no conduce a la re-diferenciación de estas células cancerosas.
- El 1,25D induce reguladores claves de la apoptosis, promueve la desorganización de la red mitocondrial y la picnosis mitocondrial a 72 horas de tratamiento. Al mismo tiempo que se observa una disminución en el porcentaje de células vivas y aumenta el porcentaje de células en apoptosis.

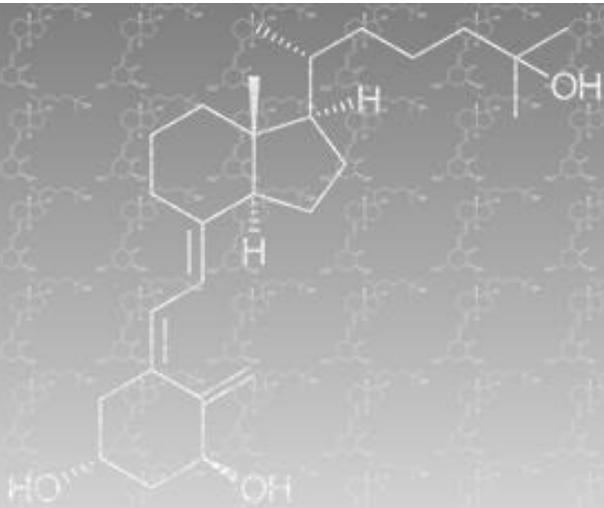
Acciones rápidas no-genómicas del 1,25D en células musculares normales y de rhabdomiosarcoma

- El 1,25D promueve la activación de ERK 1/2, p38 MAPK y Src rápidamente en C2C12 en diferenciación, dependiente de la expresión del VDR.

- El tratamiento con 1,25D en células C2C12wt y en células C2C12shVDR no provoca cambios en la expresión de cav-1, ciclina D1 o ciclina D3.
- El tratamiento con 1,25D promueve la activación la vía de Src / MKK 3/6 / p38 MAPK, donde la inhibición de la p38 MAPK, no permite la activación de las quinasas Src y MKK 3/6.

Interpretación Final

- El metabolito activo de la vitamina D, el calcitriol tiene efectos opuestos en el músculo esquelético normal y el transformado, ya que en el primero promueve la proliferación seguida de un arresto pro-diferenciativo y la consecuente diferenciación, mientras que en el RMS la hormona desencadena la apoptosis.
- Estos efectos tan contradictorios, son desencadenados por proteínas y vías similares, a través de una modulación selectiva del ciclo celular, por ejemplo: en músculo esquelético normal se evidencia un aumento en la CDK4 que promueve la proliferación previa a la diferenciación, sin embargo, en RMS, el aumento de esta CDK, se da cuando la célula está entrando en apoptosis.



Referencias Bibliográficas

- ABRAHAM, S.T., 2016. A role for the Wnt3a/ β -catenin signaling pathway in the myogenic program of C2C12 cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* [en línea], ISSN 1071-2690. DOI 10.1007/s11626-016-0058-5. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s11626-016-0058-5>.
- ALI, M.M. y VAIDYA, V., 2011. Vitamin D and cancer. En: D.L. TRUMP y C.S. JOHNSON (eds.), *Journal of cancer research and therapeutics* [en línea]. New York, NY: Springer New York, pp. 225-30. ISBN 978-1-4419-7187-6. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-7188-3>.
- ALTAN, E., ZÖLLNER, A., AVCI, O. y RÖHRLE, O., 2016. Towards modelling skeletal muscle growth and adaptation. *Pamm* [en línea], vol. 16, no. 1, pp. 921-924. ISSN 16177061. DOI 10.1002/pamm.201610448. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/pamm.201610448>.
- ANDERSON, P.H., O'LOUGHLIN, P.D., MAY, B.K. y MORRIS, H.A., 2005. Modulation of CYP27B1 and CYP24 mRNA expression in bone is independent of circulating 1,25(OH)₂D₃ levels. *Bone* [en línea], vol. 36, no. 4, pp. 654-62. ISSN 8756-3282. DOI 10.1016/j.bone.2005.01.012. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15781002>.
- ANDRÉS, V. y WALSH, K., 1996. Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. *Journal of Cell Biology*, vol. 132, no. 4, pp. 657-666. ISSN 00219525. DOI 10.1083/jcb.132.4.657.
- ARGILÉS, J.M., CAMPOS, N., LOPEZ-PEDROSA, J.M., RUEDA, R. y RODRIGUEZ-MAÑAS, L., 2016. Skeletal Muscle Regulates Metabolism via Interorgan Crosstalk: Roles in Health and Disease. *Journal of the American Medical Directors Association* [en línea], vol. 17, no. 9, pp. 789-96. ISSN 1538-9375. DOI 10.1016/j.jamda.2016.04.019. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jamda.2016.04.019>.
- AVNI, D., YANG, H., MARTELLI, F., HOFMANN, F., ELSHAMY, W.M., GANESAN, S., SCULLY, R. y LIVINGSTON, D.M., 2003. Active Localization of the Retinoblastoma Protein in Chromatin and Its Response to S Phase DNA Damage. *Molecular Cell* [en línea], vol. 12, no. 3, pp. 735-746. ISSN 10972765. DOI 10.1016/S1097-2765(03)00355-1. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24876129>.
- BAI, Y., YU, Y., YU, B., GE, J., JI, J., LU, H., WEI, J., WENG, Z., TAO, Z. y LU, J., 2009. Association of vitamin D receptor polymorphisms with the risk of prostate cancer in the Han population of Southern China. *BMC Medical Genetics* [en línea], vol. 10, no. 1, pp. 125. ISSN 1471-2350. DOI 10.1186/1471-2350-10-125. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2796660&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- BEAUCHAMP, J.R., HESLOP, L., YU, D.S., TAJBAKHS, S., KELLY, R.G., WERNIG, A., BUCKINGHAM, M.E., PARTRIDGE, T.A. y ZAMMIT, P.S., 2000. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *The Journal of cell biology* [en línea], vol. 151, no. 6, pp. 1221-34. ISSN 0021-9525. Disponible en: papers3://publication/uuid/5A07905E-86B9-4DB1-A3B3-B778307FBFCF.
- BENTZINGER, C.F., WANG, Y.X. y RUDNICKI, M.A., 2012. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* [en línea], vol. 4, no. 2, pp. a008342-a008342. ISSN 1943-0264. DOI 10.1101/cshperspect.a008342. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22300977>.
- BERTHO, Á.L., SANTIAGO, M.A. y COUTINHO, S.G., 2000. Flow cytometry in the study of cell death. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [en línea], vol. 95, no. 3, pp. 429-433. DOI 10.1590/S0074-02762000000300020. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762000000300020&lng=en&tng=en.
- BERTOLI, C., SKOTHEIM, J.M. y DE BRUIN, R.A.M., 2013. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature reviews. Molecular cell biology* [en línea], vol. 14, no. 8, pp. 518-28. ISSN 1471-0080. DOI 10.1038/nrm3629. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23877564>.
- BIKLE, D.D., 2012. Vitamin D and bone. *Current osteoporosis reports* [en línea], vol. 10, no. 2, pp. 151-9. ISSN 1544-2241. DOI 10.1007/s11914-012-0098-z. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s11914-012-0098-z>.
- BIVINS, R., 2014. Ideology and disease identity: the politics of rickets, 1929-1982. *Medical humanities* [en línea], vol. 40, no. 1, pp. 3-10. ISSN 1473-4265. DOI 10.1136/medhum-2013-010400. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23918817>.
- BLONDELLE, J., SHAPIRO, P., DOMENIGHETTI, A.A. y LANGE, S., 2017. Cullin E3 ligase activity is required for myoblast differentiation. *Journal of Molecular Biology* [en línea], ISSN 00222836. DOI 10.1016/j.jmb.2017.02.012. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28238764>.
- BOIVIN, G., MESGUICH, P., PIKE, J.W., BOUILLON, R., MEUNIER, P.J., HAUSSLER, M.R., DUBOIS, P.M. y MOREL, G., 1987. Ultrastructural immunocytochemical localization of endogenous 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its receptors in osteoblasts and osteocytes from neonatal mouse and rat calvaria. *Bone and mineral* [en línea], vol. 3, no. 2, pp. 125-36. ISSN 0169-6009. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2850050>.
- BOLAND, R.L., 2011. VDR activation of intracellular signaling pathways in skeletal muscle. *Molecular and cellular endocrinology* [en línea], vol. 347, no. 1-2, pp. 11-6. ISSN 1872-8057. DOI

10.1016/j.mce.2011.05.021. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21664245>.

BOLAND, R.L., BUITRAGO, C.G. y DE BOLAND, A.R., 2005. Modulation of tyrosine phosphorylation signalling pathways by 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* [en línea], vol. 16, no. 6, pp. 280-7. ISSN 1043-2760. DOI 10.1016/j.tem.2005.06.003. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16002300>.

BOLAND, R.L., DE BOLAND, A.R., BUITRAGO, C.G., MORELLI, S., SANTILLÁN, G., VAZQUEZ, G., CAPIATI, D.A. y BALDI, C., 2002. Non-genomic stimulation of tyrosine phosphorylation cascades by 1,25(OH)₂D₃ by VDR-dependent and -independent mechanisms in muscle cells. *Steroids* [en línea], vol. 67, no. 6, pp. 477-482. ISSN 0039128X. DOI 10.1016/S0039-128X(01)00182-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11960624>.

BOYAN, B.D., SYLVIA, V.L., MCKINNEY, N. y SCHWARTZ, Z., 2003. Membrane actions of vitamin D metabolites 1 α ,25(OH)₂D₃ and 24R,25(OH)₂D₃ are retained in growth plate cartilage cells from vitamin D receptor knockout mice. *Journal of cellular biochemistry* [en línea], vol. 90, no. 6, pp. 1207-23. ISSN 0730-2312. DOI 10.1002/jcb.10716. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14635194>.

BRONNER, F., FARACH-CARSON, M.C. y FARACH-CARSON, M., 2003. *Bone Formation* [en línea]. S.I.: Springer. Topics in Bone Biology. ISBN 9781852337179. Disponible en: <https://books.google.com.ar/books?id=ES6XHkFqI1cC>.

BUITRAGO, C. y BOLAND, R., 2010. Caveolae and caveolin-1 are implicated in 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃-dependent modulation of Src, MAPK cascades and VDR localization in skeletal muscle cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* [en línea], vol. 121, no. 1-2, pp. 169-75. ISSN 1879-1220. DOI 10.1016/j.jsbmb.2010.03.002. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20211253>.

BUITRAGO, C., VAZQUEZ, G., DE BOLAND, A.R. y BOLAND, R.L., 2000. Activation of Src kinase in skeletal muscle cells by 1, 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ correlates with tyrosine phosphorylation of the vitamin D receptor (VDR) and VDR-Src interaction. *Journal of cellular biochemistry* [en línea], vol. 79, no. 2, pp. 274-81. ISSN 0730-2312. DOI 10.1002/1097-4644(20001101)79:2<274::AID-JCB100>3.0.CO;2-R. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967554>.

BUITRAGO, C.G., 2002. *Estimulación de tirosinas quinasas en células de músculo esquelético por la hormona esteroideal 1,25(OH)₂D₃*. S.I.: Universidad Nacional del Sur.

BUITRAGO, C.G., ARANGO, N.S. y BOLAND, R.L., 2012. 1 α ,25(OH)₂D₃-dependent modulation of Akt in proliferating and differentiating C2C12 skeletal muscle cells. *Journal of cellular biochemistry* [en línea], vol. 113, no. 4, pp. 1170-81. ISSN 1097-4644. DOI 10.1002/jcb.23444.

Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22095470>.

BUITRAGO, C.G., BOLAND, R.L. y DE BOLAND, A.R., 2001. The tyrosine kinase c-Src is required for 1,25(OH)₂-vitamin D₃ signalling to the nucleus in muscle cells. *Biochimica et biophysica acta* [en línea], vol. 1541, no. 3, pp. 179-87. ISSN 0006-3002. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11755212>.

BUITRAGO, C.G., COSTABEL, M. y BOLAND, R.L., 2011. PKC and PTP α participate in Src activation by 1 α ,25OH₂ vitamin D₃ in C2C12 skeletal muscle cells. *Molecular and cellular endocrinology* [en línea], vol. 339, no. 1-2, pp. 81-9. ISSN 1872-8057. DOI 10.1016/j.mce.2011.03.022. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21459125>.

BUITRAGO, C.G., PARDO, V.G. y BOLAND, R.L., 2013. Role of VDR in 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent non-genomic activation of MAPKs, Src and Akt in skeletal muscle cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* [en línea], vol. 136, no. 1, pp. 125-130. ISSN 09600760. DOI 10.1016/j.jsbmb.2013.02.013. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.02.013>.

BUITRAGO, C.G., PARDO, V.G., DE BOLAND, A.R. y BOLAND, R.L., 2003. Activation of RAF-1 through Ras and protein kinase Calpha mediates 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in muscle cells. *The Journal of biological chemistry* [en línea], vol. 278, no. 4, pp. 2199-205. ISSN 0021-9258. DOI 10.1074/jbc.M205732200. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12417593>.

