



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia**

**TESIS DOCTORAL EN BIOLOGÍA**

**Estudio de la apoptosis y autofagia  
como parte del mecanismo  
antineoplásico de la vitamina D en el  
sarcoma de Kaposi**

**Licenciada Alejandra Carolina Suares**

**Bahía Blanca**

**Argentina**

**2018**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia**

**TESIS DOCTORAL EN BIOLOGÍA**

**Estudio de la apoptosis y autofagia  
como parte del mecanismo  
antineoplásico de la vitamina D en el  
sarcoma de Kaposi**

**Licenciada Alejandra Carolina Suares**

**Bahía Blanca**

**Argentina**

**2018**

Director de Tesis

**Dra. María Verónica González Pardo**

Lugar

Laboratorio de Química Biológica-Endocrinología Básica I

INBIOSUR (CONICET-UNS)

## PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar el grado académico de Doctor en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el laboratorio de Química Biológica (Endocrinología básica I) perteneciente al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, dependiente de la Universidad Nacional del Sur y CONICET, durante el período comprendido entre el 01 de Abril de 2014 hasta el 9 de Noviembre de 2018, bajo la dirección de la Dra. María Verónica González Pardo.

Lic. Alejandra Carolina, SUARES

12 de Noviembre de 2018

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 ....../...../..... , mereciendo la calificación de.....(.....)

*A mi familia,*

*Por ser un pilar fundamental en todo lo que soy, en mi educación, tanto académica como de la vida y por su incondicional apoyo.*

## *Agradecimientos:*

La presente tesis es un reto académico y personal, constituye un proceso en el que de un modo u otro, personas importantes de mi vida han contribuido con su enriquecimiento, de una manera concreta y práctica, o demostrando su interés, cercanía y apoyo moral.

Por ello quiero expresar mi profundo agradecimiento:

- A la Universidad Nacional del Sur y al Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur por el soporte institucional y a todo su personal administrativo que facilitan la tarea diaria.

- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por concederme una beca de postgrado que permitió la realización de este trabajo de Tesis.

- Al Dr. Ricardo Boland y la Dra. Ana Russo de Boland por abrirme las puertas de su laboratorio y confiar en mí en mis primeros pasos como profesional.

- A la Dra. Ma. Verónica González Pardo, porque sin ella no hubiese sido posible la realización de este trabajo. Gracias por transitar este camino conmigo, por tu confianza, apoyo, comprensión y por tu compromiso con este proyecto.

- A los integrantes del Laboratorio de Química Biológica, por los mates, consejos, charlas de mesada, por formar parte de mis días durante tantos años.

- A mi familia, Graciela, Ester y Walter, por brindarme su amor incondicional, por su formación, sus consejos, por estar presentes y acompañarme en cada momento de mi vida.

- A mis amigos, la familia que me dio la vida, a cada uno de ellos les agradezco por formar parte de mi vida, por estar incondicionalmente a la par y hacerme tan feliz.

## RESUMEN

El herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi, KSHV, es el agente etiológico del sarcoma de Kaposi. Dentro del genoma viral, el receptor viral acoplado a proteína G (vGPCR) conduce a la oncogénesis y angiogénesis; su expresión persistente y actividad es necesaria para el mantenimiento del tumor. La forma hormonal activa de la vitamina D,  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , presenta efectos antineoplásicos en varios tipos de tumores. El potencial anti-proliferativo y antiinflamatorio del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en células endoteliales que expresan el vGPCR ha sido explorado por nuestro grupo. En los últimos años se ha incrementado el uso de análogos sintéticos del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  con menor actividad calcémica para minimizar la hipercalcemia producida por dosis altas del metabolito. En este trabajo de Tesis Doctoral se profundizó en el mecanismo de acción antineoplásico del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y su análogo menos calcemiante TX 527. Se obtuvo evidencia que ambos compuestos promueven la apoptosis a través de un desbalance entre los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 en células vGPCR. Se observó un aumento en los niveles de expresión de la proteína pro-apoptótica BIM y disminución de A20 por un mecanismo dependiente del VDR y un pico de inactivación en la fosforilación de BAD acompañado por la formación de complejos con Bcl-2, alterando posiblemente la integridad de la mitocondria. También, se demostró que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 inducen autofagia a través de la inactivación del eje PI3K/Akt/mTOR y regulación de BECN1 como parte del mecanismo antineoplásico de acción. Asimismo, ambos agonistas regulan la proliferación de las células vGPCR mediante la inactivación de ERK1/2 y p38 y aumento de la expresión de las fosfatasas MKP-3 y MKP-5. Eventos regulados por la expresión del VDR, con excepción de ERK1/2, debido probablemente a una regulación no genómica de esta quinasa. El Bortezomib, inhibidor del proteasoma y de la activación de NF- $\kappa$ B, disminuyó la proliferación celular e indujo apoptosis por un mecanismo similar a los agonistas del VDR en células vGPCR. Proceso acompañado además por la activación del factor de transcripción FOXO1, disminución en la expresión génica de VEGF y aumento del inhibidor del ciclo celular, p21. Debido a las limitaciones que presentan los cultivos celulares bidimensionales, se desarrolló un método para obtener esferoides multicelulares a partir de células endoteliales y transformadas por la expresión del vGPCR. Las células vGPCR cultivadas

en una superficie de baja adherencia desarrollaron esferoides de mayor tamaño y el tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  produjo cambios morfológicos con la consecuente inducción de apoptosis. A nivel molecular, se observó un aumento en la expresión génica del VDR, BIM y p21 al aumentar la dosis. Además, el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  provocó un aumento en los niveles proteicos de BIM y disminuyó la activación de ERK1/2 y Akt, permitiendo concluir que las células en cultivos tridimensionales responden al agonista de manera similar a lo observado en cultivos en monocapa. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis contribuyen al conocimiento del mecanismo de acción anti-proliferativo del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y su análogo menos calcemiante TX 527 en un modelo celular de sarcoma de Kaposi. A su vez, sustenta las bases para dar continuación a otros estudios en modelos *in vivo* y evaluar su potencial aplicación, sólo o en combinación con Bortezomib, en el tratamiento de esta patología.

## SUMMARY

The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV, is the etiological agent of Kaposi's sarcoma. Within the viral genome, the viral G protein-coupled receptor (vGPCR) leads to oncogenesis and angiogenesis; its persistent expression and activity are necessary for tumor maintenance. The active hormonal form of vitamin D,  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , has antineoplastic effects in several types of tumors. The anti-proliferative and anti-inflammatory potential of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in endothelial cells expressing vGPCR has been explored by our group. In recent years, the use of synthetic analogues of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  with lower calcemic activity has been increased to minimize the hypercalcemia produced by high doses of the metabolite. In this Doctoral Thesis work, the antineoplastic mechanism of action of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  and its less calcemic analogue TX 527 was studied. Evidence was obtained that both compounds promote apoptosis through an imbalance of Bcl-2 protein family members in vGPCR cells. An increase of pro-apoptotic BIM and a decrease of A20 protein expression levels by a VDR-dependent mechanism was observed, as well as, a peak of inactivation of phosphorylated BAD accompanied by its association with Bcl-2, possibly altering mitochondria integrity. It was also demonstrated that  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  and TX 527 induce autophagy through the inactivation of the PI3K/Akt/mTOR axis and regulation of BECN1 as part of the antineoplastic mechanism of action. Moreover, both agonists regulate vGPCR cells proliferation by inactivating ERK1/2 and p38 and increasing MKP-3 and MKP-5 phosphatases expression. These events were regulated by VDR expression, with the exception of ERK1/2, probably due to a non-genomic regulation of this kinase. Bortezomib, an inhibitor of proteasome and NF- $\kappa$ B activation, decreased cell proliferation and induced apoptosis by a similar mechanism to VDR agonists in vGPCR cells. Process also accompanied by the activation of the transcription factor FOXO1, decrease in VEGF gene expression and increase of the cell cycle inhibitor, p21. Due to the limitations of two-dimensional cell cultures, a method was developed to obtain multicellular spheroids from endothelial cells and transformed by the expression of vGPCR. vGPCR cells cultured on a low adhesion surface developed larger spheroids and treatment with  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  triggered morphological changes with consequent apoptosis induction. At molecular level, an increase in VDR, BIM and p21

gene expression was observed when dose was increased. In addition,  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  caused an increase in BIM protein levels and decreased the activation of ERK1/2 and Akt, allowing to conclude that cells in three-dimensional cultures respond to the agonist in a similar way to that observed in monolayer cultures. The results obtained in this thesis work contribute to the knowledge of the anti-proliferative mechanism of action of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  and its less calcemic analogue TX 527 in a cellular model of Kaposi's sarcoma. In turn, it supports the bases to continue other studies *in vivo* models and evaluate their potential application, either alone or in combination with Bortezomib, in the treatment of this pathology.

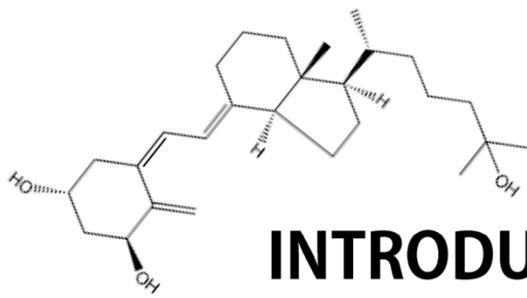
## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
SARCOMA DE KAPOSI .....	5
Oncogénesis del sarcoma de Kaposi.....	7
VITAMINA D .....	10
Estructura y síntesis de la vitamina D .....	10
Regulación del metabolismo de la vitamina D .....	12
Mecanismo de acción de la vitamina D .....	14
Características del VDR.....	14
Acción genómica de la vitamina D .....	15
Acciones no genómicas de la vitamina D .....	17
Vitamina D y cáncer.....	18
Análogos de la Vitamina D.....	22
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>26</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
Objetivos generales .....	26
Objetivos específicos .....	26
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
MATERIALES .....	29
MÉTODOS.....	30
MODELO EXPERIMENTAL .....	30
CULTIVO CELULAR.....	32
Cultivo celular en monocapa (Cultivo bidimensional) .....	32
Cultivo de esferoides multicelulares (Cultivo tridimensional) .....	34
TRATAMIENTOS .....	36
Co-INMUNOPRECIPITACIÓN.....	36
PROCESAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS .....	37
ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) .....	37
WESTERN BLOT .....	38
Electrotransferencia .....	38
Bloqueo de sitios inespecíficos e incubación con anticuerpos.....	38

Anticuerpos y diluciones.....	39
Lavado de anticuerpos .....	40
FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.....	40
TRANSFECCIÓN DE PLÁSMIDOS.....	41
ENSAYO DE PROLIFERACIÓN .....	41
INMUNOCITOQUÍMICA.....	42
MICROSCOPIA.....	42
Microscopía de fluorescencia .....	42
Microscopía confocal.....	43
PCR CUANTITATIVA.....	43
Extracción del ARN total .....	43
Transcripción reversa .....	44
Análisis de expresión de genes .....	44
Análisis estadístico .....	45
<b>CAPITULO I: Regulación de vías de señalización involucradas en la apoptosis inducida por <math>1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3</math> y TX 527 .....</b>	<b>47</b>
INTRODUCCIÓN .....	48
RESULTADOS .....	53
<i>El desbalance dentro de la familia de proteínas Bcl-2 desencadena la apoptosis inducida por el <math>1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3</math> y TX 527 .....</i>	<i>53</i>
<i>El <math>1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3</math> y TX 527 regulan la expresión de BIM por un mecanismo dependiente del VDR.....</i>	<i>58</i>
<i>El <math>1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3</math> y TX 527 modulan la activación de BAD en células vGPCR .....</i>	<i>63</i>
<i>El <math>1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3</math> y TX 527 regulan los niveles de A20 por un mecanismo dependiente del VDR.....</i>	<i>65</i>
<i>El Bortezomib induce la apoptosis regulando el balance de proteínas anti- y pro-apoptóticas similarmente a los agonistas del VDR .....</i>	<i>70</i>
DISCUSIÓN .....	72
CONCLUSIÓN.....	76
<b>CAPITULO II: Inducción de la autofagia por <math>1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3</math> y TX 527 en células endoteliales transformadas por vGPCR.....</b>	<b>77</b>
INTRODUCCIÓN .....	78

RESULTADOS .....	83
<i>El 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> y su análogo menos calcemiante TX 527, ejercen sus efectos anti-proliferativos por un mecanismo que depende de la inactivación de Akt .....</i>	83
<i>El 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> inhibe la translocación de Akt fosforilada al núcleo .....</i>	86
<i>El 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> y TX 527 disminuyen la activación de Akt por un mecanismo que depende del VDR.....</i>	88
<i>De manera similar a los agonistas del VDR, el Bortezomib disminuye la fosforilación de Akt en células vGPCR .....</i>	88
<i>El 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> y TX 527 inducen cambios en la expresión de BECN1 .....</i>	91
<i>El 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> y TX 527 inhiben la fosforilación de mTOR e inducen la autofagia .....</i>	94
<i>La inhibición de la vía PI3K/Akt/mTOR induce autofagia y es dependiente del VDR .....</i>	96
DISCUSIÓN.....	98
CONCLUSIÓN .....	100
<b>CAPITULO III: Regulación y participación de las MAPKs en el mecanismo de acción del 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> y TX 527.....</b>	<b>101</b>
INTRODUCCIÓN.....	102
RESULTADOS .....	106
<i>El 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> y TX 527 ejercen sus efectos anti-proliferativos a través de la inhibición de las MAPKs .....</i>	106
<i>El 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> y TX 527 modulan la expresión de las MAPK fosfatasas .....</i>	111
<i>El 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> inhibe la translocación de ERK1/2 y p38 MAPK en su forma activa al núcleo .....</i>	113
<i>Dependencia del VDR en la regulación de MAPKs y MKPs por el 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> y TX 527 .....</i>	115
<i>De manera similar a los agonistas del VDR, el Bortezomib inhibe la proliferación de las células vGPCR .....</i>	117
<i>El Bortezomib modula el estado de fosforilación de ERK1/2 y los niveles proteicos de MKP-3 en células vGPCR .....</i>	119
<i>El Bortezomib regula la localización de ERK1/2 fosforilada.....</i>	122
<i>El Bortezomib actúa a través de un mecanismo que involucra la activación y modulación del factor de transcripción FOXO1.....</i>	122

<i>El Bortezomib induce un aumento en la expresión de p21 en forma dependiente de MKP-3</i> .....	125
<i>El Bortezomib inhibe la expresión de VEGF a través de la inactivación de ERK1/2</i> .....	127
DISCUSIÓN .....	129
CONCLUSIÓN .....	132
<b>CAPITULO IV: Desarrollo de esferoides multicelulares a partir de células endoteliales y transformadas por el receptor vGPCR: Rol del <math>1\alpha,25(OH)_2D_3</math></b> .....	<b>133</b>
INTRODUCCIÓN .....	134
RESULTADOS .....	137
<i>Desarrollo de esferoides multicelulares a partir de células SVEC y vGPCR</i> .....	137
<i>El <math>1\alpha,25(OH)_2D_3</math> promueve cambios morfológicos en esferoides de células vGPCR</i> .....	141
<i>El <math>1\alpha,25(OH)_2D_3</math> induce apoptosis en esferoides obtenidos de células vGPCR</i> .....	143
DISCUSIÓN .....	148
CONCLUSIÓN .....	149
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	<b>151</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>156</b>
<b>PUBLICACIONES DE LA TESIS</b> .....	<b>178</b>



# INTRODUCCIÓN

---

---

# INTRODUCCIÓN

Aproximadamente el 12% de los cánceres humanos en todo el mundo son causados por la infección de oncovirus y más del 80% de los casos se presentan en países en desarrollo (Bouvard et al., 2009; de Martel et al., 2012). La oncogénesis viral es un caso especial de adaptación de los virus persistentes capaces de integrarse al genoma del hospedador, destruyendo vías reguladoras del huésped para asegurar su replicación y supervivencia a largo plazo (Martin and Gutkind, 2008; Mesri et al., 2014). La oncogénesis viral humana tiene rasgos comunes, entre los que se destacan: i) los oncovirus son necesarios pero no suficientes para el desarrollo del cáncer, por lo que la incidencia de esta patología es menor que la prevalencia del virus en las poblaciones humanas, ii) los cánceres virales aparecen en el contexto de infecciones persistentes y ocurren muchos años o décadas después de la infección aguda, iii) el sistema inmunológico puede desempeñar un rol que resulte perjudicial o benéfico, ya que algunos tipos de cánceres asociados a virus humanos aumentan con la inmunosupresión y otros aparecen en el contexto de la inflamación crónica. Cada rasgo distintivo representa una consecuencia biológica de las alteraciones oncogénicas que subyacen a las características fenotípicas del tumor (Mesri et al., 2014).

La co-evolución de los oncovirus y sus hospedadores es una lucha por la supervivencia. Los hospedadores desarrollan defensas inmunitarias contra las infecciones virales, mientras que los virus desarrollan mecanismos que le permiten evadir esta respuesta inmune y otras restricciones del hospedador. Como parte de sus estrategias de replicación y evasión del sistema inmune, los oncovirus humanos han desarrollado programas anti-apoptóticos y proliferativos que pueden inducir directamente en las células infectadas. Cuando estos programas superan la capacidad del hospedador de mantener la homeostasis tisular, se desencadenan cambios que en última instancia conducen al desarrollo del cáncer (Moore and Chang, 2010; zur Hausen, 2009). Estos mecanismos incluyen: i) simulación de la señalización presente en el hospedador, los virus tienen la capacidad de codificar proteínas que en general imitan a moléculas presentes en el hospedador y de esta manera alteran vías de señalización que regulan el crecimiento y la proliferación celular, ii) efectos en la respuesta al daño en el ADN (DDR), el reconocimiento de genomas virales o

intermedios replicativos por parte del huésped, conducen a la inducción de DDR, que muchos oncovirus necesitan para su replicación. Como consecuencia, sin embargo, las células huésped adquieren inestabilidad genómica, lo que aumenta su tasa de mutación y acelera la adquisición de alteraciones cromosómicas del huésped oncogénico (Weitzman and Weitzman, 2014), y iii) Respuestas inflamatorias crónicas a la infección viral persistente, la inflamación impulsa la generación de especies reactivas de oxígeno que promueve la adquisición de mutaciones. Esto se observa en las infecciones crónicas por el virus de la hepatitis humana B (HVB) y C (HVC), donde las respuestas inflamatorias provocadas por el virus conducen a hepatitis, fibrosis, cirrosis y eventualmente carcinoma hepatocelular (**Figura 4**) (Arzumanyan et al., 2011; Mesri et al., 2014).

A

### Estrategias de persistencia en la replicación de oncovirus

- Crear las condiciones para la replicación.
- Asegurarse la correcta replicación viral.
- Maximizar la producción de virus.
- Incrementar la multiplicación de episomas latentes.



B

Virus	Cáncer	v-oncogen	Regulación	Hallmarks afectados										
KSHV	SK	vFLIP	NFκB											
		vLANA	p53, Rb, HIF, Notch Wnt											
		vGPCR	PI3K-Akt-mTOR, ERK, p38, JNK, NFκB											
		vIRF-1	αIFN, p53, ATM, BIM											

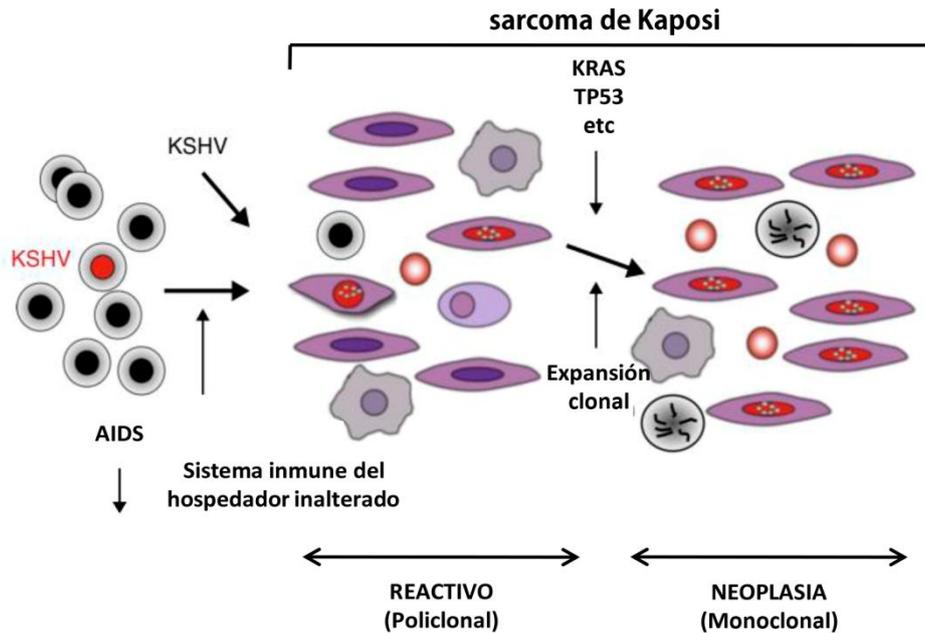
**Figura 4. Estrategias oncogénicas y virus humanos.** A) Muchos de los mecanismos moleculares implementados por los oncovirus humanos para maximizar la replicación y persistencia viral implican el secuestro de la maquinaria de señalización del hospedador lo que lleva al desarrollo de diferentes rasgos distintivos en las células, que en algunos casos llegarán a desarrollar características tumorales. B) La tabla muestra el virus KSHV con sus respectivos oncogenes virales, las principales vías que regula en la célula hospedadora y el rasgo o característica distintiva que puede inducir. Adaptado de Mesri y col. (Mesri et al., 2014).

## **SARCOMA DE KAPOSI**

La infección por el herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV), o también denominado herpesvirus humano 8 (HHV-8), se encuentra comprometido con el desarrollo de tres neoplasias, cada una con características particulares: i) sarcoma de Kaposi (SK), ii) linfoma primario de efusión (PEL) y iii) enfermedad de Castleman (MCD). Los tumores de SK se componen de células infectadas con el virus KSHV de origen endotelial, mientras que PEL y MCD presentan lesiones con origen en las células B. El KSHV se asocia, además, con varios síndromes inflamatorios agudos (Giffin and Damania, 2014). La fuerte evidencia que relaciona la infección por KSHV con el desarrollo de SK, PEL y MCD, en conjunto con la evidencia de las propiedades oncogénicas del KSHV permitió clasificar a este herpesvirus como un carcinógeno de clase I por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el cáncer (IARC) (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012).

Se han descrito cuatro formas de SK; la forma clásica, reportada por primera vez por Moritz Kaposi en 1872 se caracteriza por presentar lesiones cutáneas relativamente indolentes y predominantes en hombres ancianos de varios países mediterráneos o países del norte de África (Giffin and Damania, 2014). La forma endémica se presenta principalmente en individuos VIH negativos en países de África oriental y central, presenta lesiones más extensas incluyendo la participación visceral y puede presentarse en niños. El tercer subgrupo de SK está representado por la forma epidémica y se caracteriza principalmente por encontrarse asociada al SIDA. Representa el subtipo más agresivo de esta neoplasia y se presenta principalmente en hombres homosexuales infectados por el virus del HIV en países occidentales y en África subsahariana independientemente de su orientación sexual. Por último, la forma iatrogénica se presenta en pacientes con terapias inmunosupresoras asociadas a trasplantes de órganos (Schulz and Cesarman, 2015). Curiosamente, se encontró que el SK iatrogénico prevalece en individuos que se encuentran infectados con el KSHV previamente a la intervención quirúrgica en comparación con individuos negativos para KSHV que reciben un órgano de un donante positivo para este virus (Francès et al., 2009). Se ha demostrado que lesiones presentes en SK pueden ser de origen

policlonal, oligoclonales o monoclonales. Adicionalmente, se observó que muchas lesiones de SK contienen solo una pequeña proporción de células infectadas por KSHV, encontrándose también células inflamatorias asociadas (Montaner et al., 2003; Schulz and Cesarman, 2015) (**Figura 5**).



**Figura 5. Modelo de progresión del sarcoma de Kaposi.** Las células infectadas con KSHV de la circulación (células B, células madre mesenquimales o precursores endoteliales) o virus libres de células circulantes infectan a las células endoteliales de la piel. El KSHV induce la expresión de citoquinas angiogénicas e inflamatorias y puede transmitir el virus a células vecinas, lo que lleva al desarrollo de lesiones con formaciones vasculares anormales y presencia de células inflamatorias. Además, el KSHV induce inestabilidad genómica, provocando mutaciones en diferentes genes celulares (TP53). Las células mutadas se expanden formando lesiones oligoclonales (rara vez) o monoclonales de células neoplásicas. Adaptado de Schulz y Cesarman (Schulz and Cesarman, 2015).

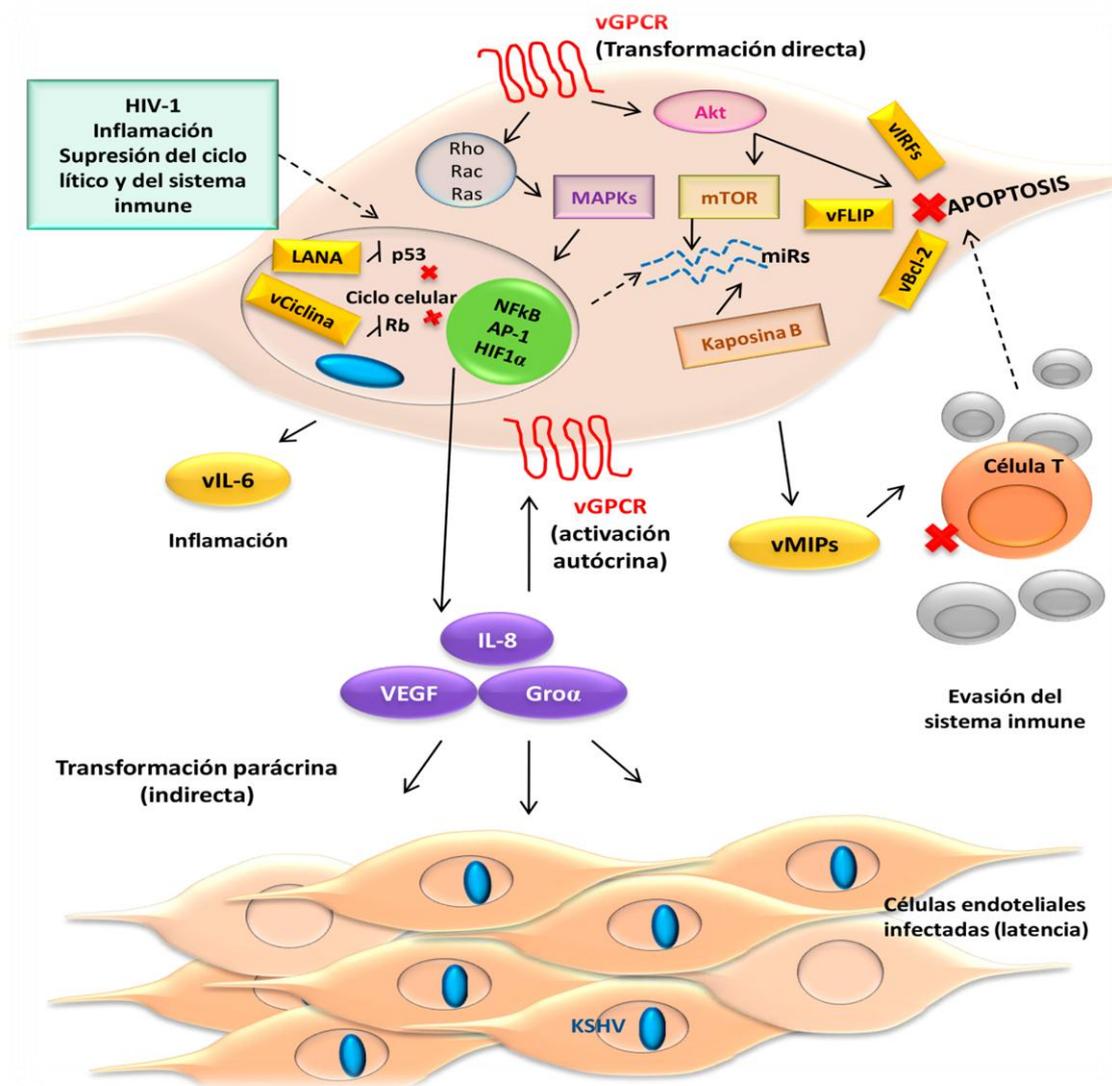
## Oncogénesis del sarcoma de Kaposi

El sarcoma de Kaposi se caracteriza por presentar una proliferación desmesurada de células endoteliales fusiformes, angiogénesis activa y extravasación de eritrocitos con infiltrados inflamatorios variables. Las lesiones presentes en el SK están compuestas por células infectadas de forma latente (vLANA, vCyclin1, vFLIP) con el virus KSHV, así como también con células que expresan genes líticos (vGPCR, ORF45, K1, K5, vIL-6, vIRFs, K3) que han sido implicados en el desarrollo del fenotipo angioproliferativo del SK a través de mecanismos parácrinos y autócrinos (Cavallin et al., 2018; Mesri et al., 2014). La comprensión de la interacción entre los factores víricos y del huésped en la oncogénesis del SK es crítica para el desarrollo de nuevas terapias contra esta patología (Sullivan et al., 2009).

Aunque el genoma de KSHV codifica para la expresión de múltiples proteínas oncogénicas, sólo el vGPCR ha mostrado tener la capacidad de transformar por sí solo a las células infectadas, así como también mostró tener capacidad pro-angiogénica y puede promover el crecimiento tumoral de células infectadas con KSHV en fase latente a través de señalización parácrina (Mesri et al., 2010; Montaner et al., 2003). El vGPCR es codificado por el ORF74, y presenta homología con CXCR1 y CXCR2, receptores de IL-8 y Gro- $\alpha$  en el hospedador. Este receptor viral se encuentra constitutivamente activo debido a la presencia de cambios estructurales dentro de su dominio DRY en el segundo bucle intra-citoplasmático, el cual se encuentra altamente conservado en los GPCR (Martin and Gutkind, 2008). Aunque la presencia de formas mutantes de GPCR o proteínas G heterodiméricas no es un evento frecuente en los diferentes cánceres humanos, varios tipos de herpesvirus, incluidos EVB, HHV-6, HHV-7 y hCMV-1 expresan uno o más GPCR presentes en su genoma viral, lo que sugiere que estos virus podrían haber evolucionado para aprovechar la potente capacidad de señalización de estos receptores por su ventaja proliferativa y replicativa (Dorsam and Gutkind, 2007). Aunque la activación de la vía de señalización Akt/mTOR por vGPCR contribuye a la transformación celular, quizás la actividad biológica más sorprendente de este oncogén es su acción parácrina, ya que se ha observado que sólo algunas células

expresan este gen en lesiones de SK (Montaner et al., 2003; Sodhi et al., 2006, 2004). Estudios *in vivo* revelaron que el silenciamiento en la expresión de vGPCR causa una rápida regresión tumoral, incluso si la mayoría de las células dentro del tumor no expresan vGPCR sino que se encuentran en estado de latencia (Montaner et al., 2006). A nivel molecular, el efecto transformador angiogénico y parácrino del vGPCR implica la activación de múltiples proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) y pequeñas GTPasas de la familia Rho cuyas actividades convergen en el núcleo para controlar factores de transcripción, como el factor inducible de hipoxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), AP-1 y NF- $\kappa$ B, promoviendo así la expresión y secreción de factores de crecimiento y citoquinas pro-inflamatorias como VEGF, IL-6, IL-8/CXCL8 y MIP-1/CCL3 (Cavallin et al., 2018, 2014; Martin and Gutkind, 2008). Estos, a su vez, pueden reclutar y promover el crecimiento aberrante de células infectadas con KSHV latente, así como de múltiples células derivadas de estroma, endoteliales y sus progenitoras (**Figura 6**) (Martin and Gutkind, 2008).

Aunque la incidencia del sarcoma de Kaposi asociado al SIDA ha disminuido notablemente en el mundo occidental desde la amplia implementación de la terapia antirretroviral de gran actividad (HAART), un porcentaje significativo de pacientes con esta patología nunca alcanza la remisión total (Cavallin et al., 2014; Nguyen et al., 2008). Asimismo, la prevalencia de KSHV y la incidencia del sarcoma de Kaposi parecen estar en aumento, incluso en pacientes con VIH tratados con HAART con carga viral controlada (Angelova et al., 2014; Cavallin et al., 2018). Por lo cual, el vGPCR y sus vías de señalización, los convierte en blancos terapéuticos tanto para el tratamiento de la patología como para el desarrollo de nuevos fármacos.



**Figura 6. Estrategias oncogénicas, pro-inflamatorias y evasivas para el desarrollo del sarcoma de Kaposi en células infectadas con KSHV.** Las lesiones heterogéneas del SK se componen de células fusiformes derivadas de endotelio, múltiples células inflamatorias y mesenquimales. La expresión del vGPCR contribuye a la sarcomagénesis debido a la activación de una red de señalización compleja que incluye a NF- $\kappa$ B, Akt/mTOR y múltiples GTPasas y MAPKs. Además, se induce la expresión de factores pro-angiogénicos, pro-inflamatorios y quimioatrayentes, como la vIL-6 codificada viralmente y la secreción de IL-8, VEGF y Gro $\alpha$ . De manera parácrina se promueve el reclutamiento y la proliferación de otras células derivadas de endotelio con infección latente, células en las cuales las proteínas víricas vFLIP, vCiclina y vLANA proporcionan una ventaja proliferativa. La apoptosis se encuentra inhibida por las proteínas anti-apoptóticas virales, vBcl-2 y vIRFs, mientras que las respuestas inmunitarias adaptativas son evadidas por la expresión de múltiples moléculas inmuno-moduladoras como las vMIPs. Adaptado de Martin y Gutkind (Martin and Gutkind, 2008).

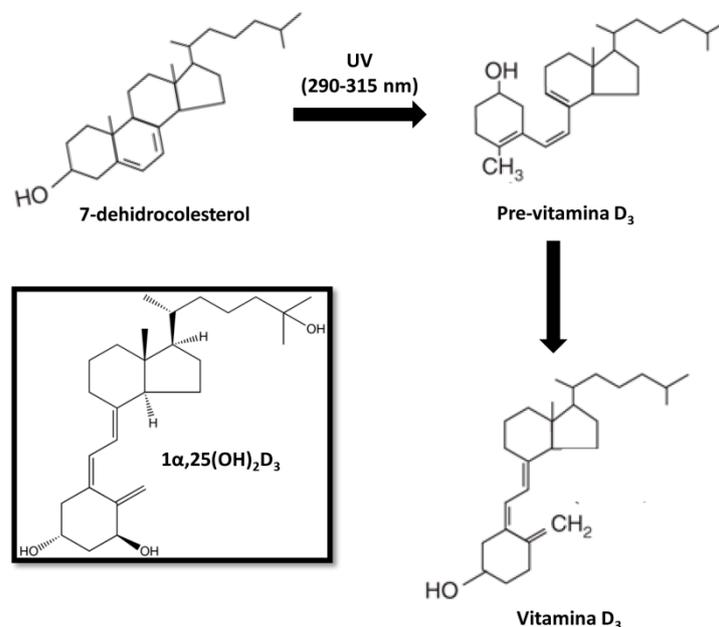
## **VITAMINA D**

La vitamina D se describió a principios del siglo XX y se demostró que poseía actividad antirraquítica. En 1928, luego del descubrimiento y caracterización de las primeras vitaminas, Mellanby reveló que la combinación de falta de luz solar y una dieta basada exclusivamente en avena inducía raquitismo en perros, y observó que esta patología se revertía al utilizar aceite de bacalao en la dieta de los animales en estudio (DeLuca, 2014). En los años treinta, McCollum indagó sobre la composición química del hígado de bacalao. En ese momento, se sabía que este aceite podía prevenir la ceguera nocturna y las fracturas. En una serie de experimentos, que consistían en someter al aceite de bacalao a calentamiento y oxigenación se descubrieron dos compuestos activos diferentes, la vitamina A la cual se destruía con el calor y un componente estable al calor que se denominó vitamina D (Mohr, 2009). En el año 1937, luego de numerosos estudios, arribaron a la conclusión de que el raquitismo podía curarse a través de la ingesta de aceite de hígado de bacalao o alimentos irradiados con luz ultravioleta (UV), así como también por la exposición a rayos UV. Debido a que solo los alimentos que contienen colesterol mostraron tener la capacidad de curar el raquitismo luego de ser irradiados con luz UV, los investigadores pudieron aislar e identificar una forma de colesterol como el precursor de la vitamina D<sub>3</sub> (Norman, 2012).

### *Estructura y síntesis de la vitamina D*

La vitamina D es considerada una pro-hormona que puede ser producida fotoquímicamente en la piel o adquirida a través de la ingesta de alimentos (Norman, 2012). La estructura molecular de la vitamina D se encuentra estrechamente relacionada con la de las hormonas esteroideas clásicas, como el estradiol o cortisol, presentando todas ellas la misma estructura derivada del núcleo del ciclohexanoperhidrofenantreno o esterano (cuatro anillos fusionados, tres con seis átomos y uno con cinco). En el caso de la vitamina D, uno de los anillos de su

estructura presenta un enlace carbono-carbono roto (C9-C10) del anillo  $\beta$  (Norman, 2008). El 7-dehidrocolesterol presente en la epidermis cutánea presenta un sistema conjugado de doble enlace que le permite absorber un rango de radiación del espectro ultravioleta (290-315 nm), proceso que da lugar a la formación de pre-vitamina  $D_3$ , la cual al ser inestable isomerizará en vitamina  $D_3$ , que posteriormente dará lugar a la formación del metabolito activo de la vitamina D, el  $1\alpha,25(\text{OH})_2D_3$  (**Figura 7**). La mayoría de los alimentos tienen poca vitamina D a menos que estén fortificados, lo que significa que los humanos dependen de la luz solar en mayor medida para mantener las reservas adecuadas de vitamina D. Sin embargo, muchos individuos no reciben la luz solar adecuada, debido a diversos factores incluidos la ocupación en interiores, evitar el sol debido a las preocupaciones sobre el desarrollo de cáncer de piel, la latitud geográfica, estación climática, vestimenta y cantidad de melanina en la piel (bloquea los rayos del sol) (Holick, 2007; Mostafa and Hegazy, 2015). Los parámetros que afectan al equilibrio entre la exposición a la radiación UV y la incorporación de vitamina D es tópicamente de discusión en la actualidad (Gilaberte et al., 2011).

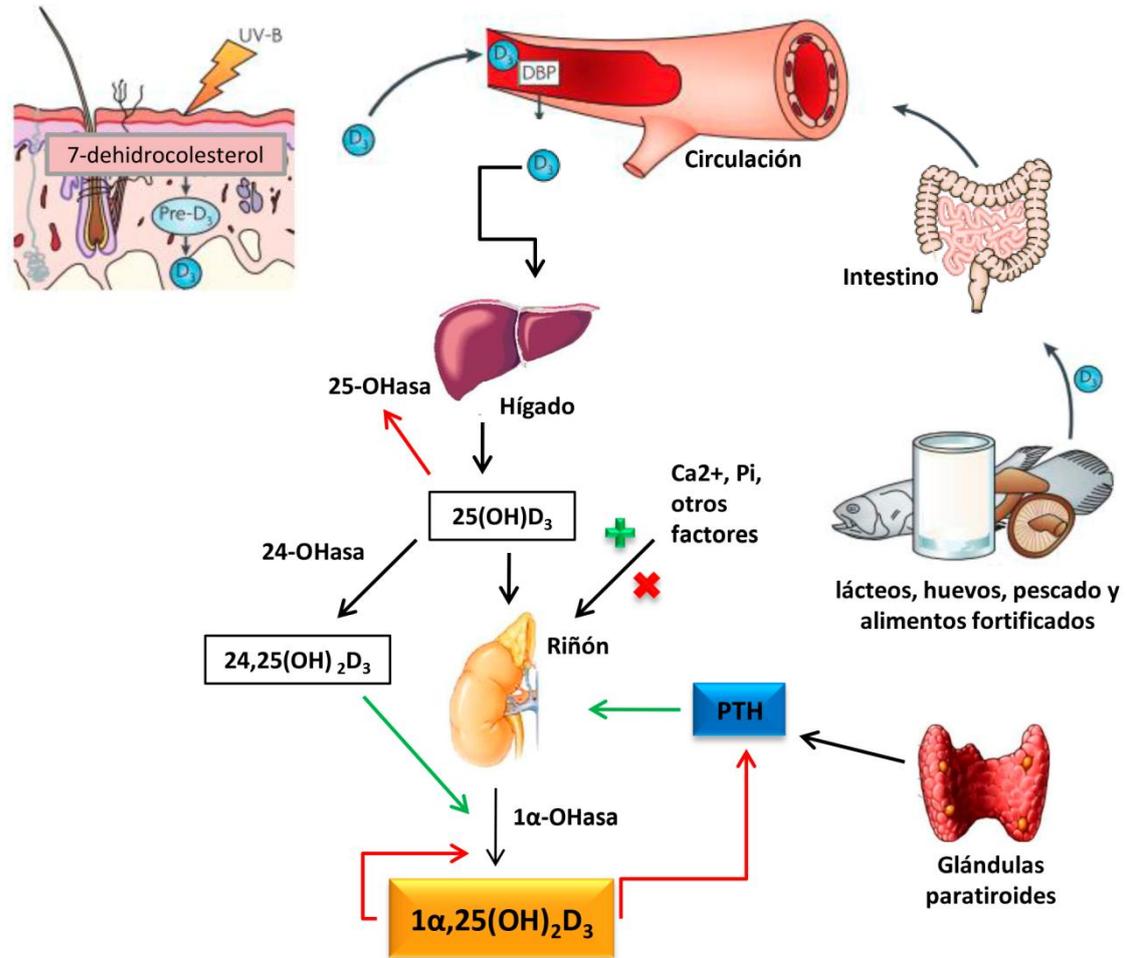


**Figura 7. Proceso de formación fotoquímica de la vitamina  $D_3$ .** El 7-dehidrocolesterol, presente en la membrana plasmática de la epidermis se transforma en pre-vitamina  $D_3$  tras la

*absorción de cuantos de luz UV comprendidos entre 290 y 315 nm de longitud de onda. Posteriormente, en un proceso independiente de la luz la pre-vitamina D<sub>3</sub> isomeriza en su forma cis para dar como resultado la vitamina D<sub>3</sub>. El metabolito hormonalmente activo de la vitamina D es el 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Adaptado de Norman (Norman, 2008).*

## Regulación del metabolismo de la vitamina D

La vitamina D<sub>3</sub> producida en la piel o absorbida en el intestino producto de la ingesta, es transportada en la sangre por la proteína ligadora de vitamina D (DBP). La vitamina D<sub>3</sub> en sí misma no es biológicamente activa por lo que sufre una serie de hidroxilaciones por las oxidasas de función mixta del citocromo P450 (CYPs) (Bikle, 2014). Una vez en el hígado la vitamina D<sub>3</sub> es hidroxilada por la 25-hidroxilasa microsomal (25-OHase, codificada por el gen CYP27A1) para dar como resultado el 25-hidrocolecalciferol (25(OH)D<sub>3</sub>). El 25(OH)D<sub>3</sub> es transportado por la DBP a través de la circulación sanguínea hasta los túbulos proximales renales, en donde sufre una segunda hidroxilación por la 1 $\alpha$ -hidroxilasa mitocondrial (1 $\alpha$ -OHasa, codificada por el gen CYP27B1), dando como resultado el metabolito hormonalmente activo de la vitamina D, el 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> o calcitriol. Además, el 25(OH)D<sub>3</sub> puede ser hidroxilado en menor medida por la 24-hidroxilasa (CYP24A1), que cataliza el paso inicial en la conversión de 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en metabolitos menos activos. CYP24A1 también puede metabolizar el 25(OH)D<sub>3</sub>, por lo tanto la proporción de CYP27B1 y CYP24A1 juega un rol importante en la determinación de la circulación y la concentración intracelular de los metabolitos de la vitamina D y las acciones que regulan (Feldman et al., 2014). A su vez, los niveles de 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> son regulados por retroalimentación; un aumento en los niveles de 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> induce la síntesis de 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, mientras que el Ca<sup>2+</sup>, Pi y 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> la suprimen (Deeb et al., 2007). La expresión de CYP27B1 (que codifica la 1 $\alpha$ -OHasa) es inducida por las hormonas paratiroideas (PTH) y reprimida por la expresión del 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (**Figura 8**).