BUITRAGO, C.G., RONDA, A.C., DE BOLAND, A.R. y BOLAND, R.L., 2006. MAP kinases p38 and JNK are activated by the steroid hormone 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ in the C2C12 muscle cell line. *Journal of cellular biochemistry* [en línea], vol. 97, no. 4, pp. 698-708. ISSN 0730-2312. DOI 10.1002/jcb.20639. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16215981>.

BURATTINI, S., FERRI, R., BATTISTELLI, M., CURCI, R., LUCHETTI, F. y FALCIERI, E., 2004. C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: Morpho-functional characterization. *European Journal of Histochemistry*, vol. 48, no. 3, pp. 223-233. ISSN 1121760X. DOI 10.4081/891.

CALVO, N., MARTÍN, M.J., DE BOLAND, A.R. y GENTILI, C., 2014. Involvement of ERK1/2, p38 MAPK, and PI3K/Akt signaling pathways in the regulation of cell cycle progression by PTHrP in colon adenocarcinoma cells. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* [en línea], vol. 92, no. 4, pp. 305-15. ISSN 1208-6002. DOI 10.1139/bcb-2013-0106. Disponible en: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/bcb-2013-0106>.

CAMPBELL, F.C., XU, H., EL-TANANI, M., CROWE, P. y BINGHAM, V., 2010. The yin and yang of vitamin D receptor (VDR) signaling in neoplastic progression: operational networks and tissue-

- specific growth control. *Biochemical pharmacology* [en línea], vol. 79, no. 1, pp. 1-9. ISSN 1873-2968. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19737544>.
- CÁNEPA, E.T., SCASSA, M.E., CERUTI, J.M., MARAZITA, M.C., CARCAGNO, A.L., SIRKIN, P.F. y OGARA, M.F., 2007. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life* [en línea], vol. 59, no. 7, pp. 419-426. ISSN 1521-6543. DOI 10.1080/15216540701488358. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17654117>.
- CAPIATI, D.A., BENASSATI, S. y BOLAND, R.L., 2002. 1,25(OH)₂-vitamin D₃ induces translocation of the vitamin D receptor (VDR) to the plasma membrane in skeletal muscle cells. *Journal of cellular biochemistry* [en línea], vol. 86, no. 1, pp. 128-35. ISSN 0730-2312. DOI 10.1002/jcb.10191. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12112023>.
- CAPIATI, D.A., TÉLLEZ-IÑÓN, M.T. y BOLAND, R.L., 1999. Participation of protein kinase C alpha in 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ regulation of chick myoblast proliferation and differentiation. *Molecular and cellular endocrinology* [en línea], vol. 153, no. 1-2, pp. 39-45. ISSN 0303-7207. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10459852>.
- CARLBERG, C. y CAMPBELL, M.J., 2013. Vitamin D receptor signaling mechanisms: Integrated actions of a well-defined transcription factor. *Steroids* [en línea], vol. 78, no. 2, pp. 127-136. ISSN 0039128X. DOI 10.1016/j.steroids.2012.10.019. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2012.10.019>.
- CASINI, N., FORTE, I.M., MASTROGIOVANNI, G., PENTIMALLI, F., ANGELUCCI, A., FESTUCCIA, C., TOMEI, V., CECCHERINI, E., DI MARZO, D., SCHENONE, S., BOTTA, M., GIORDANO, A. y INDOVINA, P., 2015. SRC family kinase (SFK) inhibition reduces rhabdomyosarcoma cell growth in vitro and in vivo and triggers p38 MAP kinase-mediated differentiation. *Oncotarget* [en línea], vol. 6, no. 14, pp. 12421-35. ISSN 1949-2553. DOI 10.18632/oncotarget.3043. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25762618>.
- CEGLIA, L. y HARRIS, S.S., 2013. Vitamin D and its role in skeletal muscle. *Calcified Tissue International*, vol. 92, no. 2, pp. 151-162. ISSN 0171967X. DOI 10.1007/s00223-012-9645-y.
- CERRI, A.P., BELLELLI, G., MAZZONE, A., PITTELLA, F., LANDI, F., ZAMBON, A. y ANNONI, G., 2015. Sarcopenia and malnutrition in acutely ill hospitalized elderly: Prevalence and outcomes. *Clinical Nutrition* [en línea], vol. 34, no. 4, pp. 745-751. ISSN 15321983. DOI 10.1016/j.clnu.2014.08.015. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25263170>.
- CHEADLE, W.B., 1888. A Discussion on Rickets, in the Section of Diseases of Children at the Annual Meeting of the British Medical Association, held in Glasgow, August, 1888: I.—Introductory Remarks on Etiology; Prevention; Connection with Syphilis and Scurvy; Nature of the En. *British Medical Journal* [en línea], vol. 2, no. 1456, pp. 1145-1148. ISSN 0007-1447. DOI

- 10.1136/bmj.2.1456.1145. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2198697/>.
- CHENG, H.-T., CHEN, J.-Y., HUANG, Y.-C., CHANG, H.-C. y HUNG, W.-C., 2006. Functional role of VDR in the activation of p27Kip1 by the VDR/Sp1 complex. *Journal of cellular biochemistry* [en línea], vol. 98, no. 6, pp. 1450-6. ISSN 0730-2312. DOI 10.1002/jcb.20780. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.20780>.
- CHENU, C., VALENTIN-OPRAN, A., CHAVASSIEUX, P., SAEZ, S., MEUNIER, P.J. y DELMAS, P.D., 1990. Insulin like growth factor I hormonal regulation by growth hormone and by 1,25(OH)2D3 and activity on human osteoblast-like cells in short-term cultures. *Bone* [en línea], vol. 11, no. 2, pp. 81-6. ISSN 8756-3282. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2357426>.
- CHIANG, K.-C. y CHEN, T.C., 2013. The anti-cancer actions of vitamin D. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* [en línea], vol. 13, no. 1, pp. 126-39. ISSN 1875-5992. DOI 10.2174/1871520611307010126. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23094926>.
- CRAIG, T.A., ZHANG, Y., MAGIS, A.T., FUNK, C.C., PRICE, N.D., EKKER, S.C. y KUMAR, R., 2014. Detection of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D-regulated miRNAs in zebrafish by whole transcriptome sequencing. *Zebrafish* [en línea], vol. 11, no. 3, pp. 207-18. ISSN 1557-8542. DOI 10.1089/zeb.2013.0899. Disponible en: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/zeb.2013.0899>.
- CRAIG, W. y BELKIN, M., 1925. The prevention and cure of rickets. *The Scientific Monthly*, vol. 20, no. 5, pp. 541-550.
- DANCSOK, A.R., ASLEH-ABURAYA, K. y NIELSEN, T.O., 2016. Advances in sarcoma diagnostics and treatment. *Oncotarget* [en línea], ISSN 1949-2553. DOI 10.18632/oncotarget.12548. Disponible en: <http://www.oncotarget.com/abstract/12548>.
- DARWISH, H.M. y DELUCA, H.F., 1996. Recent advances in the molecular biology of vitamin D action. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* [en línea], vol. 53, pp. 321-344. ISSN 0079-6603. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8650307>.
- DAVIE, J.K., CHO, J.-H., MEADOWS, E., FLYNN, J.M., KNAPP, J.R. y KLEIN, W.H., 2007. Target gene selectivity of the myogenic basic helix-loop-helix transcription factor myogenin in embryonic muscle. *Developmental biology* [en línea], vol. 311, no. 2, pp. 650-64. ISSN 1095-564X. DOI 10.1016/j.ydbio.2007.08.014. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160607012602>.
- DE LUCA, G., FERRETTI, R., BRUSCHI, M., MEZZAROMA, E. y CARUSO, M., 2013. Cyclin D3 critically regulates the balance between self-renewal and differentiation in skeletal muscle stem

- cells. *Stem Cells* [en línea], vol. 31, no. 11, pp. 2478-2491. ISSN 10665099. DOI 10.1002/stem.1487. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23897741>.
- DE SANTA, F., ALBINI, S., MEZZAROMA, E., BARON, L., FELSANI, A. y CARUSO, M., 2007. pRb-dependent cyclin D3 protein stabilization is required for myogenic differentiation. *Molecular and cellular biology*, vol. 27, no. 20, pp. 7248-7265. ISSN 0270-7306. DOI 10.1128/MCB.02199-06.
- DEDIEU, S., MAZERES, G., COTTIN, P. y BRUSTIS, J.J., 2002. Involvement of myogenic regulator factors during fusion in the cell line C2C12. *International Journal of Developmental Biology*, vol. 46, no. 2, pp. 235-241. ISSN 02146282.
- DEMCHENKO, A.P., 2012. The change of cellular membranes on apoptosis: fluorescence detection. *Experimental oncology* [en línea], vol. 34, no. 3, pp. 263-8. ISSN 1812-9269. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23070011>.
- DESAGHER, S. y MARTINO, J.C., 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology*, vol. 10, no. 9, pp. 369-377. ISSN 09628924. DOI 10.1016/S0962-8924(00)01803-1.
- DÍAZ, L., DÍAZ-MUÑOZ, M., GARCÍA-GAYTÁN, A.C. y MÉNDEZ, I., 2015. Mechanistic Effects of Calcitriol in Cancer Biology. *Nutrients* [en línea], vol. 7, no. 6, pp. 5020-50. ISSN 2072-6643. DOI 10.3390/nu7065020. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26102214>.
- DIRKS-NAYLOR, A.J. y LENNON-EDWARDS, S., 2011. The effects of vitamin D on skeletal muscle function and cellular signaling. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* [en línea], vol. 125, no. 3-5, pp. 159-168. ISSN 09600760. DOI 10.1016/j.jsbmb.2011.03.003. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.03.003>.
- DOBASHI, Y., GOTO, A., FUKAYAMA, M., ABE, A. y OOI, A., 2004. Overexpression of cdk4/cyclin D1, a possible mediator of apoptosis and an indicator of prognosis in human primary lung carcinoma. *International Journal of Cancer* [en línea], vol. 110, no. 4, pp. 532-541. ISSN 0020-7136. DOI 10.1002/ijc.20167. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.20167>.
- DOBASHI, Y., TAKEHANA, T. y OOI, A., 2003. [General Articles] Perspectives on Cancer Therapy: Cell Cycle Blockers and Perturbators. *Current Medicinal Chemistry* [en línea], vol. 10, no. 23, pp. 2549-2558. ISSN 09298673. DOI 10.2174/0929867033456495. Disponible en: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=0929-8673&volume=10&issue=23&page=2549>.
- DOROUDI, M., CHEN, J., BOYAN, B.D. y SCHWARTZ, Z., 2014. New insights on membrane mediated effects of 1 α ,25-dihydroxy vitamin D3 signaling in the musculoskeletal system. *Steroids* [en línea], vol. 81, pp. 81-87. ISSN 18785867. DOI 10.1016/j.steroids.2013.10.019. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2013.10.019>.

- DOROUDI, M., SCHWARTZ, Z. y BOYAN, B.D., 2015. Membrane-mediated actions of 1,25-dihydroxy vitamin D3: a review of the roles of phospholipase A2 activating protein and Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* [en línea], vol. 147, no. 0, pp. 81-4. ISSN 1879-1220. DOI 10.1016/j.jsbmb.2014.11.002. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096007601400257X>.
- DUBIŃSKA-MAGIERA, M., JABŁOŃSKA, J., SACZKO, J., KULBACKA, J., JAGLA, T. y DACZEWSKA, M., 2014. Contribution of small heat shock proteins to muscle development and function. *FEBS letters* [en línea], vol. 588, no. 4, pp. 517-30. ISSN 1873-3468. DOI 10.1016/j.febslet.2014.01.005. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579314000210>.
- DURONIO, R.J. y XIONG, Y., 2013. Signaling pathways that control cell proliferation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* [en línea], vol. 5, no. 3, pp. a008904. ISSN 1943-0264. DOI 10.1101/cshperspect.a008904. Disponible en: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a008904>.
- EL-DEIRY, W.S., HARPER, J.W., O'CONNOR, P.M., VELCULESCU, V.E., CANMAN, C.E., JACKMAN, J., PIETENPOL, J.A., BURRELL, M., HILL, D.E. y WANG, Y., 1994. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer research* [en línea], vol. 54, no. 5, pp. 1169-74. ISSN 0008-5472. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8118801>.
- ENDO, I., INOUE, D., MITSUI, T., UMAKI, Y., AKAIKE, M., YOSHIZAWA, T., KATO, S. y MATSUMOTO, T., 2003. Deletion of Vitamin D Receptor Gene in Mice Results in Abnormal Skeletal Muscle Development with Deregulated Expression of Myoregulatory Transcription Factors. *Endocrinology*, vol. 144, no. 12, pp. 5138-5144. ISSN 00137227. DOI 10.1210/en.2003-0502.
- ENDO, T., 2015. Molecular mechanisms of skeletal muscle development, regeneration, and osteogenic conversion. *Bone* [en línea], vol. 80, pp. 2-13. ISSN 87563282. DOI 10.1016/j.bone.2015.02.028. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2015.02.028>.
- FANG, Y., VAN MEURS, J.B.J., D'ALELIO, A., JHAMAI, M., ZHAO, H., RIVADENEIRA, F., HOFMAN, A., VAN LEEUWEN, J.P.T., JEHAN, F., POLS, H.A.P. y UITTERLINDEN, A.G., 2005. Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin d receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the rotterdam study. *American journal of human genetics* [en línea], vol. 77, no. 5, pp. 807-23. ISSN 0002-9297. DOI 10.1086/497438. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000292970763362X>.
- FAVIER, F.B., BENOIT, H. y FREYSSENET, D., 2008. Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, vol. 456, no. 3, pp. 587-600. ISSN 00316768. DOI 10.1007/s00424-007-0423-z.