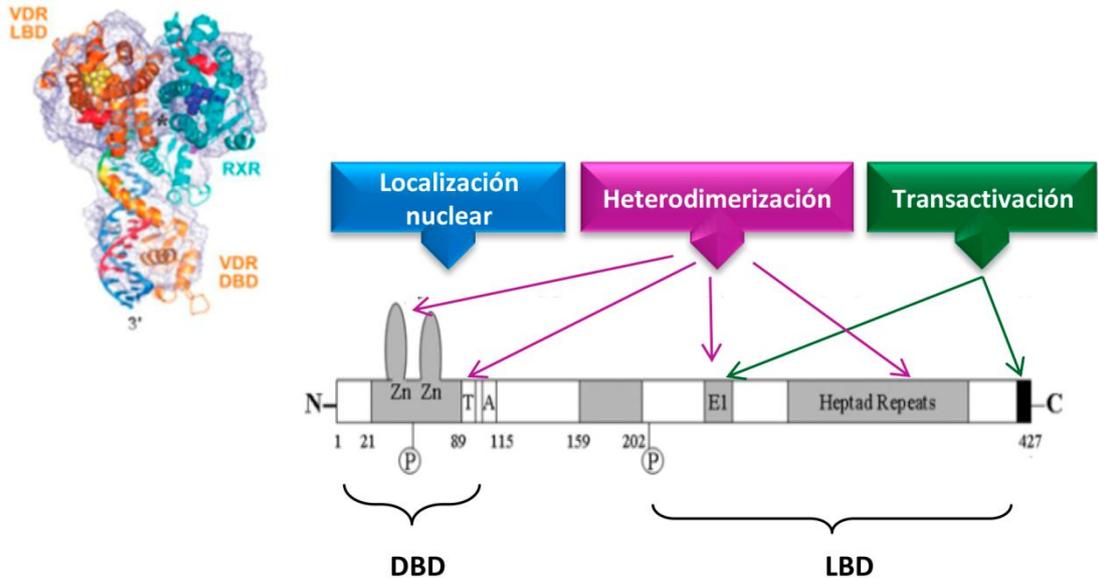
**Figura 8. Regulación del metabolismo de la vitamina D<sub>3</sub>.** La vitamina D puede ser obtenida a través de la ingesta de alimentos como lácteos, pescado o alimentos fortificados, o sintetizada fotoquímicamente en la piel a través del 7-dehidrocolesterol. La pre-vitamina D<sub>3</sub> en la piel isomeriza a vitamina D<sub>3</sub> y viaja por el torrente circulatorio unida a la DBP hasta el hígado y el riñón en donde a través de dos hidroxilaciones se forma el metabolito hormonalmente activo de la vitamina D<sub>3</sub>, el 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Las flechas verdes indican una regulación positiva mientras que las rojas indican inhibición. Adaptado de Deeb y col. (Deeb et al., 2007).

## *Mecanismo de acción de la vitamina D*

El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  actúa como una hormona esteroide induciendo respuestas en los tejidos a nivel; i) genómico (regulando la transcripción génica) y ii) no genómico (respuesta rápida). En ambas vías de acción se ha descrito la participación del receptor del VDR, el cual puede actuar como un factor de transcripción activado por ligando (Díaz et al., 2015; Feldman et al., 2014).

## *Características del VDR*

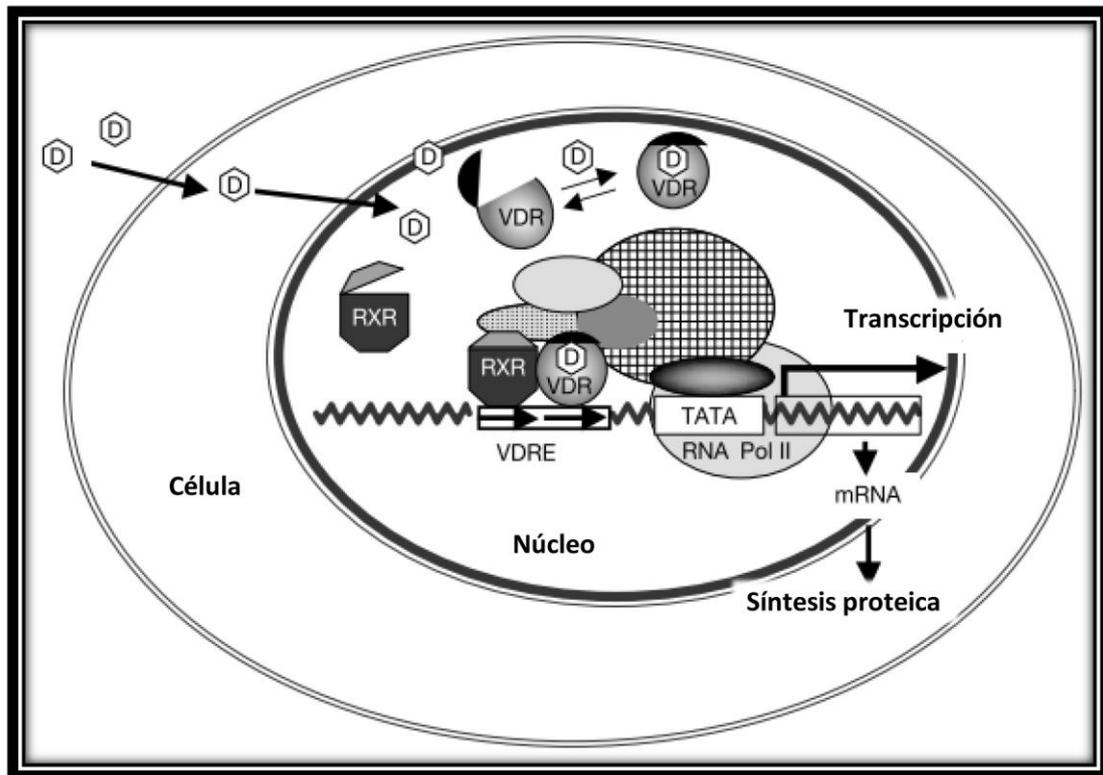
El VDR es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares. Los miembros de esta superfamilia se agrupan en siete subfamilias según similitudes en sus secuencias, y el VDR pertenece a la misma subfamilia (subfamilia 1) que los receptores de ácido retinoico (RAR), hormona tiroides (TR), y los receptores que regulan el metabolismo lipídico (PPAR), la homeostasis del colesterol (LXR y FXR) y la oxidación de xenobióticos (PXR y CAR). El gen que codifica para la expresión del VDR se encuentra altamente conservado evolutivamente en los vertebrados (Haussler et al., 2013). En el humano y ratón, el gen del VDR se localiza en el cromosoma 12 y 15 respectivamente, y ambos están compuestos por ocho exones codificadores. El gen de ratón contiene además dos exones no codificantes mientras que en el humano hay al menos seis y dos promotores (Zella et al., 2007). El VDR presenta dos dominios principales, un dominio de unión al ADN, NH<sub>2</sub>-terminal (DBD), altamente conservado evolutivamente y un dominio de unión a ligando, COOH- (LBD) que presenta variabilidad en los distintos grupos de vertebrados. El DBD es una región de dedos de zinc rica en cisteína. Hay dos dedos de zinc, cada uno de los cuales contiene un solo átomo de zinc presente en un anillo tetraédrico con cuatro residuos de cisteína (**Figura 9**) (Christakos et al., 2016). Se han hecho numerosos estudios para determinar la localización tisular del VDR y se ha observado que se encuentra presente en la mayoría de los tejidos (Carlberg and Seuter, 2007).



**Figura 9. Receptor de vitamina D.** El VDR presenta dos dominios funcionales, un dominio de unión al ADN (DBD) con función de localización nuclear y heterodimerización, y un dominio de unión a ligando (LBD) responsable también de la heterodimerización y de la transactivación del receptor. Adaptado de García (García, 2009).

### *Acción genómica de la vitamina D*

En el mecanismo de acción genómico del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  el papel del receptor VDR activado por el ligando es dirigir la maquinaria de la transcripción a sitios específicos del genoma. Todos los receptores nucleares funcionan mediante la regulación de la transcripción de genes diana a través de un mecanismo común (Bikle, 2010; Carlberg and Seuter, 2007). El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  entra por difusión al citoplasma o al núcleo y se une al VDR, provocando un cambio conformacional del receptor a una forma transcripcionalmente activa que va a interactuar con el receptor del ácido 9-cis-retinoico (RXR) formando un heterodímero. El complejo VDR-RXR se une a secuencias específicas del ADN denominadas elementos de respuesta a la vitamina D (VDRE) en la región promotora de los genes diana. Al activarse el VDR se reclutan proteínas co-activadoras o co-represoras que se unen a su ligando y esto desencadena eventos complejos que conducen a la activación o inhibición de la transcripción génica (**Figura 10**) (Carlberg and Seuter, 2007).



**Figura 10. Mecanismo de acción genómico de la vitamina D<sub>3</sub> mediado por el VDR.** El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  interactúa con el VDR para generar respuestas genómicas a través de la regulación de la transcripción génica y proteica. El genoma humano contiene alrededor de 22,000 genes, de estos, aproximadamente 3,000 se encuentran regulados por el VDR (Hausler et al., 2011). Adaptado de Carlberg y Seuter (Carlberg and Seuter, 2007).

El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  permite la activación de una amplia gama de genes implicados en diferentes funciones celulares. Numerosos estudios han demostrado que la unión del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  a su receptor induce la expresión de al menos once genes involucrados en la regulación de la homeostasis ósea y mineral (Hausler et al., 2011). Además, se ha reportado la regulación de genes con impacto sobre el ciclo celular, sistema inmune y metabolismo. La inducción de supresores tumorales, como p53 y p21 (Audo et al., 2003), así como también la reparación de daños en el ADN ha mostrado reducir el riesgo de muchos tipos de cáncer (Sidelnikov et al., 2010). Por otra parte, el sistema inmune es regulado a través de la inducción de catelicidinas involucradas en la respuesta innata frente a un patógeno, y por la represión de IL-17 (Mora et al., 2008)

para moderar el sistema inmune adaptativo y de esta manera reducir los trastornos autoinmunes como diabetes mellitus tipo I, esclerosis múltiple, lupus y artritis reumatoide. La inflamación se considera un denominador común de patologías cardíacas, cerebro-vasculares así como también del cáncer. Se ha reportado que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  atenúa la expresión de NF- $\kappa$ B (Cohen-Lahav et al., 2006) y COX-2 (Moreno et al., 2005) ejerciendo un rol anti-inflamatorio en los tejidos. En conjunto, la regulación génica por parte del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  contribuye a un buen funcionamiento de los tejidos que permite un mejor envejecimiento disminuyendo el riesgo de fracturas óseas, calcificación ectópica, neoplasia, daño oxidativo, infecciones, autoinmunidad, inflamación, dolor, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Hausler et al., 2011).

### *Acciones no genómicas de la vitamina D*

El mecanismo de acción no genómico de la vitamina D comprende respuestas de acción rápida, que se generan con frecuencia entre 1 a 45 minutos y contrasta con las respuestas de acción genómicas, que pueden tardar de varias horas a días y pueden ser bloqueadas por inhibidores de la transcripción y traducción (Hausler et al., 2011). Se ha demostrado que el metabolito activo de la vitamina D provoca el incremento en la absorción de calcio en el intestino y el influjo de calcio en células musculares por medio de la activación de canales de calcio dependientes de voltaje (Hii and Ferrante, 2016). Además, promueve la activación de moléculas de señalización como la fosfolipasa C y A2, la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) y p21ras e induce la generación de segundos mensajeros. Se ha reportado además, la activación de quinasas, como la proteína quinasa A, src, MAPKs, proteína quinasa C y calcio calmodulina quinasa II (Fleet, 2004; Norman, 2006; Tan et al., 2007; Yan et al., 2014). Estas quinasas pueden activar factores de transcripción, como SP1, SP3 y RXR que se unirán a los VDRE. El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  regula la unión del VDR a proteínas como STAT1 (Lange et al., 2014) e IKK- $\beta$  (Chen et al., 2013) permitiendo una modulación cruzada en la expresión génica mediada por ligando, como el IFN- $\alpha$  y el TNF- $\alpha$ . Este mecanismo proporciona una vía alternativa para la regulación directa de la respuesta inmune y de las acciones antivirales en las diferentes células. La unión de CD40 al receptor de IFN- $\gamma$  y TLR2

regulan el incremento de VDR y CYP27B1 facilitando de esta manera el mecanismo de acción autócrino que incrementa la disponibilidad de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y VDR (Chun et al., 2014; De Castro Kroner et al., 2015; Wei & Christakos, 2015). Ambas moléculas cooperan para desencadenar diferentes respuestas incluyendo la respuesta anti-microbiana, y la modulación de la expresión de citoquinas, quimiocinas e interferón tipo I (Zuluaga Espinosa et al., 2011). El VDR, independientemente del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , también puede exhibir una acción no genómica que involucra su interacción con proteínas, como factores de transcripción o quinasas para modular las respuestas celulares, incluyendo la muerte celular y respuesta inmune anti-viral. La interacción del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  con el VDR también provoca la secreción de insulina en células  $\beta$  del páncreas, y la apertura de canales de  $\text{Cl}^-$  (Hii and Ferrante, 2016; Zanello and Norman, 2004).

Además, se ha reportado que cuando el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  se une al VDR localizado en las caveolas de la membrana plasmática, se activan vías de transducción de señales que conducen a la activación de quinasas, fosfatasas, y canales iónicos que en última instancia regula la expresión de genes en el núcleo. Dicha intercomunicación entre los efectos iniciados en la membrana y los eventos que se llevan a cabo en el núcleo ha sido denominada por Haussler y colaboradores como *cross-talk* (Haussler et al., 2011).

### *Vitamina D y cáncer*

El primer indicio que sugirió una relación directa de la vitamina D con el cáncer fue a principios de la década de los 80. Abe y colaboradores observaron que células de leucemia, tanto murinas como humanas expresaban el VDR, y al ser expuestas al  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  se reducía su actividad proliferativa y se diferenciaban a macrófagos de apariencia normal (Zuluaga Espinosa et al., 2011). En células endoteliales transformadas por la expresión del vGPCR el tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  indujo un arresto en el ciclo celular con la consecuente inducción de la apoptosis por un mecanismo que involucra a la caspasa 3 (Gonzalez-Pardo et al., 2010; González-Pardo et al., 2014). Se encontraron hallazgos similares en líneas celulares de melanoma, cáncer de colon y próstata expuestas a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Krishnan and Feldman, 2011). Los estudios epidemiológicos de los últimos años han detallado una relación directa

entre la menor exposición solar y la mayor probabilidad de desarrollar cáncer de colon, próstata, mama, ovario, pulmón, esófago, entre otros (Holick, 2012). De manera complementaria, se han publicado diversos estudios que demuestran los efectos benéficos del estatus óptimo de vitamina D sobre el riesgo de cáncer (Schwartz and Skinner, 2007; Wang, 2009). De manera adicional a la evidencia epidemiológica descrita anteriormente, ensayos *in vitro* e *in vivo* mostraron que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  tiene efectos sobre la proliferación celular, diferenciación, apoptosis, invasión y metástasis, inflamación y angiogénesis (Krishnan et al., 2012).

### **Ciclo celular:**

El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induce el arresto del ciclo celular en la fase  $G_0/G_1$  de células malignas. Adicionalmente, en muchos tipos de neoplasias induce diferenciación, generándose células con un fenotipo menos maligno (Krishnan et al., 2012). Numerosos estudios han revelado que el tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  regula transcripcionalmente el aumento en la expresión génica de p21 y p27, y la disminución en la expresión proteica de ciclinas reguladoras del ciclo celular (Feldman et al., 2014; Hager et al., 2004). Estudios realizados en cáncer de próstata demostraron que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  disminuye la expresión de CDK1 luego de 24 horas de tratamiento (Peehl et al., 2004). En células de cáncer de mama, MCF-7 y MDA-MB-231, el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  provocó un aumento en la expresión de las proteínas inhibidoras del ciclo celular, RBL2 y RBBP6. Por otra parte, en células de carcinoma escamoso (SCC25) se observó una disminución en los niveles de ARNm de ciclina A, ciclina B y ciclina F. El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  además, puede influir indirectamente en la tasa de crecimiento de las células al interferir con la acción de factores de crecimiento que estimulan la proliferación (IGF) o al aumentar la producción de aquellos que promueven la diferenciación (IGFBP3) (Fleet et al., 2012). El TGF- $\beta$ 2 es esencial para el mantenimiento de la homeostasis tisular, además es un factor anti-proliferativo que se encuentra involucrado en las etapas iniciales de la carcinogénesis, y se ha demostrado que es regulado por el tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en diferentes tipos de cáncer (Buschke et al., 2011; Fleet et al., 2012). Por otra parte, el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  puede bloquear la transcripción génica de  $\beta$ -catenina

en células de cáncer de colon SW480-ADH, Caco-2 y HT-29 mediante la inducción del VDR (Egan et al., 2010).

### **Apoptosis:**

El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induce apoptosis en varios tipos de células tumorales, específicamente en las células de cáncer de próstata y mama a través de activación de la vía intrínseca provocando daños en la función mitocondrial que facilitarían la salida de citocromos y especies reactivas de oxígeno (Trump et al., 2011). Varios grupos de investigación han reportado que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induce apoptosis en células de cáncer de mama y en una variedad de líneas celulares de cáncer de colon (Fleet et al., 2012). Estudios en células de cáncer de mama, MCF-7 y MDA-MB-231, mostraron niveles aumentados de las proteínas pro-apoptóticas DAP, CFKAR, FADD y las caspasas efectoras 3 y 8 (Swami et al., 2003). El tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en células HGC-27 de cáncer de estómago promovió la apoptosis de las células gástricas a través de un incremento en la expresión de PTEN con participación del VDR (Pan et al., 2010). Por otra parte, en cáncer de próstata (LNCaP) y en una línea celular de leucemia mieloide crónica K562 (Kizildag et al., 2010) la apoptosis fue acompañada de una regulación negativa de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL y aumento de Bax (Krishnan and Feldman, 2011).