- FELIX, C.A., KAPPEL, C.C., MITSUDOMI, T., NAU, M.M., TSOKOS, M., CROUCH, G.D., NISEN, P.D., WINICK, N.J. y HELMAN, L.J., 1992. Frequency and diversity of p53 mutations in childhood rhabdomyosarcoma. *Cancer research* [en línea], vol. 52, no. 8, pp. 2243-7. ISSN 0008-5472. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1559227>.
- FISHER, D., KRASINSKA, L., COUDREUSE, D. y NOVAK, B., 2012. Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transitions. *Journal of Cell Science* [en línea], vol. 125, no. 20, pp. 4703-4711. ISSN 0021-9533. DOI 10.1242/jcs.106351. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23223895>.
- FLETCHER, C.D.M., UNNI, K.K., MERTENS, F. y (EDS), 2002. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone*. Lyon, France: IARC Press. ISBN 92 832 2413 2.
- FLORINI, J.R., EWTON, D.Z. y MAGRI, K. a, 1991. Hormones, growth factors, and myogenic differentiation. *Annual review of physiology* [en línea], vol. 53, no. 63, pp. 201-16. ISSN 0066-4278. DOI 10.1146/annurev.ph.53.030191.001221. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2042960>.
- FRANKLIN, D.S. y XIONG, Y., 1996. Induction of p18INK4c and its predominant association with CDK4 and CDK6 during myogenic differentiation. *Molecular biology of the cell* [en línea], vol. 7, no. 10, pp. 1587-99. ISSN 1059-1524. DOI 10.1091/mbc.7.10.1587. Disponible en: <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.7.10.1587>.
- FREEDMAN, L.P., 1999. Transcriptional targets of the vitamin D3 receptor-mediating cell cycle arrest and differentiation. *The Journal of nutrition* [en línea], vol. 129, no. 2S Suppl, pp. 581S-586S. ISSN 0022-3166. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10064337>.
- FURLONG, M.A., MENTZEL, T. y FANBURG-SMITH, J.C., 2001. Pleomorphic rhabdomyosarcoma in adults: a clinicopathologic study of 38 cases with emphasis on morphologic variants and recent skeletal muscle-specific markers. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* [en línea], vol. 14, no. 6, pp. 595-603. ISSN 0893-3952. DOI 10.1038/modpathol.3880357. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11406662>.
- GAFFNEY, E.F., DERVAN, P.A. y FLETCHER, C.D., 1993. Pleomorphic rhabdomyosarcoma in adulthood. Analysis of 11 cases with definition of diagnostic criteria. *The American journal of surgical pathology* [en línea], vol. 17, no. 6, pp. 601-9. ISSN 0147-5185. DOI 10.1097/00000478-199306000-00008. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8333559>.
- GARCIA, L. a, FERRINI, M.G., NORRIS, K.C. y ARTAZA, J.N., 2013. 1,25(OH)(2)vitamin D(3)

- enhances myogenic differentiation by modulating the expression of key angiogenic growth factors and angiogenic inhibitors in C(2)C(12) skeletal muscle cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* [en línea], vol. 133, pp. 1-11. ISSN 1879-1220. DOI 10.1016/j.jsbmb.2012.09.004. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960076012001604>.
- GARCIA, L. a, KING, K.K., FERRINI, M.G., NORRIS, K.C. y ARTAZA, J.N., 2011. 1,25(OH)₂vitamin D₃ stimulates myogenic differentiation by inhibiting cell proliferation and modulating the expression of promyogenic growth factors and myostatin in C2C12 skeletal muscle cells. *Endocrinology*, vol. 152, no. 8, pp. 2976-2986. ISSN 1945-7170. DOI 10.1210/en.2011-0159.
- GAVET, O. y PINES, J., 2010. Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *The Journal of cell biology* [en línea], vol. 189, no. 2, pp. 247-59. ISSN 1540-8140. DOI 10.1083/jcb.200909144. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20404109>.
- GIANGRECO, A.A., VAISHNAV, A., WAGNER, D., FINELLI, A., FLESHNER, N., VAN DER KWAST, T., VIETH, R. y NONN, L., 2013. Tumor suppressor microRNAs, miR-100 and -125b, are regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D in primary prostate cells and in patient tissue. *Cancer Prevention Research* [en línea], vol. 6, no. 5, pp. 483-494. ISSN 19406207. DOI 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0253. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23503652>.
- GIRGIS, C.M., CLIFTON-BLIGH, R.J., HAMRICK, M.W., HOLICK, M.F. y GUNTON, J.E., 2013. The roles of vitamin D in skeletal muscle: Form, function, and metabolism. *Endocrine Reviews*, vol. 34, no. 1, pp. 33-83. ISSN 0163769X. DOI 10.1210/er.2012-1012.
- GIRGIS, C.M., CLIFTON-BLIGH, R.J., MOKBEL, N., CHENG, K. y GUNTON, J.E., 2013. Vitamin D signaling regulates proliferation, differentiation, and myotube size in C2C12 skeletal muscle cells. *Endocrinology* [en línea], vol. 155, no. 2, pp. 347-357. ISSN 00137227. DOI 10.1210/en.2013-1205. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24280059>.
- GIULIETTI, A., OVERBERGH, L., VALCKX, D., DECALLONNE, B., BOUILLON, R. y MATHIEU, C., 2001. An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods* [en línea], vol. 25, no. 4, pp. 386-401. DOI 10.1006/meth.2001.1261. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202301912617>.
- GLASS, D., LENS, M., SWAMINATHAN, R., SPECTOR, T.D. y BATAILLE, V., 2009. Pigmentation and vitamin D metabolism in caucasians: Low vitamin D serum levels in fair skin types in the UK. *PLoS ONE*, vol. 4, no. 8, pp. 4-8. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0006477.
- GOCEK, E., KIEŁBIŃSKI, M. y MARCINKOWSKA, E., 2007. Activation of intracellular signaling pathways is necessary for an increase in VDR expression and its nuclear translocation. *FEBS*

- letters* [en línea], vol. 581, no. 9, pp. 1751-7. ISSN 0014-5793. DOI 10.1016/j.febslet.2007.03.055. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17418144>.
- GONG, G., HAYNATZKI, G., HAYNATZKA, V., HOWELL, R., KOSOKO-LASAKI, S., FU, Y.-X., YU, F., GALLAGHER, J.C. y WILSON, M.R., 2006. Bone mineral density-affecting genes in Africans. *Journal of the National Medical Association* [en línea], vol. 98, no. 7, pp. 1102-1108. ISSN 0027-9684. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16895279>.
- GONZALEZ-PARDO, V., D'ELIA, N., VERSTUYF, A., BOLAND, R.L. y RUSSO DE BOLAND, A., 2012. NFκB pathway is down-regulated by 1α,25(OH)(2)-vitamin D(3) in endothelial cells transformed by Kaposi sarcoma-associated herpes virus G protein coupled receptor. *Steroids* [en línea], vol. 77, no. 11, pp. 1025-32. ISSN 1878-5867. DOI 10.1016/j.steroids.2012.05.006. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039128X12001808>.
- GONZÁLEZ-PARDO, V., SUARES, A., VERSTUYF, A., DE CLERCQ, P., BOLAND, R.L. y DE BOLAND, A.R., 2014. Cell cycle arrest and apoptosis induced by 1α,25(OH)2D3 and TX 527 in Kaposi sarcoma is VDR dependent. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* [en línea], vol. 144 Pt A, pp. 197-200. ISSN 1879-1220. DOI 10.1016/j.jsbmb.2013.11.014. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24316429>.
- GUO, K., WANG, J., ANDRÉS, V., SMITH, R.C. y WALSH, K., 1995. MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Molecular and cellular biology* [en línea], vol. 15, no. 7, pp. 3823-9. ISSN 0270-7306. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=230621&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- GURUNG, R. y PARNAIK, V.K., 2012. Cyclin D3 promotes myogenic differentiation and Pax7 transcription. *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 113, no. 1, pp. 209-219. ISSN 07302312. DOI 10.1002/jcb.23346.
- HANNAN, M.T., LITMAN, H.J., ARAUJO, A.B., MCLENNAN, C.E., MCLEAN, R.R., MCKINLAY, J.B., CHEN, T.C. y HOLICK, M.F., 2008. Serum 25-hydroxyvitamin D and bone mineral density in a racially and ethnically diverse group of men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 93, no. 1, pp. 40-46. ISSN 0021972X. DOI 10.1210/jc.2007-1217.
- HANSEN, C.M., BINDERUP, L., HAMBERG, K.J. y CARLBERG, C., 2001. Vitamin D and cancer: effects of 1,25(OH)2D3 and its analogs on growth control and tumorigenesis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* [en línea], vol. 6, no. 1, pp. D820-48. ISSN 1093-9946. DOI 10.2741/Hansen. Disponible en: <http://www.bioscience.org/u37153137/gaDTRQo7632rgysaGWQYT64356/2001/v6/d/hansen/hansen.pdf>.

- HARCOURT, A.H., 2016. Human phylogeography and diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [en línea], vol. 113, no. 29, pp. 8072-8. ISSN 1091-6490. DOI 10.1073/pnas.1601068113. Disponible en: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1601068113>.
- HARPER, J.W., 1997. Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Surv* [en línea], vol. 29, pp. 91-107. ISSN 0261-2429. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9338098>.
- HAUSSLER, M.R., HAUSSLER, C.A., JURUTKA, P.W., THOMPSON, P.D., HSIEH, J.C., REMUS, L.S., SELZNICK, S.H. y WHITFIELD, G.K., 1997. The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *The Journal of endocrinology* [en línea], vol. 154 Suppl, pp. S57-73. ISSN 0022-0795. DOI 10.1677/joe.0.154S057. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9379138>.
- HEATH, K.M. y ELOVIC, E.P., 2006. Vitamin D deficiency: implications in the rehabilitation setting. *American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists* [en línea], vol. 85, no. 11, pp. 916-923. ISSN 0894-9115. DOI 10.1097/01.phm.0000242622.23195.61. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17079965>.
- HEIKKINEN, S., VÄISÄNEN, S., PEHKONEN, P., SEUTER, S., BENES, V. y CARLBERG, C., 2011. Nuclear hormone 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 elicits a genome-wide shift in the locations of VDR chromatin occupancy. *Nucleic Acids Research* [en línea], vol. 39, no. 21, pp. 9181-9193. ISSN 03051048. DOI 10.1093/nar/gkr654. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21846776>.
- HILL, C. y FERRANTE, A., 2016. The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients* [en línea], vol. 8, no. 3, pp. 135. ISSN 2072-6643. DOI 10.3390/nu8030135. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26950144>.
- HINSON, A.R.P., JONES, R., CROSE, L.E.S., BELYEA, B.C., BARR, F.G. y LINARDIC, C.M., 2013. Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: utility and pitfalls. *Frontiers in oncology* [en línea], vol. 3, no. July, pp. 183. ISSN 2234-943X. DOI 10.3389/fonc.2013.00183. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3713458&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- HOLICK, M., MACLAUGHLIN, J., CLARK, M., HOLICK, S., POTTS, J., ANDERSON, R.R., BLANK, I., PARRISH, J. y ELIAS, P., 1980. Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. *Science* [en línea], vol. 210, no. 4466, pp. 203-205. ISSN 0036-8075. DOI 10.1126/science.6251551. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6251551>.

- HOLICK, M.F., 2011. Vitamin D: a d-lightful solution for health. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* [en línea], vol. 59, no. 6, pp. 872-80. ISSN 1708-8267. DOI 10.2310/JIM.0b013e318214ea2d. Disponible en: <http://jim.bmj.com/lookup/doi/10.2310/JIM.0b013e318214ea2d>.
- HOWLADER, N., NOONE, A., KRAPCHO, M., MILLER, D., BISHOP, K., ALTEKRUSE, S., KOSARY, C., YU, M., RUHL, J., TATALOVICH, Z., MARIOTTO, A., LEWIS, D., CHEN, H., FEUER, E., CRONIN, K. y (EDS), 2016. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/, based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016. .
- IGNATIUS, M.S., CHEN, E., ELPEK, N.M., FULLER, A.Z., TENENTE, I.M., CLAGG, R., LIU, S., BLACKBURN, J.S., LINARDIC, C.M., ROSENBERG, A.E., NIELSEN, P.G., MEMPEL, T.R. y LANGENAU, D.M., 2012. In Vivo Imaging of Tumor-Propagating Cells, Regional Tumor Heterogeneity, and Dynamic Cell Movements in Embryonal Rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell*, vol. 21, no. 5, pp. 680-693. ISSN 15356108. DOI 10.1016/j.ccr.2012.03.043.
- INSINGA, A., CICALESE, A. y PELICCI, P.G., 2014. DNA damage response in adult stem cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* [en línea], vol. 52, no. 4, pp. 147-151. ISSN 10799796. DOI 10.1016/j.bcmed.2013.12.005. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079979613002726>.
- IRAZOQUI, A.P., BOLAND, R.L. y BUITRAGO, C.G., 2014. Actions of 1,25(OH)₂-vitamin D₃ on the cellular cycle depend on VDR and p38 MAPK in skeletal muscle cells. *Journal of molecular endocrinology* [en línea], vol. 53, no. 3, pp. 331-43. ISSN 1479-6813. DOI 10.1530/JME-14-0102. Disponible en: <http://jme.endocrinology-journals.org/cgi/doi/10.1530/JME-14-0102>.
- IRAZOQUI, A.P., HEIM, N.B., BOLAND, R.L. y BUITRAGO, C.G., 2015. 1 α ,25 dihydroxi-vitamin D₃ modulates CDK4 and CDK6 expression and localization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [en línea], vol. 459, no. 1, pp. 2-7. ISSN 0006291X. DOI 10.1016/j.bbrc.2015.02.083. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25721671>.
- JANSSEN, I., HEYMSFIELD, S.B., WANG, Z. y ROSS, R., 2000. Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18–88 yr. *Journal of Applied Physiology* [en línea], vol. 89, no. 1, pp. 81-88. ISSN 8750-7587, 1522-1601. DOI 10.1093/oxfordjournals.aje.a009520. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10904038>.
- JIAN, Y., YAN, J., WANG, H., CHEN, C., SUN, M., JIANG, J., LU, J., YANG, Y. y GU, J., 2005. Cyclin D₃ interacts with vitamin D receptor and regulates its transcription activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 335, no. 3, pp. 739-748. ISSN 0006291X. DOI 10.1016/j.bbrc.2005.07.141.

- KARIMIAN, A., AHMADI, Y. y YOUSEFI, B., 2016. *Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage* [en línea]. junio 2016. S.l.: s.n. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27156098>.
- KARIUKI, S.N., MARANVILLE, J.C., BAXTER, S.S., JEONG, C., NAKAGOME, S., HRUSCH, C.L., WITONSKY, D.B., SPERLING, A.I. y RIENZO, A. Di, 2016. Mapping variation in cellular and transcriptional response to 1,25-dihydroxyvitamin d3 in peripheral blood mononuclear cells. *PLoS ONE* [en línea], vol. 11, no. 7, pp. e0159779. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0159779. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27454520>.
- KASHI, V.P., HATLEY, M.E. y GALINDO, R.L., 2015. Probing for a deeper understanding of rhabdomyosarcoma: insights from complementary model systems. *Nature Reviews Cancer* [en línea], vol. 15, no. 7, pp. 426-439. ISSN 1474-175X. DOI 10.1038/nrc3961. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc3961>.
- KATAYAMA, K., DOBASHI, Y., KITAGAWA, M., KAWAI, M., KADOYA, Y. y KAMEYA, T., 2003. Cdk4/cyclin D1 kinase, a universal and critical regulator of apoptosis. *Anticancer research* [en línea], vol. 23, no. 1A, pp. 235-43. ISSN 0250-7005. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12680219>.
- KELLY, K.M., WOMER, R.B., SORENSEN, P.H.B., XIONG, Q.B. y BARR, F.G., 1997. Common and variant gene fusions predict distinct clinical phenotypes in rhabdomyosarcoma. *Journal of Clinical Oncology* [en línea], vol. 15, no. 5, pp. 1831-1836. ISSN 0732183X. DOI 10.1200/jco.1997.15.5.1831. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9164192>.
- KIESS, M., GILL, R.M. y HAMEL, P.A., 1995. Expression of the positive regulator of cell cycle progression, cyclin D3, is induced during differentiation of myoblasts into quiescent myotubes. *Oncogene* [en línea], vol. 10, no. 1, pp. 159-66. ISSN 0950-9232. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7824268>.
- KIM, J.-Y., CHOI, J.-A., KIM, T.-H., YOO, Y.-D., KIM, J.-I., LEE, Y.J., YOO, S.-Y., CHO, C.-K., LEE, Y.-S. y LEE, S.-J., 2002. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the cell growth inhibition by sodium arsenite. *Journal of cellular physiology* [en línea], vol. 190, no. 1, pp. 29-37. ISSN 0021-9541. DOI 10.1002/jcp.10049. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.10049>.
- KNUDSEN, E.S., PAZZAGLI, C., BORN, T.L., BERTOLAET, B.L., KNUDSEN, K.E., ARDEN, K.C., HENRY, R.R. y FERAMISCO, J.R., 1998. Elevated cyclins and cyclin-dependent kinase activity in the rhabdomyosarcoma cell line RD. *Cancer research*, vol. 58, no. 9, pp. 2042-9. ISSN 0008-5472.
- KNUTSEN, K.V., BREKKE, M., GJELSTAD, S. y LAGERLØV, P., 2010. Vitamin D status in patients with musculoskeletal pain, fatigue and headache: a cross-sectional descriptive study in a multi-

- ethnic general practice in Norway. *Scandinavian journal of primary health care* [en línea], vol. 28, no. 3, pp. 166-71. ISSN 1502-7724. DOI 10.3109/02813432.2010.505407. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20642395>.
- KOGAWA, M., ANDERSON, P.H., FINDLAY, D.M., MORRIS, H.A. y ATKINS, G.J., 2010. The metabolism of 25-(OH)vitamin D3 by osteoclasts and their precursors regulates the differentiation of osteoclasts. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* [en línea], vol. 121, no. 1-2, pp. 277-80. ISSN 1879-1220. DOI 10.1016/j.jsbmb.2010.03.048. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20304055>.
- KOGAWA, M., FINDLAY, D.M., ANDERSON, P.H., ORMSBY, R., VINCENT, C., MORRIS, H.A. y ATKINS, G.J., 2010. Osteoclastic metabolism of 25(OH)-vitamin D3: a potential mechanism for optimization of bone resorption. *Endocrinology* [en línea], vol. 151, no. 10, pp. 4613-25. ISSN 1945-7170. DOI 10.1210/en.2010-0334. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20739402>.
- KOLLÁR, A., LANGER, R., IONESCU, C., CULLMANN, J.L. y KLENKE, F.M., 2016. Pleomorphic rhabdomyosarcoma with an impressive response to chemotherapy: case report and review of the literature. *Tumori Journal* [en línea], vol. 102, no. Suppl. 2, pp. 57-60. ISSN 0300-8916. DOI 10.5301/tj.5000476. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26952562>.
- KOLLITZ, E.M., ZHANG, G., HAWKINS, M.B., WHITFIELD, G.K., REIF, D.M. y KULLMAN, S.W., 2015. Molecular cloning, functional characterization, and evolutionary analysis of vitamin D receptors isolated from basal vertebrates. *PLoS ONE*, vol. 10, no. 4, pp. 1-27. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0122853.
- KRIMPENFORT, P., IJPENBERG, A., SONG, J.-Y., VALK, M. Van Der, NAWIJN, M., ZEVENHOVEN, J. y BERNIS, A., 2007. p15Ink4b is a critical tumour suppressor in the absence of p16Ink4a. *Nature* [en línea], vol. 448, no. August, pp. 943-946. ISSN 0028-0836. DOI 10.1038/nature06084. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature06084>.
- KUROSE, H., YAMAOKA, K., OKADA, S., NAKAJIMA, S. y SEINO, Y., 1990. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 [1,25-(OH)2D3] increases insulin-like growth factor I (IGF-I) receptors in clonal osteoblastic cells. Study on interaction of IGF-I and 1,25-(OH)2D3. *Endocrinology* [en línea], vol. 126, no. 4, pp. 2088-94. ISSN 0013-7227. DOI 10.1210/endo-126-4-2088. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2156680>.
- LACEY, D.L., ERDMANN, J.M., TAN, H.L. y OHARA, J., 1993. Murine osteoblast interleukin 4 receptor expression: upregulation by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Journal of cellular biochemistry* [en línea], vol. 53, no. 2, pp. 122-34. ISSN 0730-2312. DOI 10.1002/jcb.240530205. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8227185>.

- LACEY, D.L., GROSSO, L.E., MOSER, S.A., ERDMANN, J., TAN, H.L., PACIFICI, R. y VILLAREAL, D.T., 1993. IL-1-induced murine osteoblast IL-6 production is mediated by the type 1 IL-1 receptor and is increased by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *The Journal of clinical investigation* [en línea], vol. 91, no. 4, pp. 1731-42. ISSN 0021-9738. DOI 10.1172/JC1116383. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8473513>.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* [en línea], vol. 227, no. 5259, pp. 680-5. ISSN 0028-0836. DOI 10.1038/227680a0. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/227680a0>.
- LASSAR, A.B., 2009. *The p38 MAPK family, a pushmi-pullyu of skeletal muscle differentiation*. 2009. S.l.: s.n. ISBN 1540-8140 (Electronic)r0021-9525 (Linking).
- LEE, E.-J., MOON, G.-S., CHOI, W.-S., KIM, W.-J. y MOON, S.-K., 2008. Naringin-induced p21WAF1-mediated G(1)-phase cell cycle arrest via activation of the Ras/Raf/ERK signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* [en línea], vol. 46, no. 12, pp. 3800-7. ISSN 0278-6915. DOI 10.1016/j.fct.2008.10.002. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18951945>.
- LEE, J., HONG, F., KWON, S., KIM, S.S.S.S., KIM, D.O., KANG, H.S., LEE, S.J., HA, J. y KIM, S.S.S.S., 2002. Activation of p38 MAPK induces cell cycle arrest via inhibition of Raf/ERK pathway during muscle differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [en línea], vol. 298, no. 5, pp. 765-771. ISSN 0006-291X. DOI 10.1016/S0006-291X(02)02562-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12419320>.
- LEUSCHNER, I., NEWTON, W.A., SCHMIDT, D., SACHS, N., ASMAR, L., HAMOUDI, A., HARMS, D. y MAURER, H.M., 1993. Spindle cell variants of embryonal rhabdomyosarcoma in the paratesticular region. A report of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *The American journal of surgical pathology* [en línea], vol. 17, no. 3, pp. 221-30. ISSN 0147-5185. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8434703>.
- LIU, M., LEE, M.H., COHEN, M., BOMMAKANTI, M. y FREEDMAN, L.P., 1996. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes & development* [en línea], vol. 10, no. 2, pp. 142-53. ISSN 0890-9369. DOI 10.1101/gad.10.2.142. Disponible en: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.10.2.142>.
- LIVAK, K.J. y SCHMITTGEN, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* [en línea], vol. 25, no. 4, pp. 402-408. ISSN 10462023. DOI 10.1006/meth.2001.1262. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>.

- LOHBERGER, B., KRETSCHMER, N., BERNHART, E., RINNER, B., STUENDL, N., KALTENEGGER, H., KAHL, S., BAUER, R. y LEITHNER, A., 2015. 25-O-acetyl-23,24-dihydrocucurbitacin F induces cell cycle G2/M arrest and apoptosis in human soft tissue sarcoma cells. *Journal of Ethnopharmacology* [en línea], vol. 164, pp. 265-272. ISSN 18727573. DOI 10.1016/j.jep.2015.02.023. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.02.023>.
- MA, J., MA, Z., LI, W., MA, Q., GUO, J., HU, A., LI, R., WANG, F. y HAN, S., 2013. The mechanism of calcitriol in cancer prevention and treatment. *Current medicinal chemistry* [en línea], vol. 20, no. 33, pp. 4121-30. DOI 10.2174/09298673113209990195. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23895685>.
- MACLAUGHLIN, J.A., ANDERSON, R.R. y HOLICK, M.F., 1982. Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D3 and its photoisomers in human skin. *Science* [en línea], vol. 216, no. 4549, pp. 1001-1003. ISSN 0036-8075. DOI 10.1126/science.6281884. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6281884>.
- MALUMBRES, M. y BARBACID, M., 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews. Cancer*, vol. 9, no. 3, pp. 153-166. ISSN 1474-175X. DOI 10.1038/nrc2602.
- MAQBOOL, T. y JAGLA, K., 2007. Genetic control of muscle development: learning from Drosophila. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* [en línea], vol. 28, no. 7-8, pp. 397-407. ISSN 0142-4319. DOI 10.1007/s10974-008-9133-1. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18347920>.
- MARCINKOWSKA, E., WALLACE, G. y BROWN, G., 2016. The Use of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 as an Anticancer Agent. *International Journal of Molecular Sciences* [en línea], vol. 17, no. 5, pp. 729. ISSN 1422-0067. DOI 10.3390/ijms17050729. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/5/729>.
- MARTIN, S.J., REUTELINGSPERGER, C.P., MCGAHON, A.J., RADER, J.A., VAN SCHIE, R.C., LAFACE, D.M. y GREEN, D.R., 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of experimental medicine* [en línea], vol. 182, no. 5, pp. 1545-56. ISSN 0022-1007. DOI 10.1084/jem.182.5.1545. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7595224>.
- MASSAGUÉ, J., 2004. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* [en línea], vol. 432, no. 7015, pp. 298-306. ISSN 0028-0836. DOI 10.1038/nature03094. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature03094>.
- MASUYAMA, R., STOCKMANS, I., TORREKENS, S., VAN LOOVEREN, R., MAES, C., CARMELIET, P., BOUILLON, R. y CARMELIET, G., 2006. Vitamin D receptor in chondrocytes promotes

- osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts. *The Journal of clinical investigation* [en línea], vol. 116, no. 12, pp. 3150-9. ISSN 0021-9738. DOI 10.1172/JCI29463. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17099775>.
- MAURO, A., 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* [en línea], vol. 9, no. 2, pp. 493-495. ISSN 0095-9901. DOI 10.1083/jcb.9.2.493. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13768451>.
- MAYER, E., 1921. Sunlight and Artificial Light Therapy in Tuberculosis. *Am. Rev. Tuberc.*,
- MCALLISTER, R.M., MELNYK, J., FINKLESTEIN, J.Z., ADAMS, E.C. y GARDNER, M.B., 1969. Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer*, vol. 24, no. 3, pp. 520-526. ISSN 10970142. DOI 10.1002/1097-0142(196909)24:3<520::AID-CNCR2820240313>3.0.CO;2-M.
- MCCARTHY, J.J. y ESSER, K.A., 2010. Anabolic and catabolic pathways regulating skeletal muscle mass. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* [en línea], vol. 13, no. 3, pp. 230-5. ISSN 1473-6519. DOI 10.1097/MCO.0b013e32833781b5. Disponible en: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00075197-201005000-00004>.
- MEBRATU, Y. y TESFAIGZI, Y., 2009. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* [en línea], vol. 8, no. 8, pp. 1168-75. ISSN 1551-4005. DOI 10.4161/cc.8.8.8147. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.8.8.8147>.
- MESSINA, G., BLASI, C., LA ROCCA, S.A., POMPILI, M., CALCONI, A. y GROSSI, M., 2005. p27Kip1 acts downstream of N-cadherin-mediated cell adhesion to promote myogenesis beyond cell cycle regulation. *Molecular biology of the cell* [en línea], vol. 16, no. 3, pp. 1469-80. ISSN 1059-1524. DOI 10.1091/mbc.E04-07-0612. Disponible en: <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E04-07-0612>.
- MEYER, M.B., GOETSCH, P.D. y PIKE, J.W., 2012. VDR/RXR and TCF4/ β -catenin cistromes in colonic cells of colorectal tumor origin: impact on c-FOS and c-MYC gene expression. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* [en línea], vol. 26, no. 1, pp. 37-51. ISSN 1944-9917. DOI 10.1210/me.2011-1109. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22108803>.
- MISSIAGLIA, E., SELFE, J., HAMDY, M., WILLIAMSON, D., SCHAAF, G., FANG, C., KOSTER, J., SUMMERGILL, B., MESSAHEL, B., VERSTEEG, R., PRITCHARD-JONES, K., KOOL, M. y SHIPLEY, J., 2009. Genomic imbalances in rhabdomyosarcoma cell lines affect expression of genes frequently altered in primary tumors: An approach to identify candidate genes involved in tumor development. *Genes Chromosomes and Cancer* [en línea], vol. 48, no. 6, pp. 455-467.

ISSN 10452257. DOI 10.1002/gcc.20655. Disponible en:
<http://doi.wiley.com/10.1002/gcc.20655>.

MIURA, S., MATSUO, Y., KAWAMURA, A. y SAKU, K., 2005. JTT-705 blocks cell proliferation and angiogenesis through p38 kinase/p27(kip1) and Ras/p21(waf1) pathways. *Atherosclerosis* [en línea], vol. 182, no. 2, pp. 267-75. ISSN 0021-9150. DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2005.02.017. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915005001577>.

MIYACHI, M., KAKAZU, N., YAGYU, S., KATSUMI, Y., TSUBAI-SHIMIZU, S., KIKUCHI, K., TSUCHIYA, K., IEHARA, T. y HOSOI, H., 2009. Restoration of p53 pathway by nutlin-3 induces cell cycle arrest and apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* [en línea], vol. 15, no. 12, pp. 4077-84. ISSN 1078-0432. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-08-2955. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19509161>.

MIYAMOTO, K., KESTERSON, R.A., YAMAMOTO, H., TAKETANI, Y., NISHIWAKI, E., TATSUMI, S., INOUE, Y., MORITA, K., TAKEDA, E. y PIKE, J.W., 1997. Structural Organization of the Human Vitamin D Receptor Chromosomal Gene and Its Promoter. *Molecular Endocrinology* [en línea], vol. 11, no. 8, pp. 1165-1179. ISSN 0888-8809. DOI 10.1210/mend.11.8.9951. Disponible en: <http://mend.endojournals.org/cgi/doi/10.1210/me.11.8.1165>.

MIZWICKI, M.T., KEIDEL, D., BULA, C.M., BISHOP, J.E., ZANELLO, L.P., WURTZ, J.-M., MORAS, D. y NORMAN, A.W., 2004. Identification of an alternative ligand-binding pocket in the nuclear vitamin D receptor and its functional importance in 1 α ,25(OH) $_2$ -vitamin D $_3$ signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [en línea], vol. 101, no. 35, pp. 12876-81. ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.0403606101. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=516488&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

MIZWICKI, M.T., MENEGAZ, D., YAGHMAEI, S., HENRY, H.L. y NORMAN, A.W., 2010. A molecular description of ligand binding to the two overlapping binding pockets of the nuclear vitamin D receptor (VDR): Structure-function implications. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 121, no. 1-2, pp. 98-105. ISSN 09600760. DOI 10.1016/j.jsbmb.2010.04.005.

MØLLER, K.I., KONGSHOJ, B., PHILIPSEN, P.A., THOMSEN, V.O. y WULF, H.C., 2005. How Finsen's light cured lupus vulgaris. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine* [en línea], vol. 21, no. 3, pp. 118-124. ISSN 09054383. DOI 10.1111/j.1600-0781.2005.00159.x. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0781.2005.00159.x>.

MØLLER, M.B., 2000. P27 in cell cycle control and cancer. *Leukemia & lymphoma* [en línea], vol. 39, no. 1-2, pp. 19-27. ISSN 1042-8194. DOI 10.3109/10428190009053535. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10975380>.

- MOLNÁR, F., PERÄKYLÄ, M. y CARLBERG, C., 2006. Vitamin D receptor agonists specifically modulate the volume of the ligand-binding pocket. *The Journal of biological chemistry* [en línea], vol. 281, no. 15, pp. 10516-26. ISSN 0021-9258. DOI 10.1074/jbc.M513609200. Disponible en: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M513609200>.
- MOON, S.-K., JUNG, S.-Y. y KIM, C.-H., 2004. Transcription factor Sp1 mediates p38MAPK-dependent activation of the p21WAF1 gene promoter in vascular smooth muscle cells by pyrrolidine dithiocarbamate. *Biochemical and biophysical research communications* [en línea], vol. 316, no. 3, pp. 605-11. ISSN 0006-291X. DOI 10.1016/j.bbrc.2004.02.096. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X04003675>.
- MORALES, O., FAULDS, M.H., LINDGREN, U.J. y HALDOSÉN, L.-A., 2002. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits GH-induced expression of SOCS-3 and CIS and prolongs growth hormone signaling via the Janus kinase (JAK2)/signal transducers and activators of transcription (STAT5) system in osteoblast-like cells. *The Journal of biological chemistry* [en línea], vol. 277, no. 38, pp. 34879-84. ISSN 0021-9258. DOI 10.1074/jbc.M204819200. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12107179>.
- MORELLI, S., BUITRAGO, C.G., BOLAND, R.L. y DE BOLAND, A.R., 2001. The stimulation of MAP kinase by 1,25(OH)₂-vitamin D₃ in skeletal muscle cells is mediated by protein kinase C and calcium. *Molecular and cellular endocrinology* [en línea], vol. 173, no. 1-2, pp. 41-52. ISSN 0303-7207. DOI 10.1016/S0303-7207(00)00435-4. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11223176>.
- MORELLI, S., BUITRAGO, C.G., VAZQUEZ, G., DE BOLAND, A.R. y BOLAND, R.L., 2000. Involvement of tyrosine kinase activity in 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ signal transduction in skeletal muscle cells. *The Journal of biological chemistry* [en línea], vol. 275, no. 46, pp. 36021-8. ISSN 0021-9258. DOI 10.1074/jbc.M002025200. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10964910>.
- MORGAN, D.O., 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* [en línea], vol. 374, no. 6518, pp. 131-4. ISSN 0028-0836. DOI 10.1038/374131a0. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/374131a0>.
- MORIWAKE, T., TANAKA, H., KANZAKI, S., HIGUCHI, J. y SEINO, Y., 1992. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ stimulates the secretion of insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) by cultured human osteosarcoma cells. *Endocrinology* [en línea], vol. 130, no. 2, pp. 1071-3. ISSN 0013-7227. DOI 10.1210/endo.130.2.1370789. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1370789>.
- MUNNS, C.F., SHAW, N., KIELY, M., SPECKER, B.L., THACHER, T.D., OZONO, K., MICHIGAMI, T., TIOSANO, D., MUGHAL, M.Z., MÄKITIE, O., RAMOS-ABAD, L., WARD, L., DIMEGLIO,

- L.A., ATAPATTU, N., CASSINELLI, H., BRAEGGER, C., PETTIFOR, J.M., SETH, A., IDRIS, H.W., BHATIA, V., FU, J., GOLDBERG, G., SÄVENDAHL, L., KHADGAWAT, R., PLUDOWSKI, P., MADDOCK, J., HYPPÖNEN, E., ODUWOLE, A., FREW, E., AGUIAR, M., TULCHINSKY, T., BUTLER, G. y HÖGLER, W., 2016. Global Consensus Recommendations on Prevention and Management of Nutritional Rickets. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* [en línea], vol. 101, no. 2, pp. 394-415. ISSN 1945-7197. DOI 10.1210/jc.2015-2175. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26745253>.
- MURRAY, A.W. y KIRSCHNER, M.W., 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* [en línea], vol. 339, no. 6222, pp. 275-80. ISSN 0028-0836. DOI 10.1038/339275a0. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2566917>.
- NAJA, R.P., DARDENNE, O., ARABIAN, A. y ST ARNAUD, R., 2009. Chondrocyte-specific modulation of Cyp27b1 expression supports a role for local synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in growth plate development. *Endocrinology* [en línea], vol. 150, no. 9, pp. 4024-32. ISSN 1945-7170. DOI 10.1210/en.2008-1410. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19477943>.
- NAKANO, N., URASAWA, K., TAKAGI, Y., SAITO, T., KANETA, S., ISHIKAWA, S., HIGASHI, H., TSUTSUI, H., HATAKEYAMA, M. y KITABATAKE, A., 2005. Downregulation of cyclin-dependent kinase inhibitor; p57kip2, is involved in the cell cycle progression of vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 338, no. 3, pp. 1661-1667. ISSN 0006291X. DOI 10.1016/j.bbrc.2005.10.093.
- NAMBI, P., WU, H.L., LIPSHUTZ, D. y PRABHAKAR, U., 1995. Identification and characterization of endothelin receptors on rat osteoblastic osteosarcoma cells: down-regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Molecular pharmacology* [en línea], vol. 47, no. 2, pp. 266-71. ISSN 0026-895X. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7870034>.
- NEJENTSEV, S., COOPER, J.D., GODFREY, L., HOWSON, J.M.M., RANCE, H., NUTLAND, S., WALKER, N.M., GUJA, C., IONESCU-TIRGOVIȘTE, C., SAVAGE, D.A., UNDLIEN, D.E., RØNNINGEN, K.S., TUOMILEHTO-WOLF, E., TUOMILEHTO, J., GILLESPIE, K.M., RING, S.M., STRACHAN, D.P., WIDMER, B., DUNGER, D. y TODD, J.A., 2004. Analysis of the vitamin D receptor gene sequence variants in type 1 diabetes. *Diabetes* [en línea], vol. 53, no. 10, pp. 2709-12. ISSN 0012-1797. DOI 10.2337/diabetes.53.10.2709. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15448105>.
- NEMERE, I., FARACH-CARSON, M.C., ROHE, B., STERLING, T.M., NORMAN, A.W., BOYAN, B.D. y SAFFORD, S.E., 2004. Ribozyme knockdown functionally links a 1,25(OH)2D3 membrane binding protein (1,25D3-MARRS) and phosphate uptake in intestinal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [en línea], vol. 101, no. 19, pp. 7392-7. ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.0402207101. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15123837>.

NEWTON, W.A., GEHAN, E.A., WEBBER, B.L., MARSDEN, H.B., VAN UNNIK, A.J., HAMOUDI, A.B., TSOKOS, M.G., SHIMADA, H., HARMS, D. y SCHMIDT, D., 1995. Classification of rhabdomyosarcomas and related sarcomas. Pathologic aspects and proposal for a new classification--an Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *Cancer* [en línea], vol. 76, no. 6, pp. 1073-85. ISSN 0008-543X. DOI 10.1002/1097-0142(19950915)76:6<1073::AID-CNCR2820760624>3.0.CO;2-L. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/1097-0142%2819950915%2976%3A6%3C1073%3A%3AAID-CNCR2820760624%3E3.0.CO%3B2-L>.

NGUYEN, T.M., LIEBERHERR, M., FRITSCH, J., GUILLOZO, H., ALVAREZ, M.L., FITOURI, Z., JEHAN, F. y GARABÉDIAN, M., 2004. The rapid effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ require the vitamin D receptor and influence 24-hydroxylase activity: Studies in human skin fibroblasts bearing vitamin D receptor mutations. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 9, pp. 7591-7597. ISSN 00219258. DOI 10.1074/jbc.M309517200.