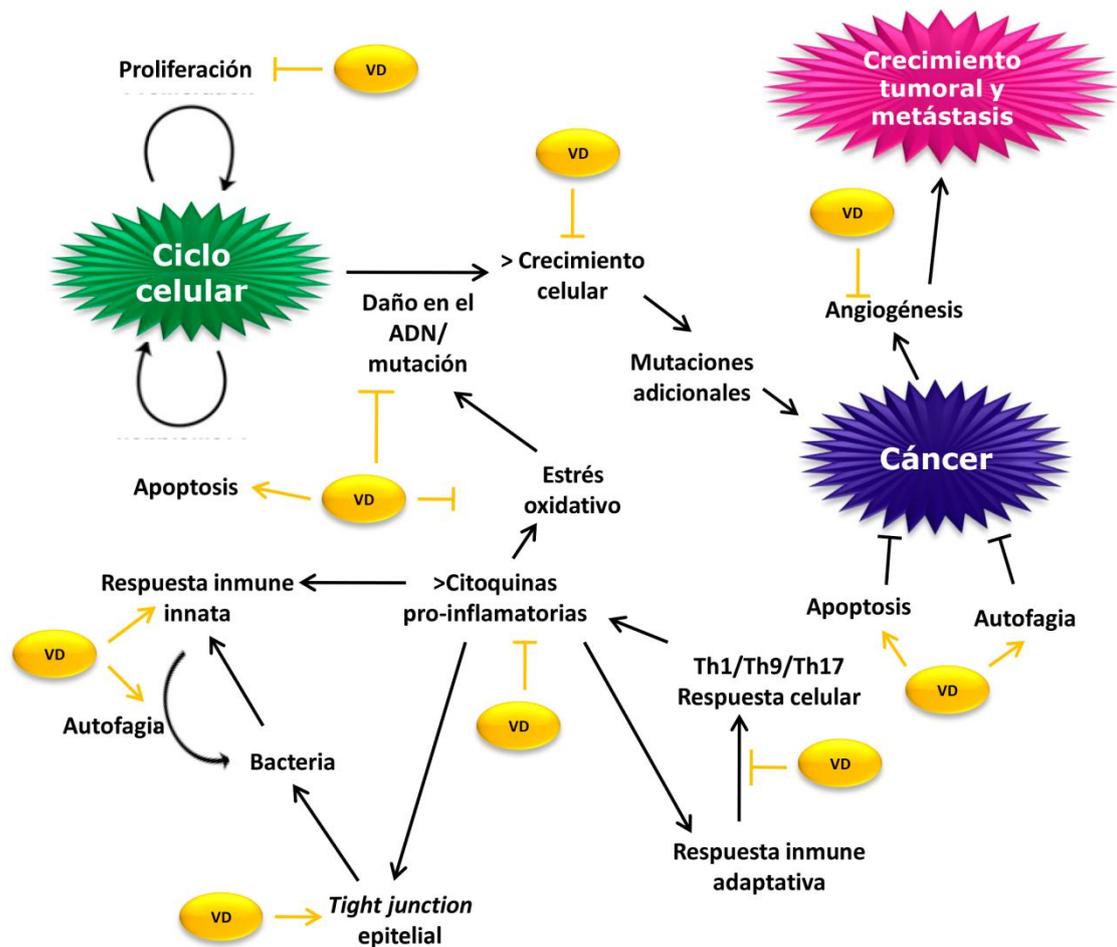
### **Autofagia:**

Los primeros reportes que indican que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  activa autofagia provienen de estudios sobre el mecanismo molecular subyacente a la actividad citotóxica (Høyer-Hansen et al., 2010). Se observó que las células de cáncer de mama tratadas con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inducían un mecanismo de muerte celular diferente a la apoptosis, con incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y en la actividad lisosómica. En células de leucemia HL-60 el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  indujo autofagia a través de la inactivación de mTOR, aumento de la expresión proteica de Beclina-1 (BECN1) y su interacción con PI3K o Bcl-xL (Høyer-Hansen et al., 2005). La autofagia inducida por el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  puede

requerir una interacción compleja con los inhibidores de CDK (Tavera-Mendoza et al., 2006). La mayoría de los cánceres humanos tienen defectos múltiples en las vías de señalización apoptótica, por lo que la activación de vías de señalización de muerte autofágica por el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  podría ser terapéuticamente útil en el tratamiento de los cánceres altamente quimiorresistentes (Høyer-Hansen et al., 2010).

Otro factor de importancia para el desarrollo del cáncer es la inflamación, la cual tiene como mediadores a las citoquinas, quimiocinas, prostaglandinas y especies reactivas de oxígeno. Estudios realizados en cáncer de mama mostraron que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  es un importante regulador de las vías inflamatorias, inhibe la síntesis de prostaglandinas y las quinasas activadas por estrés, lo que resulta en la inhibición de la producción de citoquinas inflamatorias y NF- $\kappa$ B (Gonzalez-Pardo et al., 2012; Krishnan et al., 2012). Por otro lado, estimula la expresión de moléculas de adhesión celular como las E-caderinas e inhibe al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), principal estimulador de la angiogénesis, y de esta manera disminuye la vascularización de células tumorales; además inhibe la COX-2 que colabora de manera indirecta con la inhibición de este proceso (**Figura 11**) (Krishnan and Feldman, 2011).

A pesar de la evidencia que respalda el efecto benéfico del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  para evitar la progresión del desarrollo tumoral, su utilidad terapéutica se ve limitada por sus efectos hipercalcemiantes acompañados por un aumento en la resorción ósea e hipercalciuria, por lo que la síntesis de análogos de la hormona, con menor actividad calcémica intenta resolver esta problemática (Gonzalez-Pardo et al., 2012).

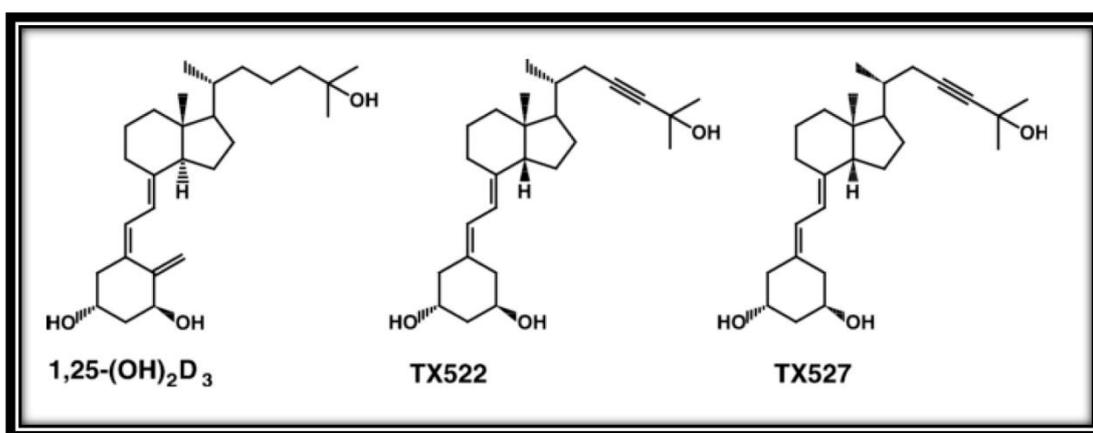


**Figura 11. Efectos potenciales del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en el desarrollo tumoral.** Adaptado de Fleet (Fleet et al., 2012).

### *Análogos de la Vitamina D*

La forma activa de la vitamina  $\text{D}_3$ , el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , es un importante regulador de la homeostasis del calcio y del fósforo. Además, en dosis suprafisiológicas tiene efectos sobre la proliferación y diferenciación de células normales y malignas. Sin embargo, una concentración mayor de la requerida en el organismo conduce a efectos secundarios calcémicos, como la hipercalcemia e hipercalcemia. Durante las últimas dos décadas, se han sintetizado varios análogos estructurales del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  mediante la introducción de modificaciones químicas, con la esperanza de encontrar moléculas que ejerzan sus efectos sobre la proliferación y diferenciación de las células

sin presentar los efectos secundarios característicos de este metabolito (Leyssens et al., 2014). En la actualidad, existen más de 4,000 análogos sintéticos con diferencias en su estructura química y sus características farmacocinéticas, algunos al igual que la hormona, de naturaleza esteroide. Dos de estos análogos, los 14-epi-análogos, TX 522 (14-epi-19-nor-23-yne-1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ ) y TX 527 (19-nor-14,20-bis-epi-23-yne-1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ ) (**Figura 12**) muestran una acción anti-proliferativa al menos diez veces mayor que el 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  acoplada a efectos calcémicos notablemente inferiores (50 a 400 veces menor), cumpliendo el perfil necesario para la aplicación terapéutica.

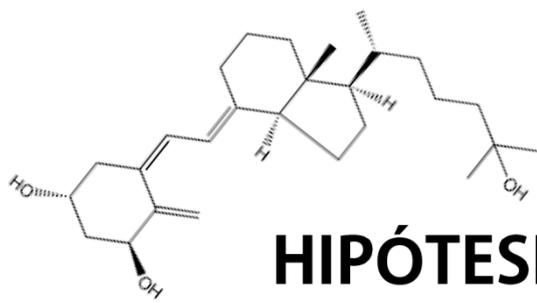


**Figura 12.** Estructura química de los 14-epi-análogos, TX 522 y TX 527. Adaptado de Eelen (Eelen, 2005).

Si bien el mecanismo de acción del TX 522 y TX 527 no ha sido esclarecido por completo, se demostró que ambos compuestos, al igual que el compuesto parental, se unen al VDR y provocan la heterodimerización de éste con el RXR. La acción incrementada de ambos compuestos se correlacionó con su capacidad para inducir interacciones con co-activadores del VDR. Para comprobar la aplicabilidad clínica de estos análogos, ambos compuestos se probaron en modelos de xenoinjerto de cáncer de mama en ratones, y observaron que tanto el TX 522 como el TX 527 retardan el crecimiento tumoral sin mayores efectos secundarios calcémicos. En pacientes con cáncer de próstata refractario a las hormonas (estudios en fase II), el TX 522, resultados preliminares demostraron que 27 de los 31 pacientes tratados con TX 522 durante 18 semanas mostraron una disminución en los niveles de antígeno prostático

(PSA) sin modificar los niveles de calcemia (Verlinden et al., 2011). El TX 527, por su parte, ha mostrado tener efectos anti-proliferativos en células endoteliales transformadas por el vGPCR asociado al desarrollo del sarcoma de Kaposi, efectos que están mediados en parte por el VDR y se observaron tanto *in vitro* como *in vivo* (Gonzalez-Pardo et al., 2010).

Se ha aprobado el uso de varios análogos de la vitamina D para el tratamiento de la psoriasis, osteoporosis e hiper paratiroidismo, a menudo, utilizados como primera o segunda línea de tratamiento. A pesar de los resultados prometedores en varios modelos de cáncer, son necesarios más ensayos clínicos para comprender con mayor profundidad el mecanismo de acción de los distintos análogos y sus combinaciones, así como también la duración del tratamiento y el momento correcto de su administración (Leysens et al., 2014).



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

---

# HIPÓTESIS

Se postula que el metabolito activo de la vitamina D, el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , y su análogo TX 527, inhiben la proliferación de las células endoteliales transformadas por el receptor viral vGPCR a través de la regulación de vías de señalización que conducen a la apoptosis y/o autofagia. Dentro del mecanismo de acción del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y el análogo, se presume que regularía las vías MAPKs (ERK1/2, JNK y p38) y Akt inhibiendo la proliferación de las células endoteliales transformadas por vGPCR. La regulación negativa de estas vías generaría una transducción de la información al núcleo desencadenando la inhibición de la expresión de genes dependientes del VDR.

# OBJETIVOS

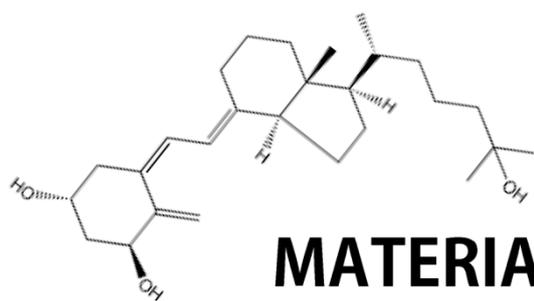
## Objetivos generales

El objetivo general de este trabajo de tesis es estudiar las vías de transducción de señales desencadenadas por el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y su análogo TX 527 que conducen a la apoptosis y/o autofagia de células endoteliales transformadas por la expresión del receptor viral vGPCR en un modelo de sarcoma de Kaposi.

## Objetivos específicos

- ✓ Elucidar las vías de señalización involucradas en la apoptosis inducida por el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y el TX 527.
- ✓ Investigar si el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y el TX 527 ejercen sus efectos antineoplásicos a través de la inducción de la autofagia.

- ✓ Estudiar la regulación y participación de las vías de señalización MAPKs (ERK1/2, JNK y p38) y Akt en el mecanismo de acción del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527.
- ✓ Evaluar la participación del VDR en los efectos desencadenados por el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 y su contribución a los efectos antineoplásicos.
- ✓ Desarrollar un modelo de cultivo tridimensional a partir de las células que expresan el vGPCR que represente más la arquitectura del tumor *in vivo* y validar en este modelo la acción del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .



## MATERIALES Y MÉTODOS

---

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIALES

El análogo de la vitamina D, TX 527 [19-nor-14,20-bisepi-23-yne-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>], originalmente sintetizado por M. Vandewalle y P. De Clercq (Universidad de Ghent, Ghent, Bélgica), fue proporcionado por Thérámex (Mónaco). El 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (#D1530), las membranas Immobilion P (polyvinylidenedifluoride; PVDF), el antibiótico de selección G418 y el medio de cultivo DMEM con alto contenido en glucosa y rojo fenol (#D7777) fueron provistos por SIGMA-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La puromicina fue adquirida en Invivogen (San Diego, CA, USA). El sulfato de estreptomicina, penicilina G sódica y la nistatina se obtuvieron de la Droguería Saporiti S.A.C.I.F.I.A (Buenos Aires, Argentina). Los inhibidores utilizados fueron: Bortezomib (S1013) de Selleck Chemicals (Nuclilab.nl, Rotterdam, NL), PD98059, SP600125, LY294002 de SIGMA-Aldrich (St. Louis, MO, USA), SB203580 de TOCRIS Bioscience (Bs. As., AR) y cloroquina otorgada por el Dr. Daniel Grasso (FFyB, UBA-CONICET). El kit para aislamiento de ARNm (High pure RNA isolationkit:cat# 11828665001) se adquirió en Roche Applied Science (Indianapolis, IN, USA), la transcriptasa reversa III fue provista por Invitrogen™ (San Diego, CA, USA). El reactivo SYBR Green PCR Master Mix y TaqManFast Univ. se obtuvieron de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Los cebadores o *primers* para RT-PCR cuantitativa para  $\beta$ -actina, IL-6 y Bax fueron donados por la Prof. Dra. Chantal Mathieu (KULeuven, Leuven, Bélgica); mientras que las secuencias para MKP-3 y un plásmido conteniendo una secuencia dirigida contra la expresión de MKP-3 de ratón (shMKP-3) con su respectivo control (Vector, MOCK) fueron otorgados por la Dra. Cristina Paz (INBIOMED, UBA-CONICET). Los *primers* para Gapdh y Vdr fueron obtenidos de Invitrogen™ (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), mientras que RelA (NF- $\kappa$ B), I $\kappa$ -B $\alpha$ , BIM, Bcl-2, BECN1 y vgpcr se obtuvieron en Eurogentec (Serain, Bélgica). Las Transfecciones se realizaron con PolyFect (Qiagen, Valencia, CA, USA). La proteína A/G agarosa se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). El plásmido MEKAA lo proporcionó el Dr. Alejandro Colman-Lerner (IFIBYNE Universidad de Buenos Aires-CONICET). Los anticuerpos policlonales de conejo que reconocen específicamente: Bcl-2, BIM, p-

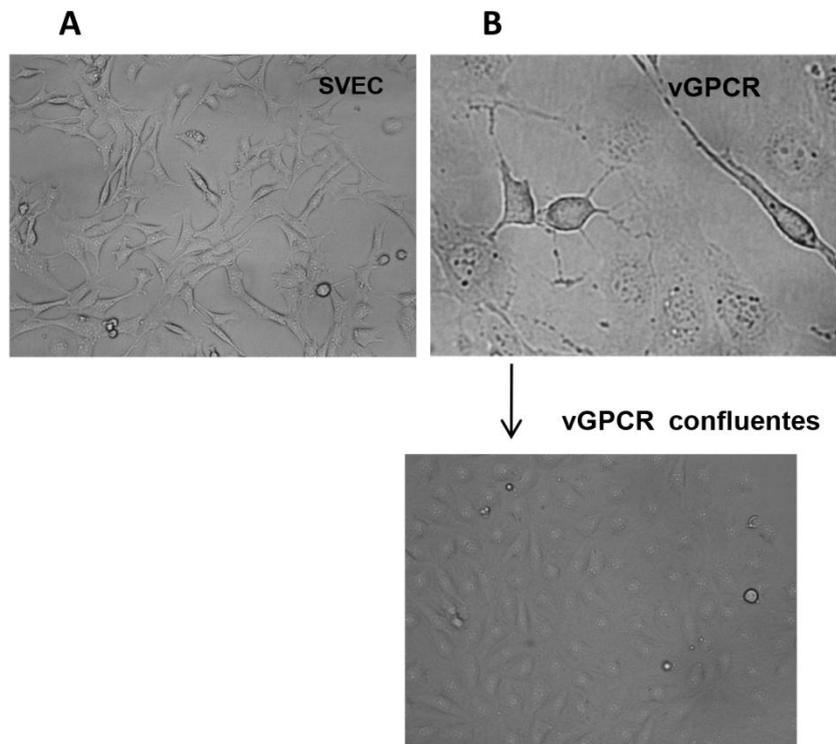
ERK1/2, ERK1/2, FOXO1, p-FOXO1, Caspasa-3 clivada, p38 $\alpha$ , p-Bad Ser112, p-Akt, Akt, FOXO3a, p-FOXO3a y A20 fueron obtenidos en Cell Signaling (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). Los anticuerpos monoclonales de ratón que reconocen específicamente: Tubulina, MKP-3, MKP-5, p-p38, BAD, LC3 $\beta$  y BECN1 y policlonal de conejo que reconoce específicamente Bax fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) y el anticuerpo policlonal de rata que reconoce el VDR fue obtenido en Affinity Bioreagents (Golden, CO, USA). Los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa anti-especie: conejo, ratón y rata fueron proporcionados por Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). El anticuerpo policlonal de conejo Cy2 (#111,225,144) fue obtenido en Jackson (Jackson ImmunoResearchlab., West Grove, PA, USA), mientras que el marcador nuclear DAPI (#D9542) se adquirió en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

## MÉTODOS

### MODELO EXPERIMENTAL

Se utilizó la línea celular murina de células endoteliales: “simian virus 40-, large T-antigen-immortalized-, murine endotelial cells (SVEC)” expresando establemente el receptor viral acoplado a proteína G (vGPCR) como modelo celular de sarcoma de Kaposi. Este modelo, fue previamente establecido mediante la transfección del vector pCEFL-vGPCR que codifica para el receptor viral *full-length* y como control, en algunos experimentos, se utilizó la misma línea estable (SVEC) con el vector vacío (pCEFL) (Gonzalez-Pardo et al., 2010; González-Pardo et al., 2013; Montaner et al., 2003)(**Figura A**). Las líneas celulares se obtuvieron por colaboración con el Dr. J. Silvio Gutkind (UCSD, California, USA). En ratones inmunosuprimidos “nude mice”, la sobreexpresión estable del vGPCR desencadena la proliferación de las células endoteliales, induce angiogénesis y reproduce las lesiones angio-proliferativas que ocurren en el sarcoma de Kaposi humano (Martin and Gutkind, 2008; Montaner et al., 2003), constituyendo un buen modelo experimental de sarcoma de Kaposi.

Para evaluar la participación del VDR se emplearon líneas previamente generadas; SVEC-shctrl, SVEC-shVDR; vGPCR-shctrl, vGPCR-shVDR (Gonzalez-Pardo et al., 2010) donde el VDR fue silenciado a partir de la traducción de partículas lentivirales conteniendo un segmento de ARN de interferencia dirigido contra el VDR de ratón (shVDR), o bien con un segmento de ARN control (shctrl).



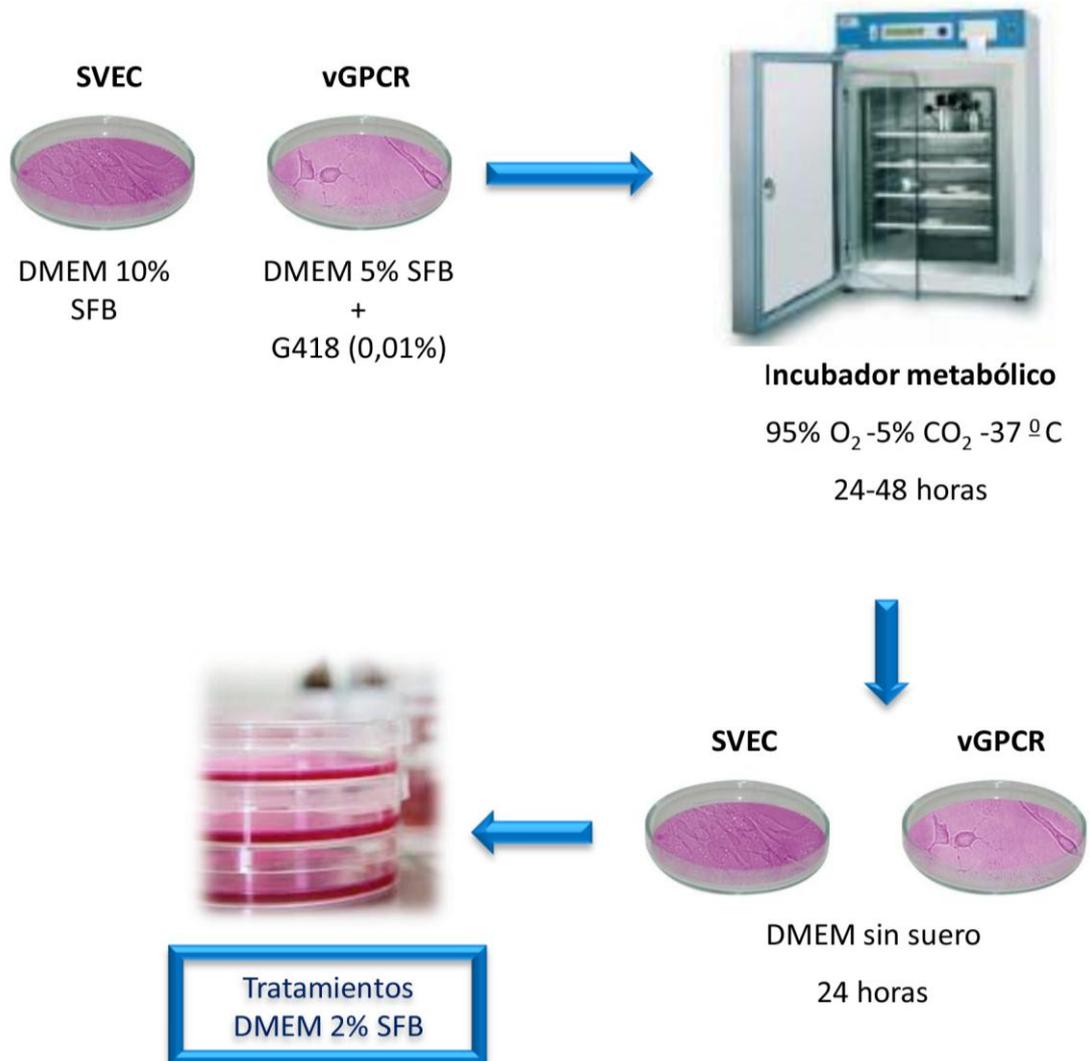
**Figura A. Modelos experimentales. A)** Línea celular murina de células endoteliales (Simian virus 40-, large T-antigen-immortalized, SVEC). **B)** Línea celular murina de células endoteliales que expresan establemente el receptor viral acoplado a proteína G (vGPCR). Estas células tienen una morfología fusiforme característica que se pierde cuando las células se encuentran confluentes en la placa de cultivo.