NICOLAY, B.N. y DYSON, N.J., 2013. *The multiple connections between pRB and cell metabolism* [en línea]. diciembre 2013. S.l.: s.n. ISBN 2122633255. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23916769>.

NORMAN, A.W., 2006. Vitamin D Receptor: New Assignments for an Already Busy Receptor. *Endocrinology* [en línea], vol. 147, no. 12, pp. 5542-5548. ISSN 0013-7227. DOI 10.1210/en.2006-0946. Disponible en: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/en.2006-0946>.

OKUNO, H., KISHIMOTO, K.N., HATORI, M. y ITOI, E., 2012. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ enhances fast-myosin heavy chain expression in differentiated C2C12 myoblasts. *Cell biology international* [en línea], vol. 36, no. 5, pp. 441-7. ISSN 1095-8355. DOI 10.1042/CBI20100782. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1042/CBI20100782>.

OLGUIN, H.C. y OLWIN, B.B., 2004. Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: A potential mechanism for self-renewal. *Developmental Biology*, vol. 275, no. 2, pp. 375-388. ISSN 00121606. DOI 10.1016/j.ydbio.2004.08.015.

OLSSON, K., SAINI, A., STRÖMBERG, A., ALAM, S., LILJA, M., RULLMAN, E. y GUSTAFSSON, T., 2016. Evidence for Vitamin D Receptor Expression and Direct Effects of 1 α ,25(OH)₂D₃ in Human Skeletal Muscle Precursor Cells. *Endocrinology* [en línea], vol. 157, no. 1, pp. 98-111. ISSN 1945-7170. DOI 10.1210/en.2015-1685. Disponible en: <http://press.endocrine.org/doi/10.1210/en.2015-1685>.

PARHAM, D.M. y BARR, F.G., 2013. Classification of Rhabdomyosarcoma and Its Molecular Basis. *Advances In Anatomic Pathology* [en línea], vol. 20, no. 6, pp. 387-397. ISSN 1072-4109. DOI 10.1097/PAP.0b013e3182a92d0d. Disponible en:

<http://dx.doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2011.10.007>.

PARK, W.H., SEOL, J.G., KIM, E.S., BINDERUP, L., KOEFFLER, H.P., KIM, B.K. y LEE, Y.Y., 2002. The induction of apoptosis by a combined 1,25(OH)2D3 analog, EB1089 and TGF-beta1 in NCI-H929 multiple myeloma cells. *International journal of oncology*, vol. 20, no. 3, pp. 533-542. ISSN 10196439.

PARKER, S., EICHELE, G., ZHANG, P., RAWLS, A., SANDS, T., BRADLEY, A., OLSON, E.N., HARPER, J. y ELLEDGE, S., 1995. p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 267, no. 5200, pp. 1024-1027. ISSN 0036-8075. DOI 10.1126/science.7863329.

PARSONS, S.J. y PARSONS, J.T., 2004. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* [en línea], vol. 23, no. 48, pp. 7906-7909. ISSN 0950-9232. DOI 10.1038/sj.onc.1208160. Disponible en: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.onc.1208160>.

PATERAS, I.S., APOSTOLOPOULOU, K., NIFOROU, K., KOTSINAS, A. y GORGOULIS, V.G., 2009. p57KIP2: «Kip»ing the cell under control. *Molecular cancer research : MCR* [en línea], vol. 7, no. 12, pp. 1902-19. ISSN 1557-3125. DOI 10.1158/1541-7786.MCR-09-0317. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19934273>.

PEREIRA, F., LARRIBA, M.J. y MUÑOZ, A., 2012. Vitamin D and colon cancer. *Endocrine-related cancer* [en línea], vol. 19, no. 3, pp. R51-71. ISSN 1479-6821. DOI 10.1530/ERC-11-0388. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22383428>.

PERRONE, L., PELUSO, G. y MELONE, M.A.B., 2008. RAGE recycles at the plasma membrane in S100B secretory vesicles and promotes Schwann cells morphological changes. *Journal of Cellular Physiology* [en línea], vol. 217, no. 1, pp. 60-71. ISSN 00219541. DOI 10.1002/jcp.21474. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18452184>.

PIKE, J.W. y MEYER, M.B., 2014. *Fundamentals of vitamin D hormone-regulated gene expression* [en línea]. octubre 2014. S.l.: NIH Public Access. ISBN 1879-1220 (Electronic)r0960-0760 (Linking). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24239506>.

POJEDNIC, R.M. y CEGLIA, L., 2014. The emerging biomolecular role of vitamin D in skeletal muscle. *Exercise and sport sciences reviews* [en línea], vol. 42, no. 2, pp. 76-81. ISSN 1538-3008. DOI 10.1249/JES.0000000000000013. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4369924>.

PULSKENS, W.P., VERKAIK, M., SHEEDFAR, F., VAN LOON, E.P., VAN DE SLUIS, B., VERVLOET, M.G., HOENDEROP, J.G. y BINDELS, R.J., 2015. Deregulated renal calcium and phosphate transport during experimental kidney failure. *PLoS ONE* [en línea], vol. 10, no. 11,

- pp. e0142510. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0142510. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26566277>.
- PURI, P.L., WU, Z., ZHANG, P., WOOD, L.D., BHAKTA, K.S., HAN, J., FERAMISCO, J.R., KARIN, M. y WANG, J.Y., 2000. Induction of terminal differentiation by constitutive activation of p38 MAP kinase in human rhabdomyosarcoma cells. *Genes & development* [en línea], vol. 14, no. 5, pp. 574-84. ISSN 0890-9369. DOI 10.1101/gad.14.5.574. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10716945>.
- PUTHUCHEARY, Z. a, RAWAL, J., MCPHAIL, M., CONNOLLY, B., RATNAYAKE, G., CHAN, P., HOPKINSON, N.S., PHADKE, R., PADHKE, R., DEW, T., SIDHU, P.S., VELLOSO, C., SEYMOUR, J., AGLEY, C.C., SELBY, A., LIMB, M., EDWARDS, L.M., SMITH, K., ROWLERSON, A., RENNIE, M.J., MOXHAM, J., HARRIDGE, S.D.R., HART, N. y MONTGOMERY, H.E., 2013. Acute skeletal muscle wasting in critical illness. *JAMA : the journal of the American Medical Association* [en línea], vol. 310, no. 15, pp. 1591-600. ISSN 1538-3598. DOI 10.1001/jama.2013.278481. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24108501>.
- QIU, H., ZHONG, J., LUO, L., TANG, Z., LIU, N., KANG, K., LI, L. y GOU, D., 2017. Regulatory Axis of miR-195/497 and HMGA1-Id3 Governs Muscle Cell Proliferation and Differentiation. *International Journal of Biological Sciences* [en línea], vol. 13, no. 2, pp. 157-166. ISSN 1449-2288. DOI 10.7150/ijbs.17440. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28255268>.
- RAMAGOPALAN, S. V, HEGER, A., BERLANGA, A.J., MAUGERI, N.J., LINCOLN, M.R., BURRELL, A., HANDUNNETTHI, L., HANDEL, A.E., DISANTO, G., ORTON, S.M., WATSON, C.T., MORAHAN, J.M., GIOVANNONI, G., PONTING, C.P., EBERS, G.C. y KNIGHT, J.C., 2010. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: Associations with disease and evolution. *Genome Research* [en línea], vol. 20, no. 10, pp. 1352-1360. ISSN 10889051. DOI 10.1101/gr.107920.110. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20736230>.
- RAO, S.S. y KOHTZ, S., 1995. *Positive and negative regulation of d-type cyclin expression in skeletal myoblasts by basic Fibroblasts growth factor and Transforming growth Factor beta.pdf*. 1995. S.l.: s.n.
- RAUCH, C., BRUNET, A.-C., DELEULE, J. y FARGE, E., 2002. C2C12 myoblast/osteoblast transdifferentiation steps enhanced by epigenetic inhibition of BMP2 endocytosis. *American journal of physiology. Cell physiology* [en línea], vol. 283, no. 1, pp. C235-C243. ISSN 0363-6143. DOI 10.1152/ajpcell.00234.2001. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12055092>.
- REUSS-BORST, M.A., 2014. Metabolische knochenkrankheit osteomalazie. *Zeitschrift fur Rheumatologie* [en línea], vol. 73, no. 4, pp. 316-322. ISSN 14351250. DOI 10.1007/s00393-013-1285-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24811356>.

- RIES, L., MELBERT, D., KRAPCHO, M., STINCHCOMB, DG HOWLADER, N., HORNER, M., MARIOTTO, A., MILLER, B., FEUER, E., ALTEKRUSE, S., LEWIS, D., CLEGG, L., EISNER, M., REICHMAN, M., EDWARDS, B. y (EDS), 2008. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/, based on November 2007 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2008. [en línea]. Disponible en: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/.
- RIUZZI, F., SORCI, G. y DONATO, R., 2007. RAGE expression in rhabdomyosarcoma cells results in myogenic differentiation and reduced proliferation, migration, invasiveness, and tumor growth. *The American journal of pathology* [en línea], vol. 171, no. 3, pp. 947-961. ISSN 0002-9440. DOI 10.2353/ajpath.2007.070049. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17640970>.
- RONDA, A.C., BUITRAGO, C.G. y BOLAND, R.L., 2010. Role of estrogen receptors, PKC and Src in ERK2 and p38 MAPK signaling triggered by 17 β -estradiol in skeletal muscle cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* [en línea], vol. 122, no. 4, pp. 287-94. ISSN 1879-1220. DOI 10.1016/j.jsbmb.2010.05.002. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20478382>.
- RONDA, A.C.C., BUITRAGO, C.G.G., COLICHEO, A., DE BOLAND, A.R.R., ROLDÁN, E. y BOLAND, R.L.L., 2007. Activation of MAPKs by 1 α ,25(OH) $_2$ -Vitamin D $_3$ and 17 β -estradiol in skeletal muscle cells leads to phosphorylation of Elk-1 and CREB transcription factors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* [en línea], vol. 103, no. 3-5, pp. 462-466. ISSN 09600760. DOI 10.1016/j.jsbmb.2006.11.005. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17197172>.
- ROSE, F., 1909. The national importance of outdoor schools. *British Journal of Tuberculosis* [en línea], vol. 3, no. 3, pp. 181-187. ISSN 03660850. DOI 10.1016/S0366-0850(09)80044-6. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0366085009800446>.
- ROSEN, C.J., ADAMS, J.S., BIKLE, D.D., BLACK, D.M., DEMAY, M.B., MANSON, J.E., MURAD, M.H. y KOVACS, C.S., 2012. The nonskeletal effects of vitamin D: An endocrine society scientific statement. *Endocrine Reviews*, vol. 33, no. 3, pp. 456-492. ISSN 0163769X. DOI 10.1210/er.2012-1000.
- ROSSI, S., POLIANI, P.L., MISSALE, C., MONTI, E. y FANZANI, A., 2011. Caveolins in rhabdomyosarcoma. *Journal of cellular and molecular medicine* [en línea], vol. 15, no. 12, pp. 2553-68. ISSN 1582-4934. DOI 10.1111/j.1582-4934.2011.01364.x. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21707915>.
- ROT-NIKCEVIC, I., REDDY, T., DOWNING, K.J., BELLIVEAU, A.C., HALLGRÍMSSON, B., HALL, B.K. y KABLAR, B., 2006. Myf5 $^{-/-}$:MyoD $^{-/-}$ amyogenic fetuses reveal the importance of early contraction and static loading by striated muscle in mouse skeletogenesis. *Development genes*

and evolution [en línea], vol. 216, no. 1, pp. 1-9. ISSN 0949-944X. DOI 10.1007/s00427-005-0024-9. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00427-005-0024-9>.

ROUSSEL, M.F., 1999. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* [en línea], vol. 18, no. 38, pp. 5311-5317. DOI 10.1038/sj.onc.1202998. Disponible en: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.onc.1202998>.

RUDZINSKI, E.R., ANDERSON, J.R., HAWKINS, D.S., SKAPEK, S.X., PARHAM, D.M. y TEOT, L.A., 2015. The World Health Organization Classification of Skeletal Muscle Tumors in Pediatric Rhabdomyosarcoma: A Report From the Children's Oncology Group. *Archives of pathology & laboratory medicine* [en línea], vol. 139, no. 10, pp. 1281-7. ISSN 1543-2165. DOI 10.5858/arpa.2014-0475-OA. Disponible en: <http://www.archivesofpathology.org/doi/10.5858/arpa.2014-0475-OA>.

RYAN, K.J.P., DANIEL, Z.C.T.R., CRAGGS, L.J.L., PARR, T. y BRAMELD, J.M., 2013. Dose-dependent effects of vitamin D on transdifferentiation of skeletal muscle cells to adipose cells. *The Journal of endocrinology* [en línea], vol. 217, no. 1, pp. 45-58. ISSN 1479-6805. DOI 10.1530/JOE-12-0234. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3600570&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

SAAB, R., SPUNT, S.L. y SKAPEK, S.X., 2011. Myogenesis and Rhabdomyosarcoma: The Jekyll and Hyde of Skeletal Muscle. *Current topics in developmental biology* [en línea], 1. vol. 94, no. C, pp. 197-234. ISSN 1557-8933. DOI 10.1016/B978-0-12-380916-2.00007-3. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21295688>.

SAITO, H. y HARADA, S., 2014. *Eldecalcitol replaces endogenous calcitriol but does not fully compensate for its action in vivo* [en línea]. octubre 2014. S.l.: s.n. ISBN 1879-1220 (Electronic)r0960-0760 (Linking). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24291401>.

SANGER, J.W., CHOWRASHI, P., SHANER, N.C., SPALTHOFF, S., WANG, J., FREEMAN, N.L. y SANGER, J.M., 2002. Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells. *Clinical orthopaedics and related research* [en línea], no. 403 Suppl, pp. S153-62. ISSN 0009-921X. DOI 10.1097/01.blo.0000031973.69509. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12394464>.

SANTONI-RUGIU, E., FALCK, J., MAILAND, N., BARTEK, J. y LUKAS, J., 2000. Involvement of Myc activity in a G(1)/S-promoting mechanism parallel to the pRb/E2F pathway. *Molecular and cellular biology* [en línea], vol. 20, no. 10, pp. 3497-3509. ISSN 0270-7306. DOI 10.1128/MCB.20.10.3497-3509.2000. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10779339>.

- SATO, T., ONO, T. y TUAN, R.S., 1993. 1,25-Dihydroxy vitamin D3 stimulation of TGF-beta expression in chick embryonic calvarial bone. *Differentiation; research in biological diversity* [en línea], vol. 52, no. 2, pp. 139-50. ISSN 0301-4681. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8472884>.
- SAYRE, R.M. y DOWDY, J.C., 2007. Darkness at noon: sunscreens and vitamin D3. *Photochemistry and photobiology* [en línea], vol. 83, no. 2, pp. 459-63. ISSN 0031-8655. DOI 10.1562/2006-06-29-RC-956. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17115796>.
- SCHAAF, G., HAMDY, M., ZWIJNENBURG, D., LAKEMAN, A., GEERTS, D., VERSTEEG, R. y KOOL, M., 2010. Silencing of SPRY1 Triggers Complete Regression of Rhabdomyosarcoma Tumors Carrying a Mutated RAS Gene. *Cancer Research* [en línea], vol. 70, no. 2, pp. 762-771. ISSN 0008-5472. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-09-2532. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20068162>.
- SCHARLA, S.H., STRONG, D.D., MOHAN, S., BAYLINK, D.J. y LINKHART, T.A., 1991. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 differentially regulates the production of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-4 in mouse osteoblasts. *Endocrinology* [en línea], vol. 129, no. 6, pp. 3139-46. ISSN 0013-7227. DOI 10.1210/endo-129-6-3139. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1720089>.
- SEARS, R.C. y NEVINS, J.R., 2002. Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *The Journal of biological chemistry* [en línea], vol. 277, no. 14, pp. 11617-20. ISSN 0021-9258. DOI 10.1074/jbc.R100063200. Disponible en: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.R100063200>.
- SHABAHANG, M., BUFFAN, A.E., NOLLA, J.M., SCHUMAKER, L.M., BRENNER, R. V, BURAS, R.R., NAUTA, R.J. y EVANS, S.R., 1996. The effect of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on the growth of soft-tissue sarcoma cells as mediated by the vitamin D receptor. *Annals of surgical oncology* [en línea], vol. 3, no. 2, pp. 144-9. ISSN 1068-9265. DOI 10.1007/BF02305793. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/BF02305793>.
- SHADRIN, I.Y., KHODABUKUS, A. y BURSAC, N., 2016. Striated muscle function, regeneration, and repair. *Cellular and Molecular Life Sciences* [en línea], vol. 73, no. 22, pp. 1-28. ISSN 1420-682X. DOI 10.1007/s00018-016-2285-z. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-016-2285-z>.
- SHINCHUK, L.M. y HOLICK, M.F., 2007. Vitamin d and rehabilitation: improving functional outcomes. *Nutrition in clinical practice: official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition* [en línea], vol. 22, no. June, pp. 297-304. ISSN 0884-5336. DOI 10.1177/0115426507022003297. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17507730>.

- SMOLEWSKI, P., GRABAREK, J., HALICKA, H.D. y DARZYNKIEWICZ, Z., 2002. Assay of caspase activation in situ combined with probing plasma membrane integrity to detect three distinct stages of apoptosis. *Journal of immunological methods* [en línea], vol. 265, no. 1-2, pp. 111-21. ISSN 0022-1759. DOI 10.1016/S0022-1759(02)00074-1. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175902000741>.
- SONDAG, G.R., SALIHOGLU, S., LABABIDI, S.L., CROWDER, D.C., MOUSSA, F.M., ABDELMAGID, S.M. y SAFADI, F.F., 2014. Osteoactivin induces transdifferentiation of C2C12 myoblasts into osteoblasts. *Journal of Cellular Physiology* [en línea], vol. 229, no. 7, pp. 955-966. ISSN 10974652. DOI 10.1002/jcp.24512. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.24512>.
- SPECTOR, D.H., 2015. *Human cytomegalovirus riding the cell cycle* [en línea]. 17 junio 2015. S.l.: s.n. ISBN 1432-1831 (Electronic) 0300-8584 (Linking). Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00430-015-0396-z>.
- SPELLEBERG, A.E., 1952. [Increase of athletic effectiveness by systematic ultraviolet irradiation]. *Strahlentherapie* [en línea], vol. 88, no. 3-4, pp. 567-70. ISSN 0039-2073. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12995209>.
- SRIKUEA, R., ZHANG, X., PARK-SARGE, O.-K. y ESSER, K. a., 2012. VDR and CYP27B1 are expressed in C2C12 cells and regenerating skeletal muscle: potential role in suppression of myoblast proliferation. *AJP: Cell Physiology*, vol. 303, no. 4, pp. C396-C405. ISSN 0363-6143. DOI 10.1152/ajpcell.00014.2012.
- STOUT, A.P., 1946. Rhabdomyosarcoma of the Skeletal Muscles. *Annals of surgery* [en línea], vol. 123, no. 3, pp. 447-72. ISSN 0003-4932. DOI 10.1097/00000658-194603000-00011. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17858752>.
- STRINGER, C., 2016. The origin and evolution of Homo sapiens. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* [en línea], vol. 371, no. 1698, pp. 20150237. ISSN 1471-2970. DOI 10.1098/rstb.2015.0237. Disponible en: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/lookup/doi/10.1098/rstb.2015.0237>.
- STROBER, W., 2015. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current protocols in immunology* [en línea], vol. 111, pp. A3.B.1-3. ISSN 1934-368X. DOI 10.1002/0471142735.ima03bs111. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26529666>.
- SUARES, A., MORI SEQUEIROS GARCIA, M., PAZ, C. y GONZÁLEZ-PARDO, V., 2017. Antiproliferative effects of Bortezomib in endothelial cells transformed by viral G protein-coupled receptor associated to Kaposi's sarcoma. *Cellular signalling* [en línea], vol. 32, pp. 124-132. ISSN 1873-3913. DOI 10.1016/j.cellsig.2017.01.025. Disponible en:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898656817300311>.

SUDA, T., UDAGAWA, N., NAKAMURA, I., MIYAURA, C. y TAKAHASHI, N., 1995. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone* [en línea], vol. 17, no. 2 Suppl, pp. 87S-91S. ISSN 8756-3282. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8579904>.

SULTAN, I., QADDOUMI, I., YASER, S., RODRIGUEZ-GALINDO, C. y FERRARI, A., 2009. Comparing adult and pediatric rhabdomyosarcoma in the surveillance, epidemiology and end results program, 1973 to 2005: an analysis of 2,600 patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* [en línea], vol. 27, no. 20, pp. 3391-7. ISSN 1527-7755. DOI 10.1200/JCO.2008.19.7483. Disponible en: <http://jco.ascopubs.org/cgi/doi/10.1200/JCO.2008.19.7483>.

SUN, Y., TANG, S., JIN, X., ZHANG, C., ZHAO, W. y XIAO, X., 2013. Involvement of the p38 MAPK signaling pathway in S-phase cell-cycle arrest induced by Furazolidone in human hepatoma G2 cells. *Journal of applied toxicology : JAT* [en línea], vol. 33, no. 12, pp. 1500-5. ISSN 1099-1263. DOI 10.1002/jat.2829. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/jat.2829>.

TAKEDA, D.Y. y DUTTA, A., 2005. DNA replication and progression through S phase. *Oncogene* [en línea], vol. 24, no. 17, pp. 2827-2843. ISSN 0950-9232. DOI 10.1038/sj.onc.1208616. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.onc.1208616>.

TAKEDA, S., YOSHIKAWA, T., NAGAI, Y., YAMATO, H., FUKUMOTO, S., SEKINE, K., KATO, S., MATSUMOTO, T. y FUJITA, T., 1999. Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: studies using VDR knockout mice. *Endocrinology* [en línea], vol. 140, no. 2, pp. 1005-8. ISSN 0013-7227. DOI 10.1210/endo.140.2.6673. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9927335>.

TESKE, K.A., YU, O.B. y ARNOLD, L.A., 2016. Inhibitors for the Vitamin D Receptor-Coregulator Interaction. *Vitamins and hormones* [en línea], 1. vol. 100, no. Midd, pp. 45-82. ISSN 0083-6729. DOI 10.1016/bs.vh.2015.10.002. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.vh.2015.10.002>.

TOYOSHIMA, H. y HUNTER, T., 1994. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* [en línea], vol. 78, no. 1, pp. 67-74. ISSN 0092-8674. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8033213>.

TURNER, A.G., ANDERSON, P.H. y MORRIS, H.A., 2012. Vitamin D and bone health. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum* [en línea], vol. 243, no. Suppl 243, pp. 65-72. ISSN 2166-1030. DOI 10.3109/00365513.2012.681963. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22536765>.

UHMANN, A., NIEMANN, H., LAMMERING, B., HENKEL, C., HES, I., ROSENBERGER, A., DULLIN,

- C., SCHRAEPLER, A., SCHULZ-SCHAEFFER, W. y HAHN, H., 2012. Calcitriol inhibits hedgehog signaling and induces vitamin d receptor signaling and differentiation in the patched mouse model of embryonal rhabdomyosarcoma. *Sarcoma* [en línea], vol. 2012, pp. 357040. ISSN 1369-1643. DOI 10.1155/2012/357040. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22550417>.
- UMESONO, K., MURAKAMI, K.K., THOMPSON, C.C. y EVANS, R., 1991. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* [en línea], vol. 65, no. 7, pp. 1255-66. ISSN 0092-8674. DOI 10.1016/0092-8674(91)90020-Y. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1648450>.
- UNGEFROREN, H., SEBENS, S., GROTH, S., GIESELER, F. y FÄNDRICH, F., 2011. The Src family kinase inhibitors PP2 and PP1 block TGF-beta1-mediated cellular responses by direct and differential inhibition of type I and type II TGF-beta receptors. *Current cancer drug targets*, vol. 11, no. January 2016, pp. 524-535. ISSN 15680096. DOI 10.2174/156800911795538075.
- VAN DRIEL, M., KOEDAM, M., BUURMAN, C.J., HEWISON, M., CHIBA, H., UITTERLINDEN, A.G., POLS, H.A.P. y VAN LEEUWEN, J.P.T.M., 2006. Evidence for auto/paracrine actions of vitamin D in bone: 1alpha-hydroxylase expression and activity in human bone cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* [en línea], vol. 20, no. 13, pp. 2417-9. ISSN 1530-6860. DOI 10.1096/fj.06-6374fje. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17023519>.
- VERLINDEN, L., VERSTUYF, a., CONVENTS, R., MARCELIS, S., VAN CAMP, M. y BOUILLON, R., 1998. Action of 1,25(OH)2D3 on the cell cycle genes, cyclin D1, p21 and p27 in MCF-7 cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 142, no. 1-2, pp. 57-65. ISSN 03037207. DOI 10.1016/S0303-7207(98)00117-8.
- VERMES, I., HAANEN, C., STEFFENS-NAKKEN, H. y REUTELINGSPERGER, C., 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological methods* [en línea], vol. 184, no. 1, pp. 39-51. ISSN 0022-1759. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7622868>.
- VIALLARD, J.F., LACOMBE, F., BELLOC, F., PELLEGRIN, J.L. y REIFFERS, J., 2001. [Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique* [en línea], vol. 5, no. 2, pp. 109-29. ISSN 1278-3218. DOI 10.1016/S1278-3218(01)00087-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11355576>.
- VOLONTE, D., 2004. The modulation of caveolin-1 expression controls satellite cell activation during muscle repair. *The FASEB Journal* [en línea], vol. 19, no. 2, pp. 237-9. ISSN 0892-6638. DOI