## CULTIVO CELULAR

Las células SVEC y vGPCR se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con rojo fenol, 0,5% de antibiótico (0,5 g/% de Estreptomicina; 0,2 g/% Penicilina), 0,5% de antimicótico (0,2 g/% Nistatina) y suplementado con 10% y 5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (30 min, 56°C) respectivamente. Se utilizaron condiciones más restrictivas de crecimiento para las células vGPCR (5% de SFB) para generar una mayor expresión del receptor viral. Para la selección de la línea vGPCR, el medio se suplementó durante su cultivo con 500 µg/ml de G418 (Cellgro, Manassas, VA, USA). Además, las líneas celulares donde la expresión del VDR fue suprimida (-shVDR) o su control (-shctrl) se cultivaron en medio como se mencionó previamente para SVEC y vGPCR suplementado con 2 µg/ml de puomicina (Invivogen, San Diego, CA, USA) como antibiótico de selección del inserto.

### *Cultivo celular en monocapa (Cultivo bidimensional)*

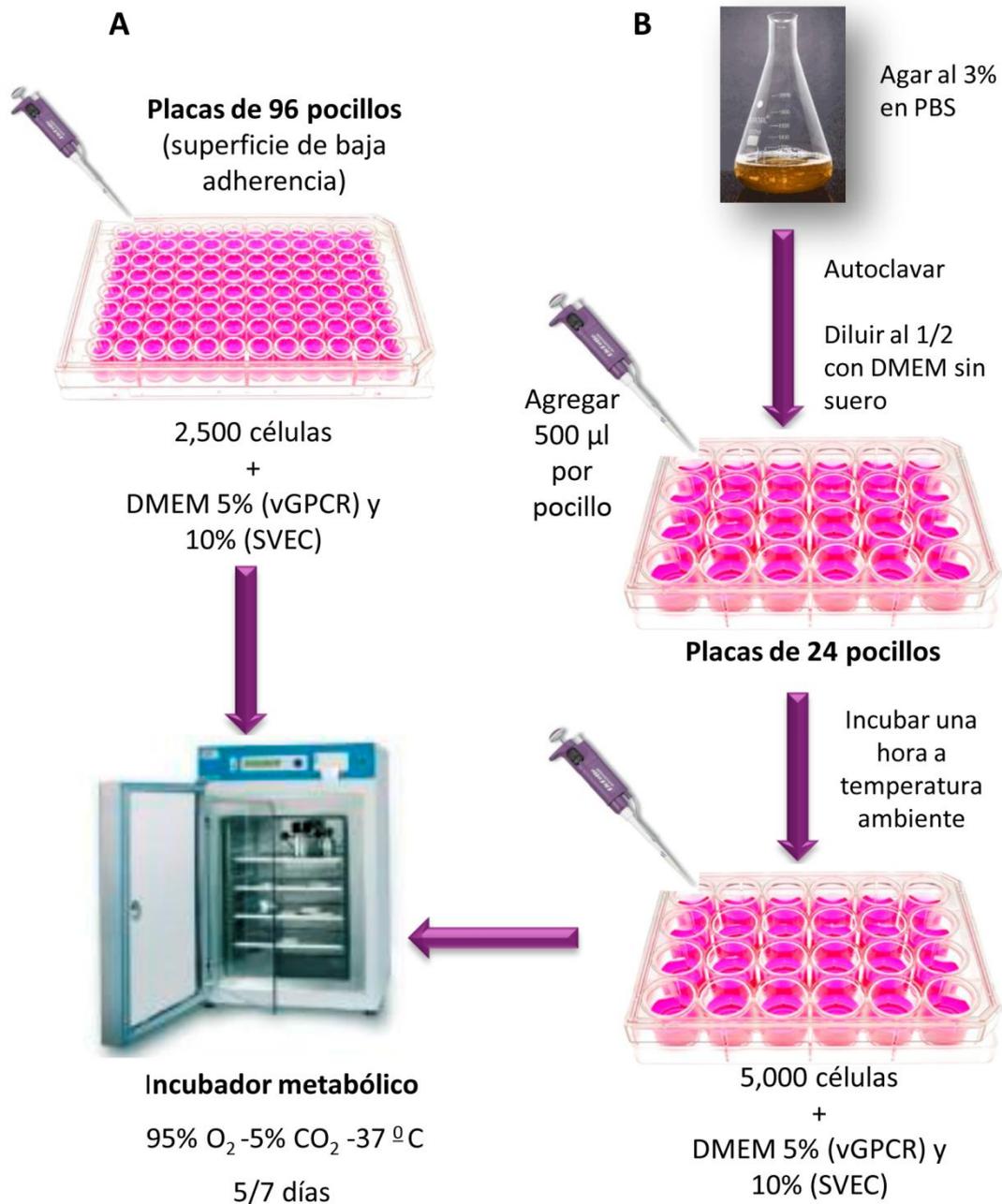
Las líneas celulares se cultivaron en monocapa a 37°C bajo una atmósfera húmeda de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos se mantuvieron en medio fresco y se subcultivaron cada 48-72 horas. Para las distintas experiencias, las células se emplearon a un 70-80% de confluencia (**Figura B**).



**Figura B. Cultivo celular bidimensional.** Las células SVEC y vGPCR se cultivaron con DMEM suplementado con 10% y 5% de suero fetal bovino (SFB) respectivamente, y se dejaron crecer en un incubador metabólico, bajo una atmósfera controlada (95% O<sub>2</sub> -5% CO<sub>2</sub> -37 °C) durante 24-48 horas. Posteriormente, se extrajo el medio y se agregó DMEM sin SFB para sincronizarlas durante 24 horas y luego se realizaron los tratamientos correspondientes.

### *Cultivo de esferoides multicelulares (Cultivo tridimensional)*

Se sembraron 2,500 células SVEC o vGPCR por pocillo en placas de 96 (Lipidure Coat plates, AMSBIO, Orlando, FL) respetando las condiciones de crecimiento del cultivo en monocapa. Las células se cultivaron durante siete días, con un recambio de medio al tercer día de cultivo. Para algunas experiencias, los esferoides se obtuvieron sobre platos con soporte de agar. Para ello, se preparó agar al 3% en PBS (0,8 g% NaCl, 0,02 g% KCl, 0,144 g% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,024 g% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) y se autoclavó. Posteriormente, el agar se diluyó en DMEM sin suero a la mitad, se colocaron 500 µl de la mezcla por pocillo y se incubó la placa durante una hora a temperatura ambiente bajo flujo laminar. Se sembraron 12,000 células por pocillo directamente sobre el agar, se agregó el medio de cultivo correspondiente a cada línea. La formación de esferoides se monitoreó diariamente por siete días para evaluar su formación y desarrollo. Los diferentes tratamientos se realizaron al quinto día de crecimiento (**Figura C**).



**Figura C. Cultivo celular tridimensional. A)** Se sembraron 2,500 células por pocillo en una placa de 96 pocillos con la superficie recubierta con un polímero de baja adherencia. Las células se incubaron en DMEM 5% (vGPCR) o 10% (SVEC) en incubador metabólico. **B)** Primeramente, el agar se disolvió en PBS (3%) se autoclavó y diluyó a la mitad en DMEM, se vertió 500 µl de la mezcla por pocillo (24 pocillos) y se dejó solidificar a temperatura ambiente durante una hora. Luego, se sembraron 5,000 células en una gota, se agregó DMEM suplementado con 5% o 10% de SFB y se dejaron crecer en incubador metabólico durante cinco días o siete días de acuerdo al tipo de experiencia a realizar.

## TRATAMIENTOS

Para evaluar los efectos del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , o el análogo TX 527, las células fueron privadas de suero durante 24 horas con el fin de sincronizar su crecimiento. Los compuestos se agregaron luego al medio durante 1 hora. Luego, y dado que la mayoría de los ensayos se realizaron a tiempos largos, por ejemplo a 48 h, en ensayos dependientes de la dosis (0,1-100 nM) o bien, del tiempo (0,5-72 h), se re adicionaron los compuestos en presencia de DMEM 2% de SFB. En algunas determinaciones se emplearon inhibidores farmacológicos que se agregaron durante 15 minutos previos al tratamiento con los agonistas. La concentración de uso de los inhibidores se determinó en base a estudios previos: PD98059 (10  $\mu\text{M}$ ), LY294002 (10  $\mu\text{M}$ ), SB203580 (10  $\mu\text{M}$ ) y SP600125 (100 nM). El Bortezomib, inhibidor del proteasoma y vía NF- $\kappa\text{B}$ , se adicionó a las (0,25-1 nM) durante 24 horas en presencia de DMEM 2% de SFB o vehículo (DMSO, 0,1%).

## Co-INMUNOPRECIPITACIÓN

Las células se colectaron en PBS, se centrifugaron a 1,200 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C y el precipitado celular se resuspendió en 100-150  $\mu\text{l}$  de buffer de co-inmunoprecipitación (Co-IP, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1% tritón X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0,2 mM PMSF, 0,2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 0,5% Nonidet P-40, 1 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 20  $\mu\text{g/ml}$  leupeptina, 20  $\mu\text{g/ml}$  aprotinina). Luego de una incubación de 15 minutos a 4°C, el lisado obtenido se centrifugó a 14,000 g durante 10 minutos. Posteriormente, se cuantificó el contenido proteico del sobrenadante por el método de Bradford (Bradford, 1976). A continuación, las condiciones se incubaron con el anticuerpo específico para la proteína 1 que se quiere inmunoprecipitar, teniendo en cuenta la relación 250  $\mu\text{g}$  de proteínas totales/1  $\mu\text{l}$  de anticuerpo, durante cinco horas en agitación a 4°C. Luego se agregaron 25  $\mu\text{l}$  de Proteína A/G plus agarosa (Santa Cruz Biotechnology) por condición y se incubaron durante toda la noche. Luego, el inmunocomplejo se lavó tres veces con buffer Co-IP por centrifugación a 14,000 g durante cinco minutos. Finalmente, se agregó buffer muestra 6x al inmunocomplejo. Las muestras luego se corrieron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se realizó la

inmunodetección por Western blot de la proteína 1 primariamente inmunoprecipitada como control, y luego de la proteína 2 que se asocia. Para confirmar la asociación, se realizó una Co-IP con anticuerpo contra la proteína 2, y se procedió de la misma manera que con la proteína 1.

## PROCESAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Finalizado el tratamiento, el medio se removió por aspiración y se agregó buffer lisis (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Tritón x-100, 2,5 mM pirofosfato de sodio, 1 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM PMSF, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptina) en frío. Los lisados celulares se colectaron en tubos e incubaron a 4°C durante 15 minutos seguido de agitación vigorosa durante 30 segundos. La eliminación de restos celulares se realizó por centrifugación a 14,000 g durante 10 minutos. El contenido proteico del sobrenadante obtenido se cuantificó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Las determinaciones se realizaron utilizando albúmina sérica bovina como estándar. La absorbancia se midió a 595 nm.

## ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Las proteína se desnaturalizaron en buffer muestra 6x (375 mM Tris-HCl 6,8 a 25 °C, 12 % (p/v) SDS, 60 % glicerol, 300 mM DTT, 0,06 % (p/v) azul de bromofenol) a 100°C durante 5 minutos (Laemmli, 1970). Luego, 15-30  $\mu\text{g}$  de proteína por calle se sembraron y separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida de 1,5 mm de espesor, con un porcentaje de poliacrilamida/bisacrilamida variable según el peso molecular de las proteínas que se desea estudiar (gel de stacking: 4%; gel de separación: 8-15%). En paralelo, se sembraron marcadores proteicos coloreados de peso molecular conocido de amplio rango (10-250 kDa) para poder evaluar la migración relativa de las bandas proteicas de interés. La electroforesis se desarrolló a voltaje constante, 100 V, durante aproximadamente 1,5 horas en buffer de corrida (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 195 mM glicina, 0,1 % SDS).

## WESTERN BLOT

### *Electrotransferencia*

Luego de la electroforesis, las proteínas se transfirieron eléctricamente desde los geles a membranas sintéticas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) previamente activadas en metanol puro durante 1 minuto e incubadas durante 10 minutos en buffer de transferencia Towbin (0,25 M de Tris pH 8,3; 0,192 M de glicina; 20% de metanol). La transferencia se realizó durante 90 minutos a corriente constante (125 mA/mini gel) de acuerdo al protocolo seguido por Towbin y col. (Towbin et al., 1979).

### *Bloqueo de sitios inespecíficos e incubación con anticuerpos*

Las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con TBS-T (6,05 g/L de Tris-HCl, 11,68 g/L de NaCl, 0,01% de Tween) conteniendo 5% de leche descremada en polvo para bloquear los sitios de ligado inespecíficos. A continuación, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario, según la dilución recomendada por el fabricante, en TBS-T con 2,5% de albúmina sérica bovina (BSA) a 4°C durante la noche. Las membranas se lavaron tres veces en TBS-T, siendo un lavado de 10 minutos y dos de 5 minutos, en agitación continua. Seguidamente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti especie, correspondiente al anticuerpo primario utilizado conjugado a peroxidasa durante 1 hora en agitación suave. La dilución del anticuerpo secundario se realizó en TBS-T suplementado con 2,5% de leche en polvo descremada. Luego, las membranas se lavaron nuevamente como se mencionó anteriormente. Para visualizar las bandas inmunoreactivas se empleó el kit de quimioluminiscencia, ECL-Amersham, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La detección de los inmunocomplejos se llevó a cabo exponiendo las membranas a placas hipersensibles para la detección de quimioluminiscencia, Amersham Hyperfilm-ECL. Por último, las placas se escanearon y las bandas proteicas de interés se cuantificaron utilizando el programa de análisis imagen ImageJ, un programa de dominio público, desarrollado por el Instituto

Nacional de Salud (NIH, USA). Los datos se volcaron en planillas de Excel para su posterior análisis estadístico.

### *Anticuerpos y diluciones*

Los anticuerpos utilizados se prepararon en 2,5% de BSA diluidos en TBS-T, con excepción de caspasa-3 clivada, la cual se preparó en 2,5% de leche diluida en TBS-T.

<b>Anticuerpo</b>	<b>#Catálogo</b>	<b>Compañía</b>	<b>Dilución</b>
<b>BIM</b>	#2819S	Cell signaling	1/1000
<b>Caspasa-3 clivada</b>	#9664S	Cell signaling	1/500
<b>p-ERK1/2</b>	4377S	Cell signaling	1/1000
<b>ERK1/2</b>	4695T	Cell signaling	1/1000
<b>p-p38</b>	sc-166182	Santa Cruz	1/1000
<b>p38<math>\alpha</math></b>	8690T	Cell signaling	1/1000
<b>MKP-3</b>	sc-377070	Santa Cruz	1/500
<b>MKP-5</b>	sc-374276	Santa cruz	1/1000
<b>Bcl-2</b>	#2870S	Cell signaling	1/1000
<b>Bax</b>	sc-7480	Santa Cruz	1/1000
<b>Tubulina</b>	PA1-21153	Invitrogen	1/1000
<b>VDR</b>	sc-1008	Santa Cruz	1/1000
<b>p-FOXO3a</b>	94466BC	Cell signaling	1/500
<b>FOXO3a</b>	#2497P	Cell signaling	1/500
<b>p-FOXO1</b>	#9461	Cell signaling	1/500
<b>FOXO1</b>	#2880	Cell signaling	1/500
<b>p-BAD S112</b>	5284P	Cell signaling	1/1000
<b>BAD</b>	#9292	Cell signaling	1/1000
<b>A20</b>	5630S	Cell signaling	1/1000
<b>MEK<math>\alpha</math></b>	#9122	Cell signaling	1/1000
<b>Lámina nuclear-<math>\beta</math></b>	sc-6216	Santa Cruz	1/1000
<b>p-Akt</b>	4060P	Cell signaling	1/1000

<b>Akt</b>	#9272	Cell signaling	1/1000
<b>BECN1</b>	sc-48341	Santa Cruz	1/1000
<b>p-mTOR</b>	sc-293133	Santa Cruz	1/500
<b>mTOR</b>	sc-293089	Santa Cruz	1/500
<b>LC3<math>\beta</math></b>	sc-271625	Santa Cruz	1/1000
<b>Mouse-IgG</b>	sc-2005	Santa Cruz	1/5000
<b>Rabbit-IgG</b>	sc-2054	Santa Cruz	1/5000

### *Lavado de anticuerpos*

Con el fin de remover los anticuerpos de la membrana para su reutilización, las membranas PVDF se lavaron con buffer desnaturizante. Para ello, se incubaron en buffer "stripping" (0,75% g/v Tris-HCl pH 6,8, 0,02 % p/v SDS, 0,0035% v/v  $\beta$ -Mercapto-etanol) a 55 °C durante 30 minutos en agitación constante. A continuación, se realizaron tres lavados con TBS-T, como se mencionó anteriormente. Luego, las membranas se bloquearon con 5% de leche descremada en polvo diluida en TBS-T, para la posterior incubación con los anticuerpos de interés.

### **FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR**

Las células se colectaron en PBS y centrifugaron a 1,000 r.p.m. durante 5 minutos. El precipitado celular se resuspendió en buffer de homogeneización TES (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM de EDTA, 250 mM sacarosa, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 20  $\mu$ g/ml leupeptina, 20  $\mu$ /ml aprotinina, 20  $\mu$ g/ml). El lisado celular se homogeneizó con jeringa de 25G, 15 veces, en frío. Los homogenatos se incubaron 30 minutos a 4°C. La separación de las fracciones subcelulares de interés se realizó por centrifugación diferencial (Centrífuga Sigma 3k30). Para la obtención de la fracción nuclear (FN) se realizó una centrifugación a 4,000 r.p.m. durante 20 minutos. El sobrenadante postnuclear se centrifugó nuevamente a 12,500 r.p.m. para la obtención de mitocondrias, al sobrenadante obtenido se lo denominó citosol (C). El precipitado conteniendo la FN se lavó dos veces (4,000 r.p.m. durante 20 min) con buffer TES, se

resuspendió en buffer lisis y se incubó durante 15 minutos a 4 °C. Finalmente, se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976). La pureza de las fracciones se determinó a través del análisis por Western blot de marcadores específicos, MEK $\alpha$  para C y Lámina nuclear- $\beta$  para FN.

## TRANSFECCIÓN DE PLÁSMIDOS

Las células se transfectaron con un plásmido conteniendo una secuencia dirigida contra la expresión de MKP-3 de ratón (shMKP-3) (Mori Sequeiros García et al., 2013). El plásmido fue cedido por la Dra. Cristina Paz (INBIOMED, UBA-CONICET). El Dr. Alejandro Colman-Lerner (IFIBYNE-CONICET, UBA) proporcionó el plásmido recombinante para MEKAA (Marinissen et al 1999). En un eppendorf se preparó 1  $\mu$ g de plásmido en 25  $\mu$ l de reactivo de transfección (PolyFect, Santa Cruz Biotech., USA) y se incubó durante 10 minutos. Posteriormente, se completó el volumen faltante para 100  $\mu$ l con DMEM en ausencia de antibiótico y antimicótico. Paralelamente, se extrajo el medio de las células cultivadas en cajas de Petri de 60 mm y se agregaron 2 ml de DMEM suplementado con 2% de SFB y la solución conteniendo el plásmido. Las células se incubaron durante 24 horas, seguidamente, se renovó el medio con DMEM suplementado con 5% de SFB. El bloqueo y expresión de la proteína de interés se confirmó por Western blot.

## ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (150,000 células/pocillo) por triplicado por condición experimental. Finalizada la experiencia, las células se lavaron con PBS frío, se colectaron por tripsinización y se contaron en cámara de Neubauer. Las células muertas se reconocieron por el agregado de azul de Tripán al 0,4%.

## INMUNOCITOQUÍMICA

Las células se cultivaron sobre un cubreobjetos en cajas de Petri de 35 mm, luego del tratamiento, se lavaron dos veces con PBS frío y se fijaron con paraformaldehído al 4% suplementado con sacarosa (4%) durante 10 minutos a temperatura ambiente, o con metanol puro durante el mismo tiempo a -20 °C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS durante 5 minutos para retirar los restos de fijador. Luego, las células se permeabilizaron con Tritón X-100 en una concentración de 0,1% (Sigma-Aldrich®) diluido en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los sitios de ligado inespecífico se bloquearon con TBS-T suplementado con 5% de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante. Posteriormente, los cubreobjetos se incubaron invertidos con anticuerpo primario diluido en PBS con 5% de BSA (1/50) durante toda la noche a 4°C. A continuación, se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno en agitación constante y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a fluoróforo diluido en PBS (1/200) durante 1 hora a temperatura ambiente. Para la detección de filamentos de actina, las células se incubaron con faloidina conjugada con rodamina en PBS (1/200). Para la detección del núcleo, las células se incubaron adicionalmente con el marcador nuclear DAPI (4', 6-Diamidino 2-fenil indoldiclorhidrato) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizaron cuatro lavados con PBS de 5 minutos cada uno para eliminar el exceso de anticuerpo. Finalmente, las muestras se montaron sobre portaobjetos a los cuales se les adicionaron 10 µl de glicerol 95% diluido en PBS para su posterior visualización.