- 10.1096/fj.04-2215fje. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15545301>.
- VUOLO, L., DI SOMMA, C., FAGGIANO, A. y COLAO, A., 2012. Vitamin D and Cancer. *Frontiers in Endocrinology* [en línea], vol. 3, no. April, pp. 1-13. ISSN 1664-2392. DOI 10.3389/fendo.2012.00058. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3355893/>.
- WACKER, M. y HOLIACK, M.F., 2013. *Vitamin D-effects on skeletal and extraskkeletal health and the need for supplementation* [en línea]. enero 2013. S.I.: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). ISBN 2072-6643 (Electronic)r2072-6643 (Linking). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23306192>.
- WALENTOWICZ-SADŁECKA, M., SADŁECKI, P., WALENTOWICZ, P. y GRABIEC, M., 2013. [The role of vitamin D in the carcinogenesis of breast and ovarian cancer]. *Ginekologia polska* [en línea], vol. 84, no. 4, pp. 305-8. ISSN 0017-0011. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23700865>.
- WALI, R.K., KONG, J., SITRIN, M.D., BISSONNETTE, M. y LI, Y.C., 2003. Vitamin D receptor is not required for the rapid actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 to increase intracellular calcium and activate protein kinase C in mouse osteoblasts. *Journal of cellular biochemistry* [en línea], vol. 88, no. 4, pp. 794-801. ISSN 0730-2312. DOI 10.1002/jcb.10432. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12577313>.
- WALRAND, S., 2016. Effect of vitamin D on skeletal muscle. *Geriatric et psychologie neuropsychiatrie du vieillissement* [en línea], vol. 14, no. 2, pp. 127-134. ISSN 2115-7863. DOI 10.1684/pnv.2016.0599. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27100224>.
- WALSTON, J. y FRIED, L.P., 1999. Frailty and the older man. *The Medical clinics of North America* [en línea], vol. 83, no. 5, pp. 1173-94. ISSN 0025-7125. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10503059>.
- WANG, D.S., YAMAZAKI, K., NOHTOMI, K., SHIZUME, K., OHSUMI, K., SHIBUYA, M., DEMURA, H. y SATO, K., 1996. Increase of vascular endothelial growth factor mRNA expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human osteoblast-like cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* [en línea], vol. 11, no. 4, pp. 472-9. ISSN 0884-0431. DOI 10.1002/jbmr.5650110408. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8992878>.
- WANG, H., GARZON, R., SUN, H., LADNER, K.J., SINGH, R., DAHLMAN, J., CHENG, A., HALL, B.M., QUALMAN, S.J., CHANDLER, D.S., CROCE, C.M. y GUTTRIDGE, D.C., 2008. NF-κB-YY1-miR-29 Regulatory Circuitry in Skeletal Myogenesis and Rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell* [en línea], vol. 14, no. 5, pp. 369-381. ISSN 15356108. DOI 10.1016/j.ccr.2008.10.006.

Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2008.10.006>.

WANG, W.-L.W., CHATTERJEE, N., CHITTUR, S. V, WELSH, J. y TENNISWOOD, M.P., 2011. Effects of 1 α ,25 dihydroxyvitamin D3 and testosterone on miRNA and mRNA expression in LNCaP cells. *Molecular cancer* [en línea], vol. 10, pp. 58. ISSN 1476-4598. DOI 10.1186/1476-4598-10-58. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21592394>.

WANG, W.-L.W. y TENNISWOOD, M., 2014. Vitamin D, intermediary metabolism and prostate cancer tumor progression. *Frontiers in physiology* [en línea], vol. 5, no. May, pp. 183. ISSN 1664-042X. DOI 10.3389/fphys.2014.00183. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2014.00183/abstract>.

WANG, Y. y DELUCA, H.F., 2011. Is the vitamin D receptor found in muscle? *Endocrinology*, vol. 152, no. 2, pp. 354-363. ISSN 00137227. DOI 10.1210/en.2010-1109.

WEBER, C.O.C. y VIRCHOW, R., 1854. Anatomisehe Untersuehung einer hypertrophischen 7 , unge nebst Bemerkungen fiber die Neubildung quergestreifter Muskelfasern . *Virchows Arch A Pathol Anat.* [en línea], vol. 7, no. 1, pp. 115-25. ISSN 0945-6317. DOI 10.1007/BF01936232. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/BF01936232>.

WEINBERG, R.A., 2014. *The biology of cancer* [en línea]. 2nd. New York, NY: Garland Science, Taylor & Francis Group. ISBN 978-0-8153-4220-5. Disponible en: <http://www.garlandscience.com/product/isbn/9780815342205>.

WIGGINTON, J.E., CUTLER, D.J. y ABECASIS, G.R., 2005. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *American journal of human genetics* [en línea], vol. 76, no. 5, pp. 887-93. ISSN 0002-9297. DOI 10.1086/429864. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002929707607356>.

WINTERMEYER, E., IHLE, C., EHNERT, S., STÖCKLE, U., OCHS, G., DE ZWART, P., FLESCHE, I., BAHRS, C. y NUSSLER, A.K., 2016. Crucial Role of Vitamin D in the Musculoskeletal System. *Nutrients* [en línea], vol. 8, no. 6, pp. 319. ISSN 2072-6643. DOI 10.3390/nu8060319. Disponible en: <http://www.mdpi.com/2072-6643/8/6/319>.

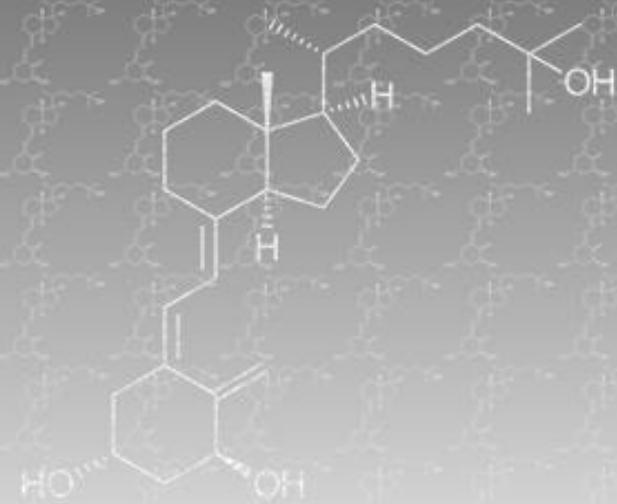
WOLFE, R.R., 2006. The underappreciated role of muscle in health and disease. *The American journal of clinical nutrition* [en línea], vol. 84, no. 3, pp. 475-82. ISSN 0002-9165. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16960159>.

WONGDEE, K. y CHAROENPHANDHU, N., 2015. Vitamin D-enhanced duodenal calcium transport. *Vitamins and Hormones* [en línea], vol. 98, pp. 407-440. ISSN 00836729. DOI 10.1016/bs.vh.2014.12.010. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25817876>.

WOO, R.A. y POON, R.Y.C., 2003. Cyclin-Dependent Kinases and S Phase Control in Mammalian

- Cells. *Cell Cycle* [en línea], vol. 2, no. 4, pp. 315-323. ISSN 1538-4101. DOI 10.4161/cc.2.4.468. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12851482>.
- WU, Z., WOODRING, P.J., BHAKTA, K.S., TAMURA, K., WEN, F., FERAMISCO, J.R., KARIN, M., WANG, J.Y. y PURI, P.L., 2000. P38 and Extracellular Signal-Regulated Kinases Regulate the Myogenic Program At Multiple Steps. *Molecular and cellular biology*, vol. 20, no. 11, pp. 3951-3964. ISSN 0270-7306. DOI 10.1128/MCB.20.11.3951-3964.2000.
- YAFFE, D. y SAXEL, O., 1977. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* [en línea], vol. 270, no. 5639, pp. 725-7. ISSN 0028-0836. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/563524>.
- YAMSHCHIKOV, A. V., DESAI, N.S., BLUMBERG, H.M., ZIEGLER, T.R. y TANGPRICHA, V., 2009. Vitamin D for treatment and prevention of infectious diseases: a systematic review of randomized controlled trials. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* [en línea], vol. 15, no. 5, pp. 438-49. ISSN 1934-2403. DOI 10.4158/EP09101.ORR. Disponible en: <http://journals.aace.com/doi/abs/10.4158/EP09101.ORR>.
- YASUTIS, K. y KOZMINSKI, K., 2013. Cell cycle checkpoint regulators reach a zillion. *Cell Cycle* [en línea], vol. 12, no. 10, pp. 1501-1509. ISSN 1538-4101. DOI 10.4161/cc.24637. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23598718>.
- YEOW, K., PHILLIPS, B., DANI, C., CABANE, C., AMRI, E.Z. y DÉRIJARD, B., 2001. Inhibition of myogenesis enables adipogenic trans-differentiation in the C2C12 myogenic cell line. *FEBS Letters* [en línea], vol. 506, no. 2, pp. 157-162. ISSN 00145793. DOI 10.1016/S0014-5793(01)02900-3. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793%2801%2902900-3>.
- YOON, J.S., KIM, J.Y., PARK, H.K., KIM, E.S., AHN, K.S., YOON, S.S., CHO, C.G., KIM, B.K. y LEE, Y.Y., 2008. Antileukemic effect of a synthetic vitamin D3 analog, HY-11, with low potential to cause hypercalcemia. *International journal of oncology* [en línea], vol. 32, no. 2, pp. 387-96. ISSN 1019-6439. DOI 10.3892/ijo.32.2.387. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18202761>.
- ZANELLO, L.P. y NORMAN, A.W., 2004. Rapid modulation of osteoblast ion channel responses by 1alpha,25(OH)2-vitamin D3 requires the presence of a functional vitamin D nuclear receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [en línea], vol. 101, no. 6, pp. 1589-94. ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.0305802101. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=341781&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- ZANELLO, S.B., COLLINS, E.D., MARINISSEN, M.J., NORMAN, A.W., BOLAND, R.L. y BASIC, O.,

1997. Vitamin D Receptor Expression in Chicken Muscle Tissue and Cultured Myoblasts. *Hormone and Metabolic Research* [en línea], vol. 29, no. 5, pp. 231-236. ISSN 0018-5043. DOI 10.1055/s-2007-979027. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9228208>.
- ZARUBIN, T. y HAN, J., 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell research* [en línea], vol. 15, no. 1, pp. 11-8. ISSN 1001-0602. DOI 10.1038/sj.cr.7290257. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15686620>.
- ZETTERBERG, A., LARSSON, O. y WIMAN, K.G., 1995. What is the restriction point? *Current opinion in cell biology* [en línea], vol. 7, no. 6, pp. 835-42. ISSN 0955-0674. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608014>.
- ZHANG, R.H., HE, D.H., ZHOU, B., ZHU, Y.B., ZHAO, D., HUANG, L.C. y DING, G.Q., 2015. Analysis of Vitamin D Status in Men Highly Exposed to Sunlight. *Biomedical and environmental sciences: BES* [en línea], vol. 28, no. 12, pp. 913-6. ISSN 0895-3988. DOI 10.3967/bes2015.125. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26777911>.
- ZMUDA, J.M., CAULEY, J. a y FERRELL, R.E., 2000. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. *Epidemiol.Rev* [en línea], vol. 22, no. 2, pp. 203-217. ISSN 0193-936X. Disponible en: <http://epirev.oxfordjournals.org/content/22/2/203.full.pdf>.



Trabajos Generados

Trabajos generados a partir de esta Tesis

Publicaciones en revistas científicas con referato

- **IRAZOQUI AP**, BOLAND RL y BUITRAGO CG, 2014. Actions of $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 on the cellular cycle depend on VDR and p38 MAPK in skeletal muscle cells. *Journal of molecular endocrinology* [en línea], vol. 53, no. 3, pp. 331-43. ISSN 1479-6813. DOI 10.1530/JME-14-0102.
- **IRAZOQUI AP**, HEIM NB, BOLAND RL y BUITRAGO CG, 2015. $1\alpha,25$ dihydroxyvitamin D_3 modulates CDK4 and CDK6 expression and localization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [en línea], vol. 459, no. 1, pp. 2-7. ISSN 0006291X. DOI 10.1016/j.bbrc.2015.02.083.
- **IRAZOQUI AP** y BUITRAGO CG, $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 inhibited proliferation and triggered apoptosis in rhabdomyosarcoma cells of RD cell line. En revision, agosto 2017

Resúmenes publicados en revistas científicas

- **Ana P. Irazoqui**, Claudia G. Buitrago and Ricardo L. Boland. "El VDR participa en la regulación del ciclo celular impartida por el $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamina D_3 en células de músculo esquelético". Actualizaciones en Osteología vol. 9; 39-40, supl. I – 2013.
- **Irazoqui AP**, Boland RL, Buitrago CG. "VDR involvement in $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 -dependent cell cycle modulation in skeletal muscle cells". Biocell vol. 37; 45 supplement 2013.
- **Ana P. Irazoqui**, Claudia G. Buitrago and Ricardo L. Boland. "VDR y p38 MAPK están involucrados en la modulación de la miogénesis por el $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamina D_3 en células de músculo esquelético". Actualizaciones en Osteología vol. 10; 48, supl. I – 2014.

- **Irazoqui AP**, Boland RL, Buitrago CG. “ $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 -modulation of cyclin dependent kinases 4 and 6 in skeletal muscle cells”. *Biocell* vol. 38; 184 sup 2 - 2014.
- **Irazoqui AP**, Boland RL, Buitrago CG. “Las células de Rabdomiosarcoma responden al tratamiento con $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamina D_3 induciendo la activación de MAPK y la expresión del VDR”. *Actualizaciones en Osteología* vol. 11; 70, supl. I – 2015.
- **Irazoqui, AP** y Buitrago CG. “Efectos del $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamina D_3 en células de rabdomiosarcoma a nivel del ciclo celular”. *Actualizaciones en Osteología* vol. 12; 42, supl. I – 2016.

Presentaciones a congreso

Esta Tesis Doctoral ha generado 10 presentaciones a congresos nacionales e internacionales.