## MICROSCOPIA

### *Microscopía de fluorescencia*

Las muestras fueron visualizadas en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX 5) equipado con filtros estándar adecuados para capturar las señales fluorescentes. Las micrografías fueron tomadas por una cámara acoplada al microscopio.

## *Microscopía confocal*

Se utilizó un microscopio confocal Leica TCS. Para excitar a las muestras se usó un láser iónico de argón de 488 nm (verde) y un láser de helio-neón de 543 nm (rojo) para separar las imágenes de fluorescencia rojo/verde se utilizó el software Meridian para la obtención de las imágenes que luego fueron exportadas al Adobe Photoshop para su procesamiento digital.

## **PCR CUANTITATIVA**

La PCR a tiempo real cuantitativa (qPCR) es una variación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) estándar utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar ADN o ARN (ARNm) de una muestra, a medida que la reacción avanza. Utilizando primers específicos es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una secuencia de ADN o ARN (Heid et al., 1996). En la reacción, si se utiliza como sustrato ADN genómico, se trata de una PCR convencional, pero si se usa ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm se le conoce como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR). La cantidad de ARNm se puede determinar a través de la cuantificación relativa de las muestras, ya que compara entre diferentes muestras la cantidad relativa o relación del ARNm de un gen específico, respecto a la cantidad de ARNm de un gen constitutivo (control endógeno). La qRT-PCR mide la cantidad de amplicón producido durante cada ciclo de amplificación usando tecnología basada en fluorescencia. Se puede medir la cantidad de amplicón en la fase exponencial de la reacción, en contraste con la medición de la cantidad de producto final de la reacción. El amplicón se mide en tiempo real, etiquetando y detectando el producto acumulado con un sustrato marcado con fluorescencia durante el procedimiento de amplificación (Fraga et al., 2014).

## *Extracción del ARN total*

El ARN total se obtuvo empleando el kit comercial High Pure RNA isolation de Roche. Las células se incubaron con el buffer lisis del kit, el ARN se retuvo en las columnas y se

realizaron los lavados según protocolo proporcionado por el fabricante. Finalmente, el ARN se eluyó de las columnas con un buffer de elución provisto por el kit. La cantidad y calidad del ARN obtenido se analizó espectrofotométricamente. Esta determinación se basa en la medida de la densidad óptica teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg/ml de ARN. Se chequeó la pureza, considerando que las proteínas absorben a 280 nm, a través de la relación entre absorbancias a 260/280, la cual estuvo en el rango 1,8-2.

### *Transcripción reversa*

El ADNc se sintetizó a partir de 1 µg del ARN purificado, utilizando el kit comercial High Capacity cDNA reverse Transcription kit, provisto de Random primers y la enzima MultiScribe™ Reverse Transcriptase. La retrotranscripción se realizó en un termociclador Biometra UNO-Termoblock. La reacción se desarrolló contemplando los siguientes pasos: (i) 10 minutos a 50 °C, (ii) 120 minutos a 37 °C, (iii) 5 minutos a 85 °C, (iv) 30 minutos a 4 °C. Se estima que la cantidad de ADNc obtenida es similar a la cantidad de ARN de partida. El contenido de ADNc obtenido se conservó a -20°C hasta su utilización.

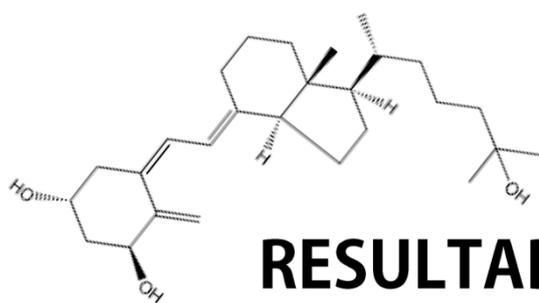
### *Análisis de expresión de genes*

Para evaluar la expresión de genes, se empleó el equipo 7,500 Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems). Las reacciones se desarrollaron en el ADNc resultante (1/10) empleando el reactivo power SYBR® GREEN PCR master mix (AppliedBiosystems) según el protocolo proporcionado por el fabricante. En todos los casos, al finalizar los ciclos de PCR se realizaron curvas de desnaturalización (curvas de melting) para confirmar la amplificación del fragmento específico, chequeando la generación de un único amplicón por reacción. Los *primers* de origen murino fueron sintetizados en escala de 25 nmoles y purificados por desalinización. Las secuencias empleadas fueron: Gapdh forward 5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', reverse 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'; Bcl-2 forward 5'-TCATCCACAGGGCGATGTT-3', reverse

5'-GGTGGTGGAGGAACTCTTC-3'; Bim forward 5'-GCTCTGCACTGTGTCGATG-3', reverse 5'-GCCCTCCCTTGTTCACATTAC-3';  $\beta$ -Actina forward 5'-AGAGGGAAATCGTGC GTGAC-3', reverse 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'; Vegf forward 5'-ATGAACTTTCTGCTCTCTGGGTG-3' reverse 5'-GACTTCTGCTCTCTTCTGTCGTG-3'; p21 forward 5'-TTGGAGTCAGGCGCAGATCCACA-3', reverse 5'-CGCCATGAGCGCATCGCAATC-3'; MKP-3 forward 5'-TTGCGGCCGCTATGATAGATACGCTCAGA-3', reverse 5'-ACGCGAATGAAGGAATGGGGACA ACTC-3'; Vdr forward 5'-AGGAGAGCACCTTGGGCT-3', reverse 5'-ACACACTCCACAGATCCGAGG-3'; I $\kappa$ B forward 5'-TGGCCAGTGTAGCAGTCTTGA-3', reverse 5'-ACACGTGTGGCCATTGTAGTTG-5'; NF $\kappa$ B forward 5'-CTGTCCTCTCACATCCGATTTTT-3', reverse 5'-CGGTTTACTCGGCAGATCTTG-3'; A20 forward 5'-CATGAAGCAAGAAGAACGGAAGA-3', reverse 5'-GAGGCCCGGGCACATT-3'. Para determinar la expresión relativa de los genes de interés, los datos fueron analizados por el método de cuantificación relativa por comparación de CT (thresholdcycle, umbral de detección establecido) " $\Delta$ CT" (Giulietti et al., 2001; Livak and 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) o  $\beta$ -Actina como genes de referencia. EL nivel de transcripción relativo se determinó a partir de la diferencia entre los valores de CT ( $\Delta$ CT). Los valores se expresan como  $2^{-\Delta$ CT en unidades arbitrarias.

## **Análisis estadístico**

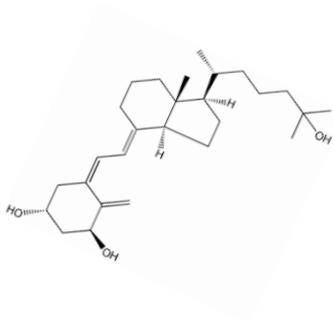
Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  desvío estándar y corresponden a la media de al menos tres experimentos independientes. La comparación de medias se realizó por la prueba t de Student, a dos colas considerándose diferencias estadísticamente significativas con valores de  $p < 0,05$  (\*) y altamente significativas con valores de  $p < 0,01$  (\*\*). La comparación entre más de dos grupos de resultados se realizó por análisis de la varianza, ANOVA simple, seguido de la prueba de Bonferroni para el análisis de las diferencias. El resultado del test se representa con letras, donde diferentes letras indican la significancia estadística con valores de  $p < 0,05$  o altamente significativas con un  $p < 0,01$  según se indique.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

---



## CAPITULO I

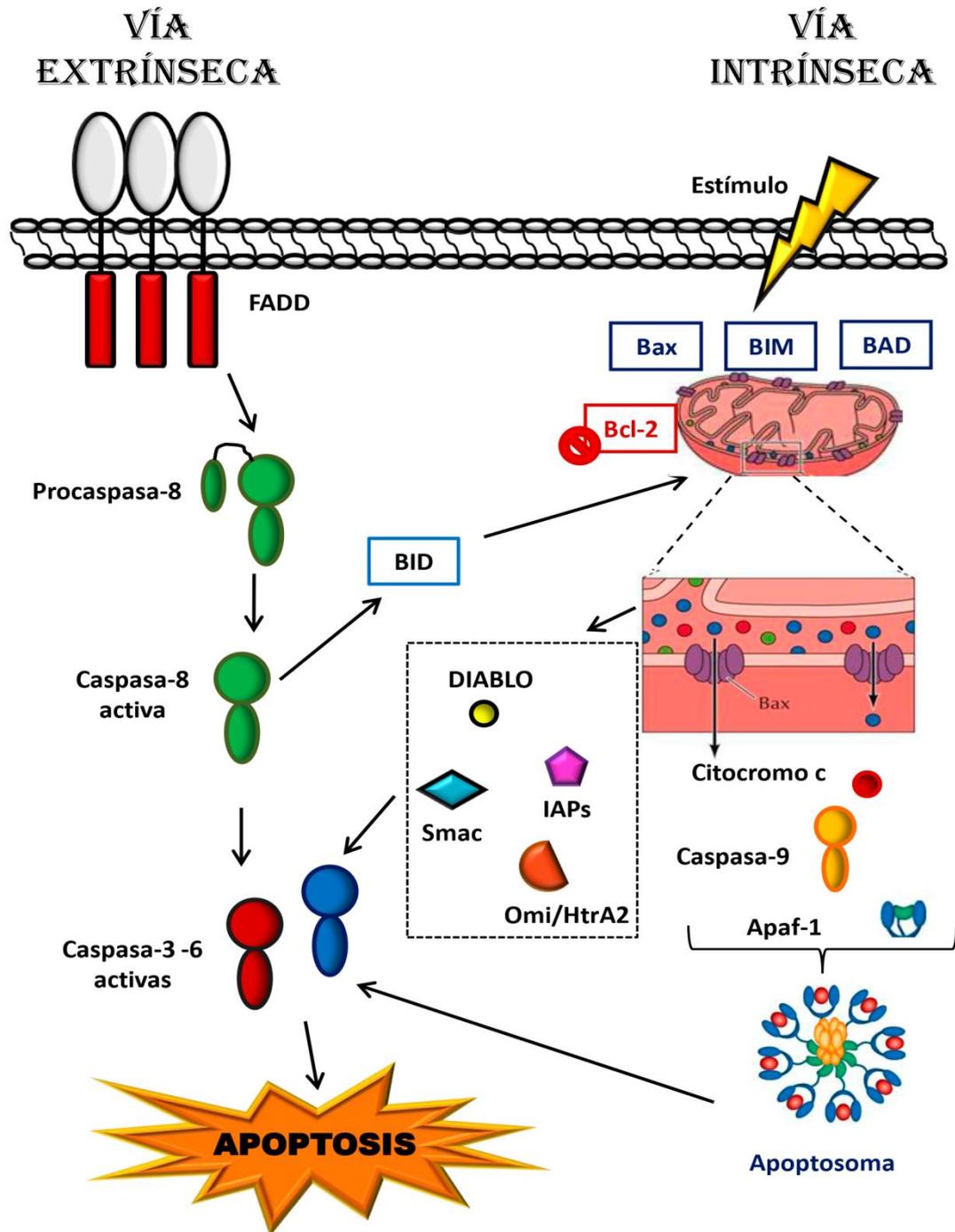
Regulación de vías de  
señalización involucradas en la  
apoptosis inducida por  
 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527

## INTRODUCCIÓN

La muerte celular juega un papel importante en el desarrollo y la homeostasis normal de los tejidos. Se sabe que un desequilibrio entre la proliferación y la muerte celular se relacionan con el desarrollo de enfermedades que incluyen el cáncer, enfermedades autoinmunes, trastornos neurodegenerativos, infecciones virales y SIDA (Elmore, 2007). Se conocen tres tipos principales de muerte celular; la muerte celular Tipo I (apoptosis), muerte celular Tipo II (autofagia), y muerte celular Tipo III (muerte celular no lisosomal) distinguibles por sus diferencias morfológicas (Bialik et al., 2010; Tan et al., 2009). Las células apoptóticas muestran cambios morfológicos distintivos, el primero es la degradación del ADN genómico por acción de las endonucleasas nucleares (enzimas dependientes de calcio y magnesio). El ADN se corta en sitios localizados entre los nucleosomas y, de ese modo, se generan fragmentos de tamaños múltiples de bases. La degradación de la cromatina en fragmentos discretos, provocada por endonucleasas, se observó por primera vez en células apoptóticas del timo de ratas (Wlodkowic et al., 2011). Otros cambios importantes en las células apoptóticas son; la modificación de la permeabilidad de la membrana celular, la condensación de las membranas sin pérdida de su integridad y la agregación de la cromatina que se observa pegada a la membrana nuclear. Finalmente, se produce la formación de vesículas o “cuerpos apoptóticos” debido a que las organelas no se desintegran y estos cuerpos apoptóticos son fagocitados sin producir respuesta inflamatoria y sin daños a los tejidos circundantes (Ouyang et al., 2012; Sui et al., 2013). Los estímulos que desencadenan la apoptosis son extremadamente variables e incluyen la exposición a radiación ultravioleta (UV) o a agentes citotóxicos, la ausencia de factores de crecimiento, infecciones, pérdida de adhesión celular al sustrato, radicales libres (ROS) entre otros. De acuerdo al estímulo recibido y en base al tejido al cual pertenezca la célula se pueden activar diferentes vías apoptóticas. Hay dos vías principales, la denominada *vía intrínseca*, que es activada por una alteración en la homeostasis intracelular, y la *vía extrínseca* que es activada por una señal de muerte que proviene del entorno (Duprez et al., 2009; Sprick & Walczak, 2004).

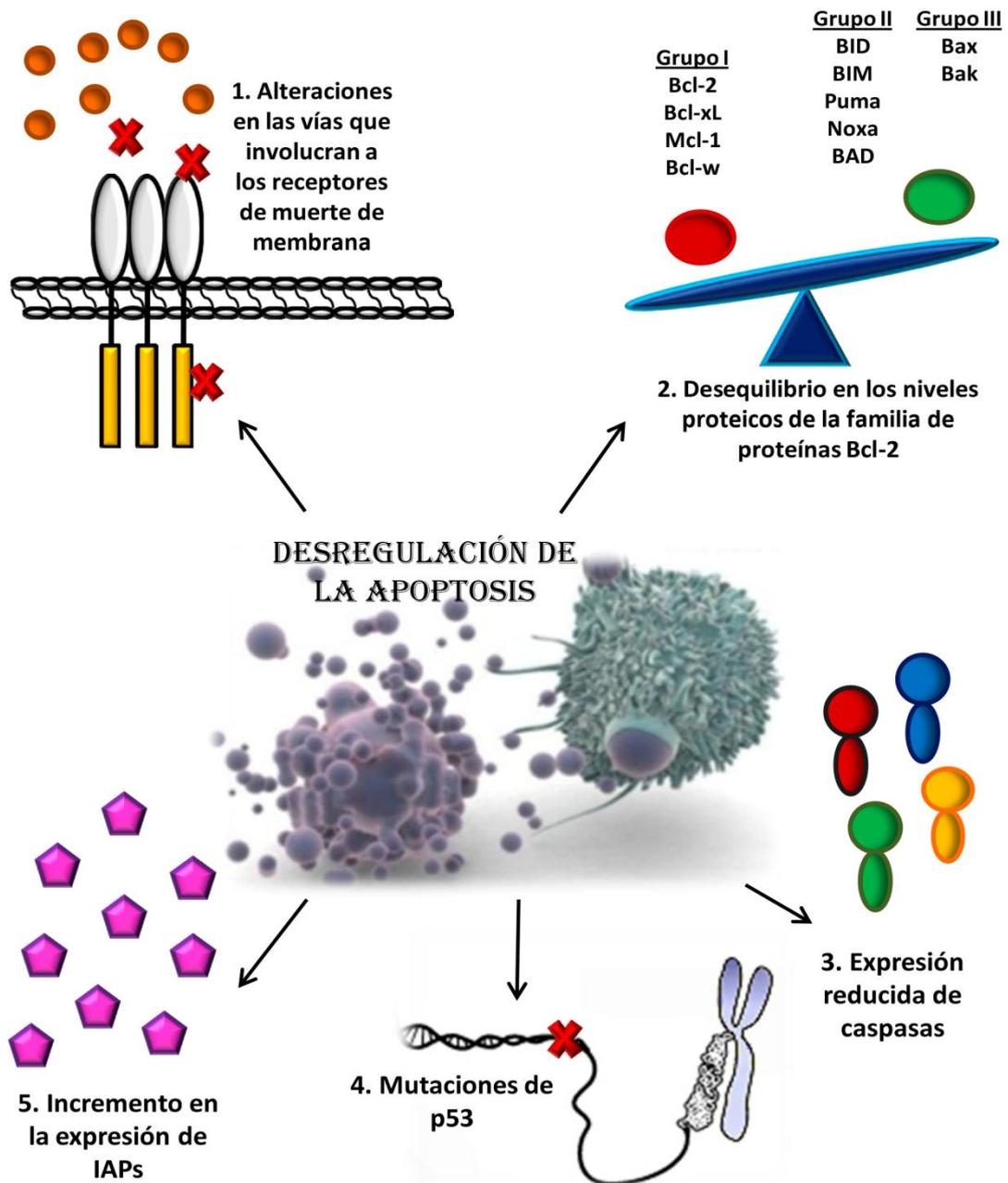
En la *vía intrínseca* la mitocondria tiene un rol clave en la ejecución de la apoptosis, esta organela experimenta cambios rápidos que llevan a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, con la consecuente formación de poros en la misma (Galluzzi et al., 2010). Estos poros son formados por proteínas pro-apoptóticas, como es el caso de Bax, que en condiciones normales se encuentran principalmente en el citosol pero ante un daño celular experimentan un cambio conformacional que permite su inserción en la membrana mitocondrial externa y la formación de oligómeros de Bax, formando así dichos poros (Westphal et al., 2011). Existen también otro grupo de proteínas de la familia Bcl-2 que son anti-apoptóticas y evitarían la apoptosis al secuestrar a miembros pro-apoptóticos previniendo de este modo la desorganización de la membrana externa mitocondrial (Rong et al., 2008). La formación de poros permite la salida al citosol de diferentes proteínas que son responsables de la activación de la apoptosis, por lo que han sido denominadas “factores de muerte”. Entre estos factores se encuentran el citocromo-c, procaspasa-9, endonucleasa G y la proteína inductora de apoptosis (IAP), esta última estaría implicada en una vía independiente de caspasas (Polster et al., 2005).

Cuando se activa la *vía extrínseca* en cambio, las células activan en su membrana plasmática receptores pertenecientes a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF-R). Esta familia de receptores está involucrada en muchos aspectos del funcionamiento del sistema inmune, incluyendo el desarrollo de los órganos linfáticos, inflamación aguda y estimulación linfocitaria. Algunos de sus miembros también están involucrados en la transducción de la señal de muerte, por ello a dichos receptores se los conoce como “receptores de muerte” (Indran et al., 2011) (**Figura I-A**).



**Figura I-A. Inducción de la apoptosis.** Hay dos vías principales que llevan a la activación de vías de señalización que culminan con la activación de caspasas efectoras. Una, mediada por ligandos que se unen a receptores en la superficie celular (vía extrínseca), y la otra, mediada por estrés celular o por daños en el ADN (vía intrínseca; donde la mitocondria tiene un rol clave en la ejecución de la apoptosis. Esta organela experimenta cambios rápidos que llevan a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, con la consecuente formación de poros y liberación de proteínas mitocondriales, como el citocromo c. Adaptado de Indran y col. (Indran et al., 2011).

La familia de proteínas Bcl-2 está compuesta por proteínas pro- y anti-apoptóticas que juegan un rol fundamental en la regulación de la apoptosis, especialmente a través de la vía intrínseca con participación de la mitocondria (Volkman et al., 2014). Todos los miembros de esta familia de proteínas se encuentran localizados por fuera de la membrana externa mitocondrial, son dímeros que se encargan de permeabilizar la membrana mitocondrial externa a través de la creación de poros o canales en la misma (Hongmei, 2012). Se han identificado al menos 17 proteínas Bcl-2 humanas, cada una caracterizada por presentar cuatro regiones de homología, es decir, dominios de homología de Bcl-2 (BH). Los miembros se clasifican en tres grupos funcionales (Czabotar et al., 2014). El primer grupo está formado por proteínas anti-apoptóticas que contienen los cuatro dominios BH, algunos ejemplos son Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, A1/Bfl-1 y Bcl-B/Bcl2L10. El segundo grupo está compuesto por proteínas que presentan solamente un dominio BH-3, algunas de ellas son BID, BIM, Puma, Noxa, BAD, Bmf, Hrk y Bik. Estas proteínas, que se consideran iniciadoras de la apoptosis, se encuentran activas ante daños por estrés celular, estrés de retículo endoplasmático o daños en el ADN. Los miembros del tercer grupo contienen los cuatro dominios BH y son proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bak y Bok/Mtd) (Kluck, 2010). Cuando ocurre un desequilibrio entre las proteínas pro- y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, el resultado es una desregulación de la apoptosis en las células afectadas (**Figura I-B**).



**Figura I-B. Mecanismos que contribuyen a la desregulación de la apoptosis y carcinogénesis.** La desregulación en la apoptosis tiene un rol indispensable en el desarrollo de la carcinogénesis. Hay muchos mecanismos por los cuales las células evaden la muerte celular, en general se dividen en: 1) equilibrio alterado de proteínas pro- y anti-apoptóticas, 2) disminución en la función de caspasas efectoras, 3) alteración de la señalización de los receptores de muerte, 4) mutaciones en p53 y 5) aumento en la expresión de proteínas IAPs. Adaptado de Wong (Wong, 2011)

En estudios previos, hemos demostrado que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y su análogo menos calcemiante TX 527 tienen efectos anti-proliferativos en células endoteliales (SVEC) y transformadas por el receptor viral vGPCR induciendo arresto en el ciclo celular con la consecuente inducción de la apoptosis en un mecanismo dependiente de caspasa-3 (González-Pardo et al., 2014).

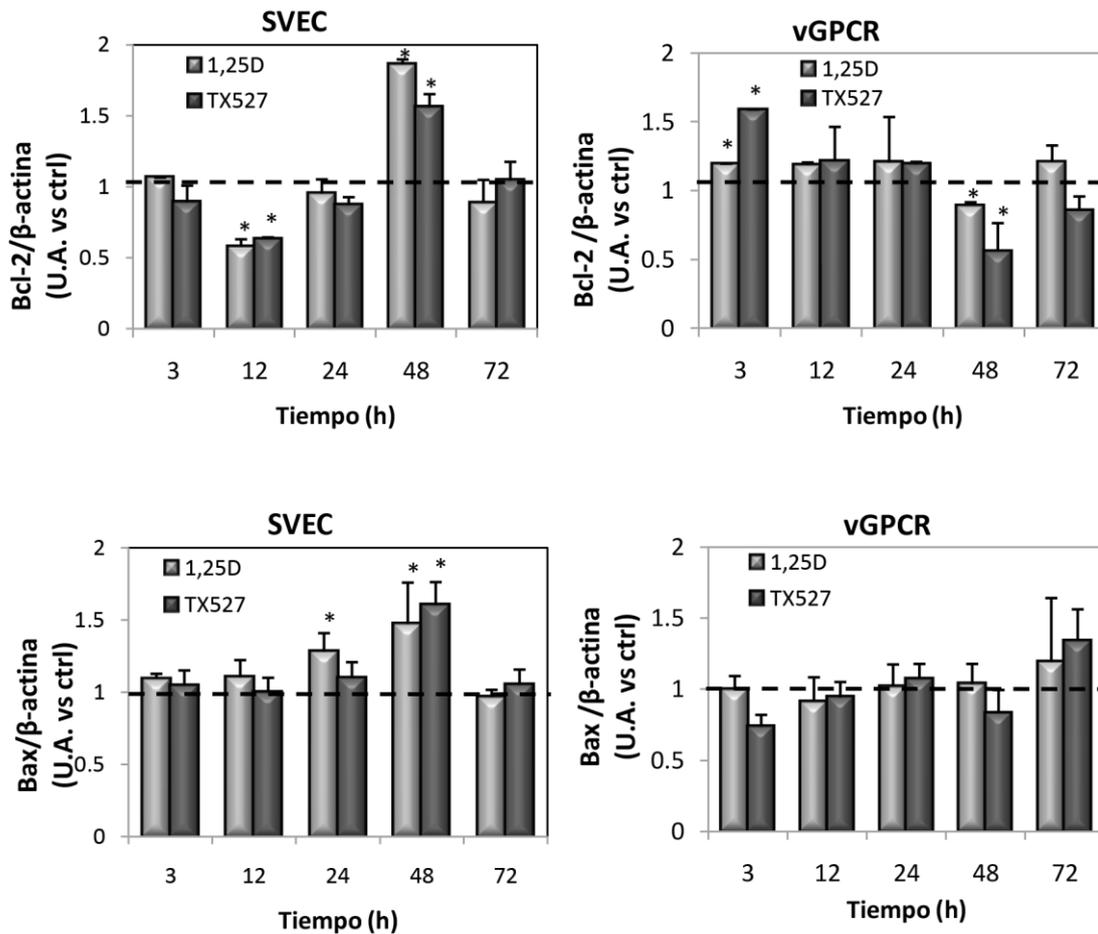
## RESULTADOS

### ***El desbalance dentro de la familia de proteínas Bcl-2 desencadena la apoptosis inducida por el $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y TX 527***

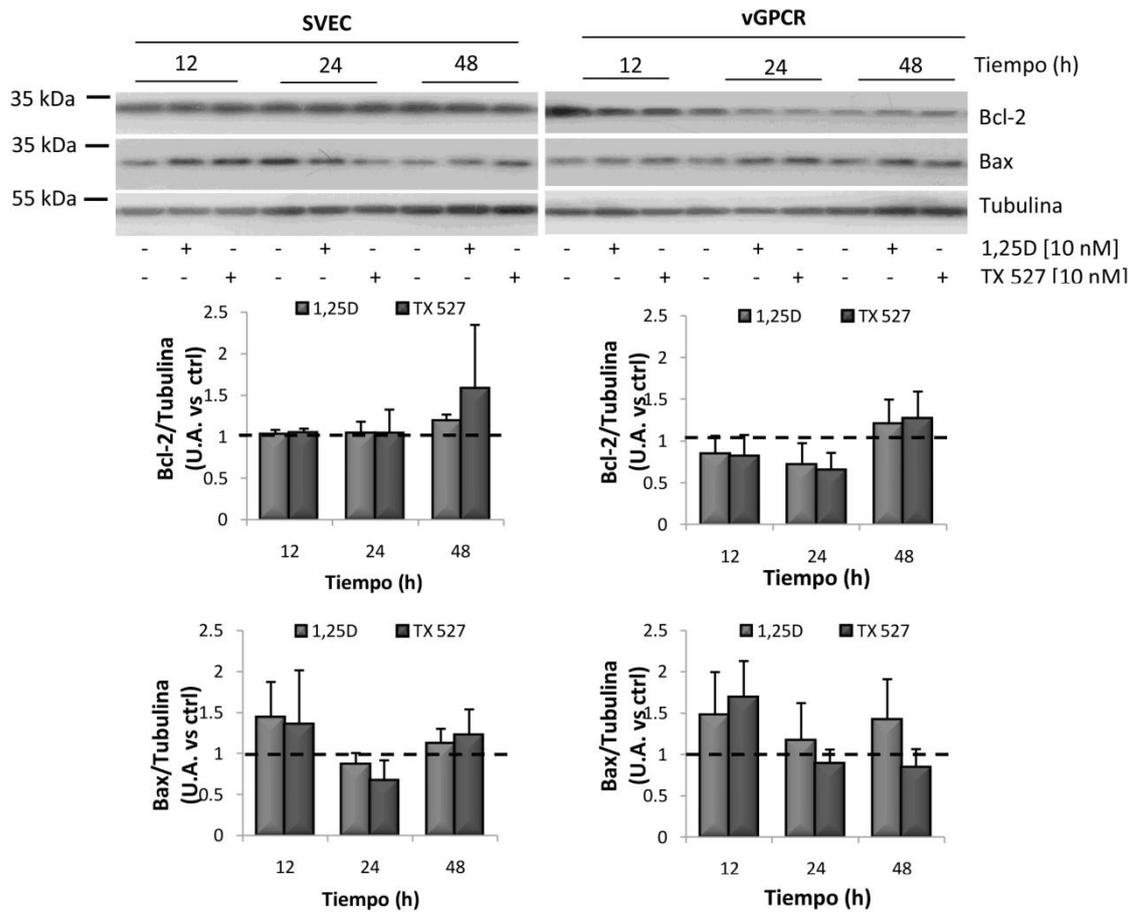
La expresión de Bcl-2 es regulada en células endoteliales que expresan el vGPCR favoreciendo de esta manera la supervivencia celular sugiriendo que Bcl-2 cumple un rol importante en la sarcomagénesis inducida por KSHV (Abboud et al., 2013). En base a estos antecedentes, se investigó la participación de miembros de la familia Bcl-2 en la apoptosis inducida por el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y el análogo TX 527 en las células endoteliales (SVEC) y en las que expresan el receptor viral vGPCR. En primer lugar, se investigó si el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 regulan la expresión del ARN mensajero (ARNm) de Bcl-2 y Bax. Para ello, las células SVEC y vGPCR se sembraron y mantuvieron en cultivo durante 24 horas, luego se retiró el suero durante igual período con el fin de sincronizarlas en la misma fase del ciclo celular. Seguidamente, las células se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) a diferentes tiempos (3-72 horas). Luego, se extrajo el ARN total y se retro transcribió a ADN complementario (ADNc). La expresión de Bcl-2 y Bax se analizó en el ADNc resultante por qRT-PCR utilizando *primers* específicos y  $\beta$ -actina para normalizar los valores de expresión. Los resultados presentados en la **Figura I-1** muestran que la expresión de Bcl-2 es fluctuante en el tiempo, evidenciándose una disminución significativa a las 12 horas y un aumento significativo a las 48 horas de tratamiento con el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 en las células SVEC. Por el contrario, en las células vGPCR se observó un aumento significativo a 3 horas y una disminución a las 48 horas de tratamiento. La expresión del ARNm de Bax aumentó significativamente en células SVEC a las 24 y 48

horas de tratamiento con el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527, mientras que no se observaron variaciones significativas en las células vGPCR. En segundo lugar, se estudió si los cambios en la expresión del ARNm se reflejan en cambios en la expresión proteica. Para ello, se analizaron los niveles proteicos de Bcl-2 y Bax por Western blot en células SVEC y vGPCR tratadas con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) a diferentes tiempos (12-48 horas). Las bandas proteicas se cuantificaron utilizando el programa ImageJ y los datos obtenidos para cada condición se normalizaron con Tubulina y se presentaron en gráficos de barras. Los resultados en la **Figura I-2** no evidencian variaciones significativas en los niveles de las proteínas Bcl-2 y Bax en el período de tiempo estudiado en ambas líneas celulares.

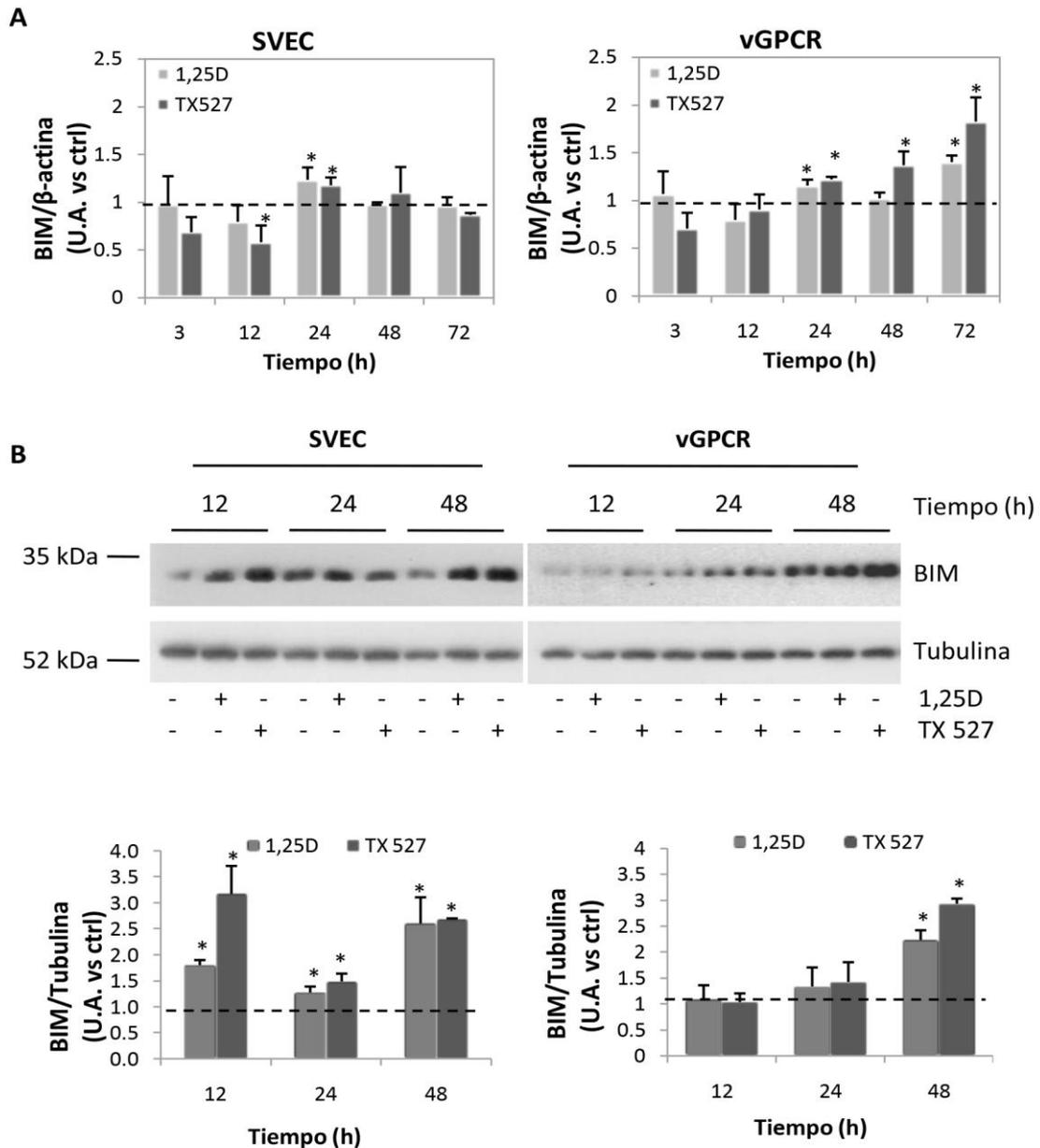
BIM, es un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2 que ha surgido en los últimos años como un regulador de la apoptosis en células tumorales (Delbridge and Strasser, 2015). Se evaluó si BIM es regulada por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527; para ello, las células SVEC y vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) a diferentes tiempos (**Figura I-3**). Primero, se evaluaron los niveles de ARNm de BIM en un lapso de 3 a 72 horas de tratamiento (**Figura I-3A**). El ARN total se extrajo y retro transcribió a ADNc, como se comentó previamente, para luego evaluar la expresión de BIM por qRT-PCR. En células SVEC, se observó una disminución significativa en la expresión del ARNm de BIM a las 12 horas y un aumento significativo a las 24 horas de tratamiento con ambos agonistas. Mientras que, en las células vGPCR se observó un aumento sostenido de BIM a partir de las 12 horas de tratamiento con ambos agonistas. Además, en experimentos en paralelo, se estudió si los niveles de expresión del mensajero se reflejaban en los niveles proteicos de BIM por un análisis de Western blot (**Figura I-3B**). Las bandas proteicas fueron cuantificadas y normalizadas con Tubulina. La cuantificación de los datos obtenidos reveló un aumento significativo en los niveles proteicos de BIM en las células SVEC a todos los tiempos de tratamiento, en cambio las células vGPCR mostraron un pico de aumento significativo a las 48 horas.



**Figura I-1. Regulación de la expresión génica de Bax y Bcl-2 por el  $1\alpha,25(OH)_2D_3$  y TX 527.** Las células SVEC y vGPCR se cultivaron y trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(OH)_2D_3$  (1,25D) o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) durante 3-72 h. El ARN total se extrajo y retro transcribió a ADNc. La expresión génica de Bcl-2 y Bax se evaluó por qRT-PCR, y los valores obtenidos se normalizaron con  $\beta$ -actina. Los gráficos de barras muestran los niveles de expresión entre las condiciones tratadas (1,25D o TX 527) con respecto al vehículo (ctrl) en unidades arbitrarias (U.A.). La significancia estadística de los resultados, de tres experimentos independientes en cada de tiempo, se evaluó por la prueba t de Student (\* $p < 0,05$ ).



**Figura 1-2.** Los niveles proteicos de Bax y Bcl-2 no varían al tratar a las células con  $1\alpha,25(OH)_2D_3$  o TX 527. Las células SVEC y vGPCR se cultivaron y trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(OH)_2D_3$  (1,25D) o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) durante 12-48 h. Los niveles proteicos de Bcl-2, Bax y Tubulina, utilizada como control de siembra, se analizaron por Western blot. Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes y la cuantificación representada en gráficos de barra. Las diferencias significativas entre el vehículo (ctrl) y condiciones tratadas (1,25D o TX 527) se analizaron por la prueba t de Student (\* $p < 0,05$ ).



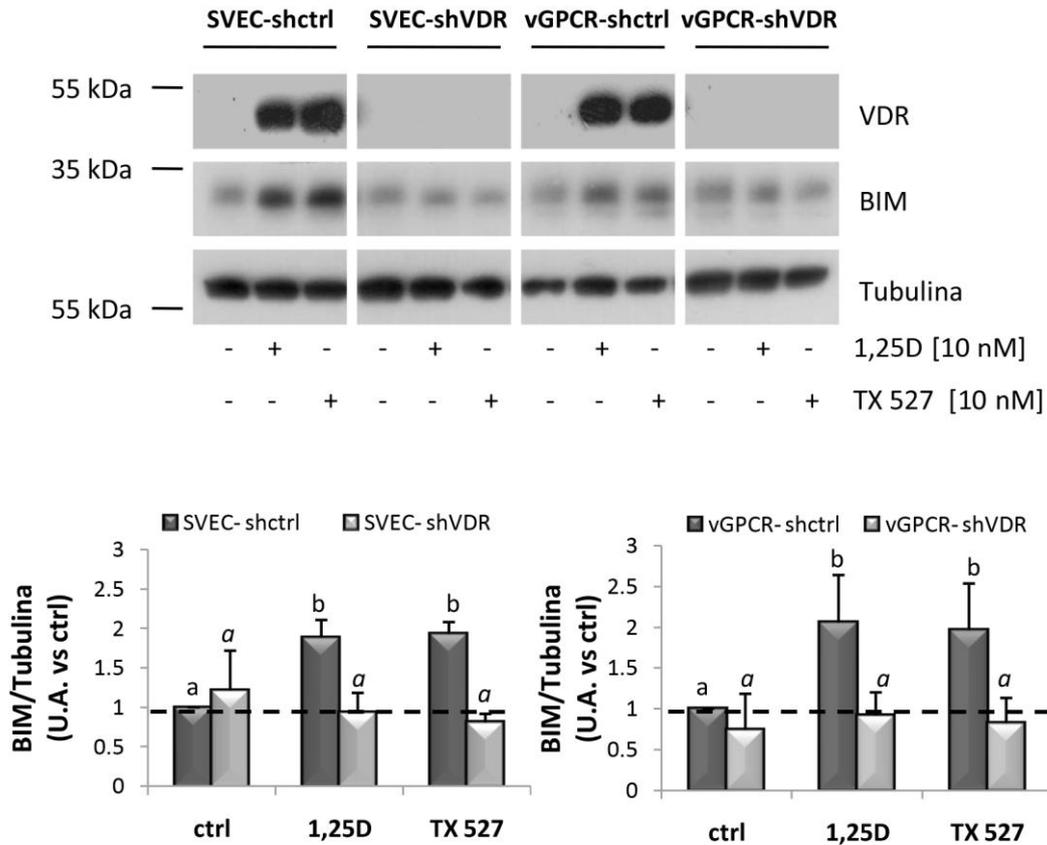
**Figura I-3.** El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 inducen la apoptosis a través de un mecanismo que involucra la regulación de BIM. Las células SVEC y vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) durante 3-72 h. **A)** El ARN total se extrajo y la expresión de BIM se analizó por qRT-PCR. Los datos obtenidos se normalizaron con  $\beta$ -actina y se compararon con su respectivo control en cada tiempo. **B)** Los niveles proteicos de BIM y Tubulina se analizaron por Western blot. Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes y la cuantificación representada en gráficos de barra. Las diferencias significativas entre el control (vehículo) y tratados (1,25D o TX 527) se analizaron por la prueba t de Student, \* $p < 0.05$ .

### ***El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y TX 527 regulan la expresión de BIM por un mecanismo dependiente del VDR***

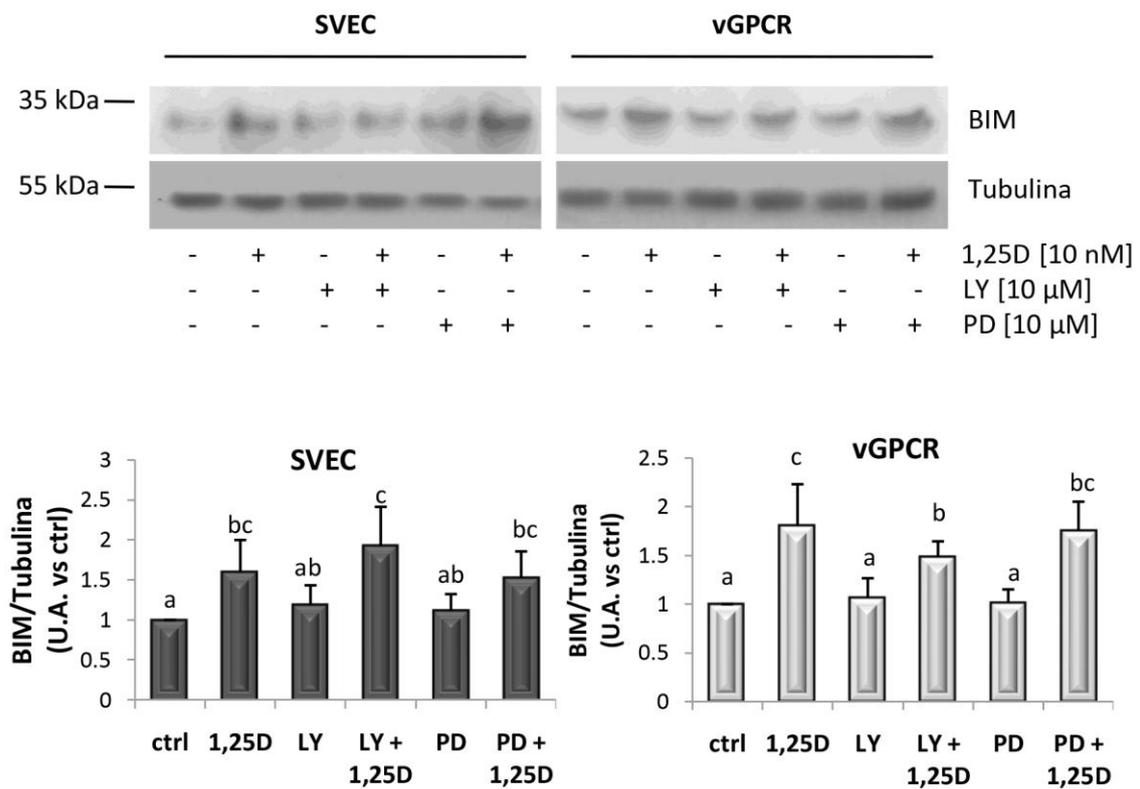
En nuestro laboratorio se demostró que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y el TX 527 inducen la apoptosis en células SVEC y vGPCR por un mecanismo dependiente de la expresión del receptor de vitamina D (VDR) (González-Pardo et al., 2014). Con el fin de investigar si el VDR participa en la inducción de BIM por ambos agonistas, se silenció su expresión de manera estable a través de un *short hairpin* (sh) dirigido contra el VDR de ratón (SVEC-shVDR, vGPCR-shVDR) o un ARN control (SVEC-shctrl, vGPCR-shctrl). Las células se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas y los niveles proteicos de BIM y VDR se analizaron por Western blot. Se eligió este tiempo de tratamiento debido a que fue el tiempo al cual ambas líneas celulares mostraron el mayor pico de expresión de BIM. Primeramente, se monitoreó la expresión de VDR para corroborar el silenciamiento del receptor (**Figura I-4** panel superior) observándose un aumento del mismo a las 48 horas de tratamiento con ambos agonistas, como se reportó en estudios previos (Gonzalez-Pardo et al., 2010; González-Pardo et al., 2014). Bajo estas condiciones, los niveles proteicos de BIM aumentaron significativamente luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527; aumento que fue suprimido cuando se silenció el VDR (**Figura I-4** panel inferior).

La expresión de BIM puede ser regulada a distinto nivel, transcripcional y post transcripcional, por diferentes mecanismos según el contexto; algunas evidencias indican que tanto ERK como Akt participan en este mecanismo. Por un lado, se ha observado que la fosforilación de BIM por ERK causa desestabilización de Bim y su degradación en el proteasoma (Westerberg et al., 2012) y que la inhibición de Akt disminuye la fosforilación de FOXO3a aumentando su translocación al núcleo regulando el aumento de la expresión de Bim (Zhao et al., 2013). Seguidamente, se evaluó si las vías de Akt y ERK1/2 participan en la regulación de la expresión de BIM por el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Las células SVEC y vGPCR se pre-incubaron con 10  $\mu\text{M}$  de PD 98059, inhibidor de MEK (activador de ERK1/2), o LY 294002 inhibidor de PI3K (activador de Akt) y luego se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  durante 48 horas para analizar los niveles proteicos de BIM por Western blot. Los resultados en la **Figura I-5** muestran un aumento en la expresión proteica de BIM al tratar a las células con el

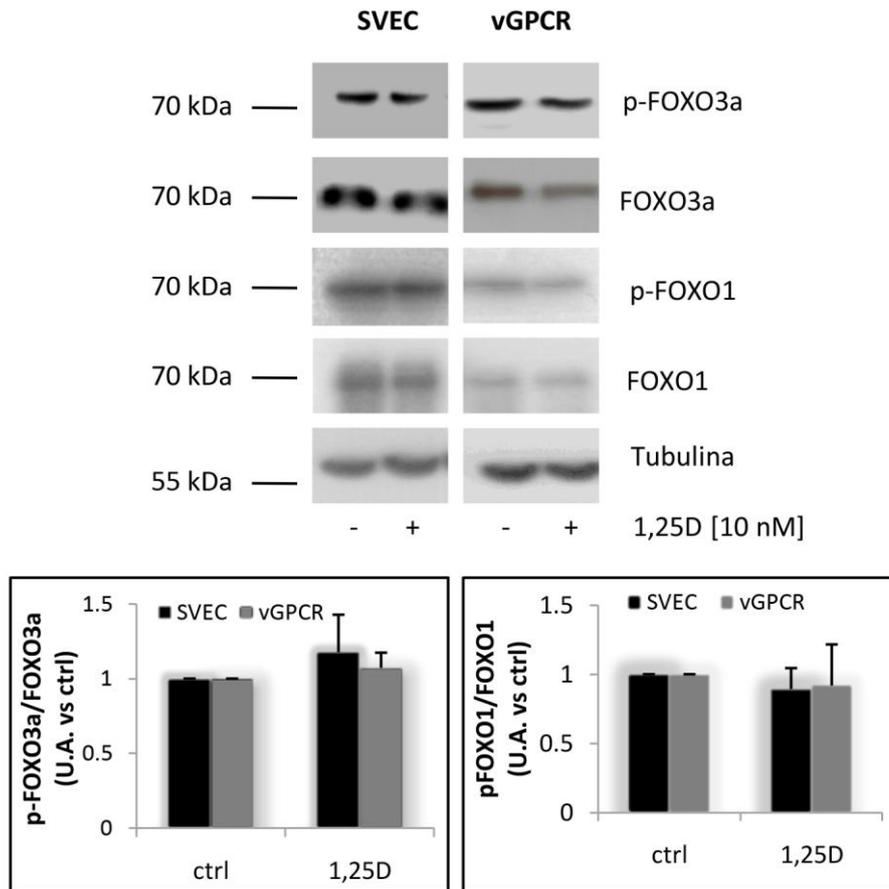
$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , mientras que, en presencia de los inhibidores de la vía de Akt (LY) o ERK1/2 (PD) los niveles proteicos de BIM no variaron con respecto al control. Las células tratadas con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  luego de la inhibición farmacológica de ERK1/2 y Akt mostraron un aumento en la expresión de BIM comparable a las células tratadas en ausencia de los respectivos inhibidores. La actividad pro-apoptótica de las proteínas con dominios BH-3 puede ser regulada por una gran variedad de mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales (Puthalakath and Strasser, 2002). Para investigar si BIM es regulado por un mecanismo que involucra la activación de los factores de transcripción FOXO3a y/o FOXO1, primero se investigó si el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  regula ambos factores de transcripción en células SVEC y vGPCR. Para ello, ambas líneas se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (10 nM) o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas y luego se analizó la expresión y el estado de fosforilación de FOXO3a y FOXO1 por Western blot. Los resultados que se muestran en **Figura I-6**, revelan que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  no regula la expresión o induce cambios en el estado de fosforilación de ambos factores de transcripción. En conjunto, estos resultados indican que la regulación de BIM por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  no depende de las vías Akt, ERK1/2, FOXO3a o FOXO1.



**Figura I-4.** El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 regulan la expresión de BIM por un mecanismo dependiente del VDR. Las líneas SVEC-shctrl, SVEC-shVDR, vGPCR-shctrl y vGPCR-shVDR fueron tratadas con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o TX 527 o vehículo (ctrl, 0,01% de etanol) durante 48 horas. Los niveles proteicos de VDR, BIM y Tubulina, utilizada como control de siembra, se analizaron por Western blot. Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes y la cuantificación representada en gráficos de barras. Las diferencias significativas entre el control (vehículo) y los agonistas se analizaron por ANOVA simple, seguido por la prueba de Bonferroni. Las diferencias significativas entre condiciones se indican con distintas letras,  $p < 0,01$  para SVEC y  $p < 0,05$  para vGPCR.



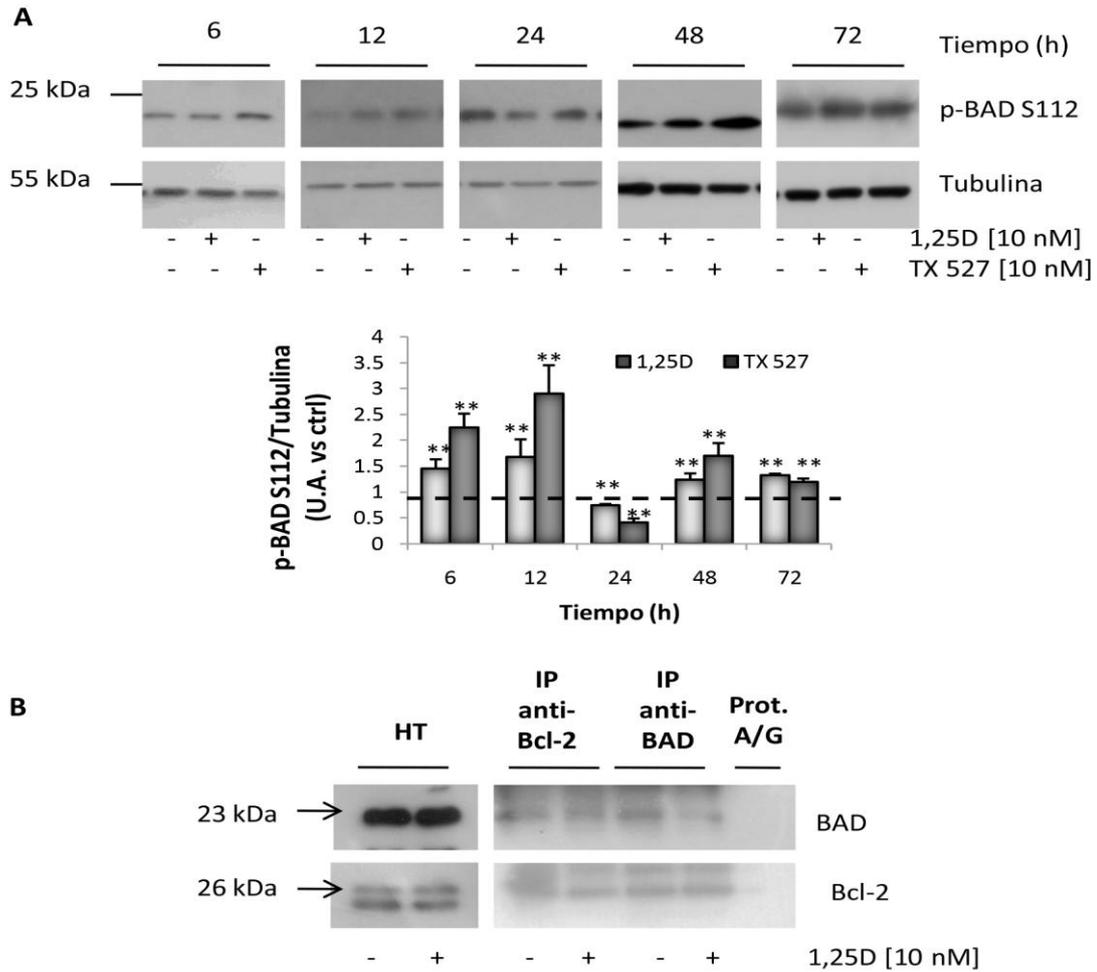
**Figura I-5. El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  regula BIM de manera independiente de Akt o ERK1/2.** Las células SVEC y vGPCR se pre-incubaron con 10  $\mu\text{M}$  de PD98059 (PD) o LY294002 (LY) o vehículo (ctrl) durante 15 minutos, y luego se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) durante 48 horas. Los niveles proteicos de BIM y Tubulina se analizaron por Western blot. Se muestra un blot representativo y la cuantificación correspondiente a ocho experimentos independientes representada en gráficos de barras. El análisis estadístico de los datos se realizó por ANOVA simple seguido por la prueba de Bonferroni; diferentes letras indican diferencias significativas entre las condiciones (\* $p < 0,05$ ).



**Figura I-6.** El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  no modifica la expresión o activación de los factores de transcripción FOXO3a y FOXO1. Las células SVEC y vGPCR fueron tratadas con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o vehículo (ctrl, 0,01% de etanol) durante 48 horas. Los niveles proteicos de FOXO3a, FOXO1, p-FOXO3a, p-FOXO1 y Tubulina se analizaron por Western blot. Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes, las bandas proteicas se cuantificaron y se relacionó la cantidad de FOXO3a o FOXO1 fosforilada con su total previamente normalizados con Tubulina (gráfico de barras). Como análisis estadístico se utilizó la prueba t de Student para evaluar las diferencias entre ctrl y 1,25D.

## ***El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y TX 527 modulan la activación de BAD en células vGPCR***

La proteína BAD, es un miembro pro-apoptótico de la familia de proteínas Bcl-2 ampliamente regulada en los diferentes tipos de cáncer e involucrada principalmente en los eventos tempranos de la apoptosis (Czabotar et al., 2014). Para evaluar si el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o su análogo modulan la fosforilación de BAD, las células vGPCR se trataron con ambos compuestos a diferentes tiempos (6-72 h). Como se muestra en la **Figura I-7A**, tanto el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  como el TX 527, provocaron un aumento en la fosforilación de BAD en serina 112 de manera significativa en todos los tiempos, salvo a las 24 horas en donde se evidenció un pico de inactivación altamente significativo. Se ha observado que la proteína BAD puede heterodimerizar con miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, como Bcl-xL o Bcl-2, neutralizando su efecto protector y promoviendo la muerte celular (Youle and Strasser, 2008). Seguidamente, se investigó si la disminución en la fosforilación de BAD a las 24 horas de tratamiento se relaciona con la formación de heterodímeros entre Bcl-2 y BAD. Para ello, se investigó dicha asociación por co-inmunoprecipitación (co-IP). Las células vGPCR tratadas con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o vehículo (0,01% de etanol) se colectaron en buffer de co-IP, a partir del lisado celular se inmunoprecipitó Bcl-2 o BAD respectivamente. Posteriormente, se evaluó el nivel de expresión proteica de ambas proteínas por Western blot. Los resultados en la **Figura I-7B** muestran una asociación entre Bcl-2 y BAD luego de 24 horas de tratamiento con el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  al igual que en la condición control.

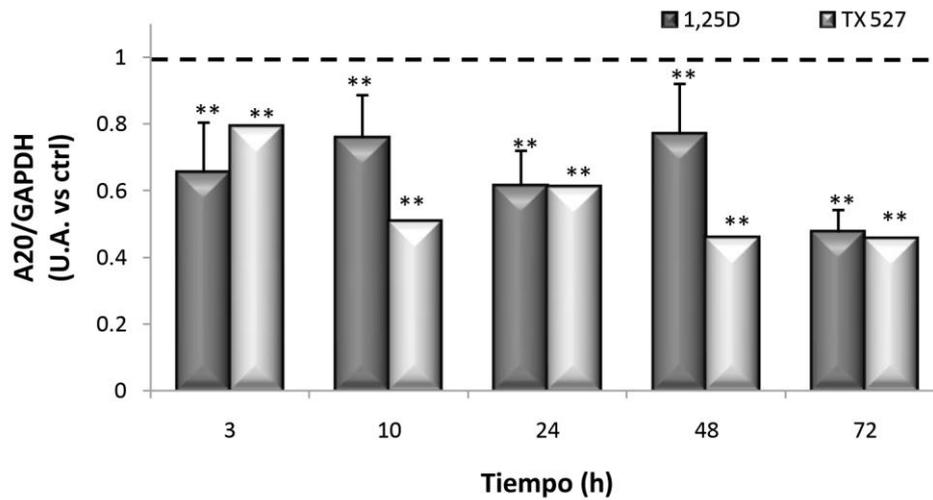


**Figura I-7. El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 inducen cambios en la fosforilación de BAD en células vGPCR.** **A)** Las células vGPCR se cultivaron y trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) durante 6-72 horas. Se evaluó el estado de fosforilación de BAD en Serina 112 (S112) por Western blot, y se empleó Tubulina como control de siembra. Se muestra un blot representativo y la cuantificación de p-BAD S112 normalizada con Tubulina de cuatro experimentos independientes en un gráfico de barras. El análisis estadístico se realizó comparando cada condición tratada con su respectivo control a cada tiempo a través de una prueba t de Student (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). **B)** Las células vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) durante 24 horas y luego se colectaron en buffer de Co-IP. Las proteínas de los lisados celulares se incubaron con anticuerpos anti-BAD (2  $\mu\text{l}$ -250  $\mu\text{g}$ ) o anti-Bcl-2 (2  $\mu\text{l}$ -250  $\mu\text{g}$ ) durante cinco horas. Luego, se agregó 25  $\mu\text{l}$  de proteína A/G y evidenció la formación de complejos entre ambas proteínas con anticuerpos correspondientes por Western blot. Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes.

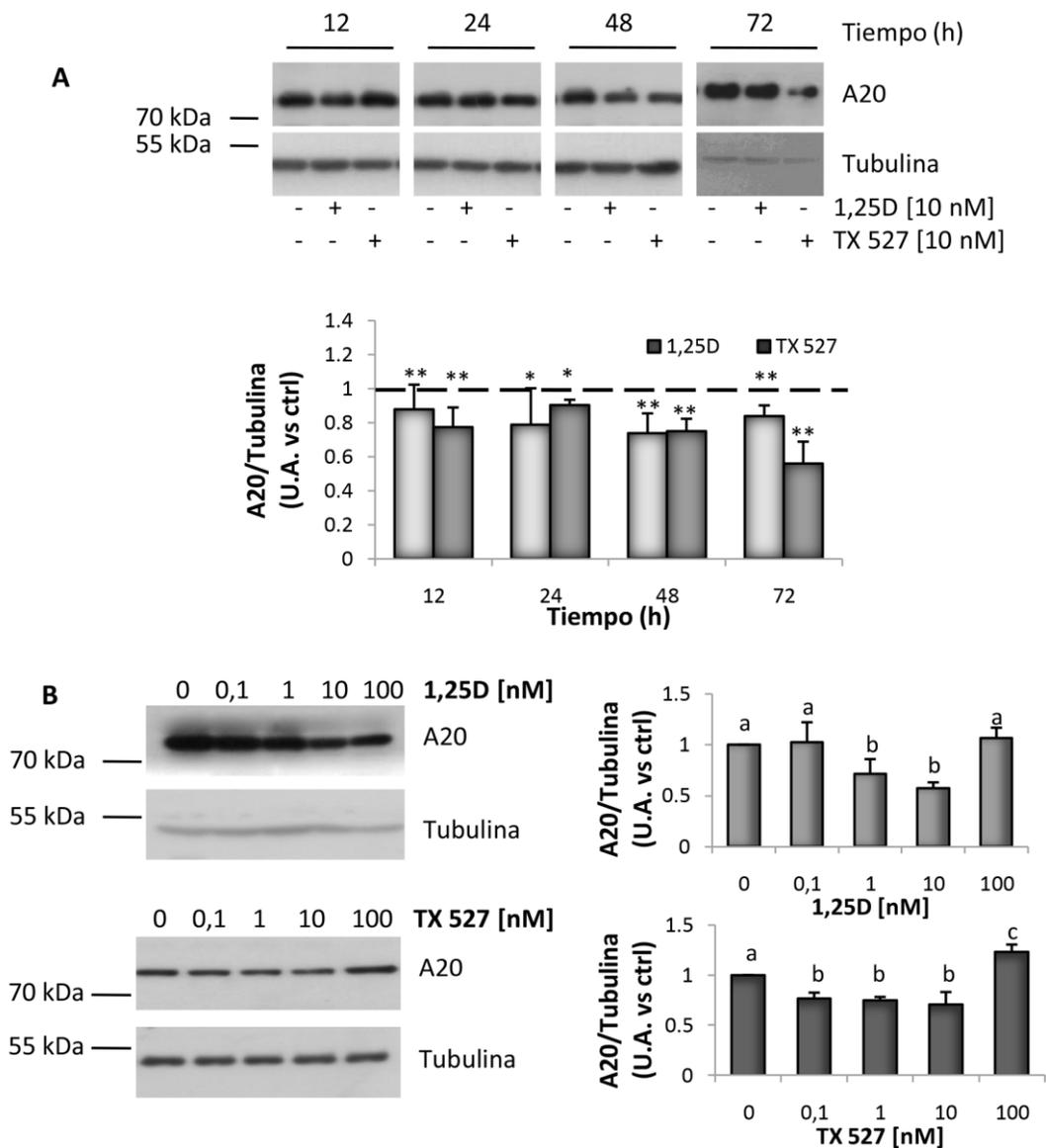
### ***El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y TX 527 regulan los niveles de A20 por un mecanismo dependiente del VDR***

A20 es una proteína que tiene como funciones principales inhibir a NF- $\kappa$ B provocando una respuesta inflamatoria en los tejidos (Shembade and Harhaj, 2012) y actuar como supresor tumoral en diferentes tipos de cáncer (Honma et al., 2009; Vendrell et al., 2007). Se investigó, si el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y el TX 527, modulan a A20 en función del tiempo y de la dosis en células vGPCR. En primer lugar, se analizaron los niveles de expresión del ARNm y de la proteína de A20 a diferentes tiempos. En la **Figura I-8** se muestra la cuantificación correspondiente a los resultados obtenidos para el ARNm de A20 observándose una disminución sostenida en todos los tiempos de tratamiento (3-48 h), esta disminución se correspondió con los niveles proteicos a partir de las 12 horas de tratamiento con ambos agonistas (**Figura I-9A**). Luego las células se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) a diferentes concentraciones (0,1-100 nM) durante 48 horas (**Figura I-9B**). Los resultados muestran una disminución significativa de los niveles proteicos de A20 de manera dependiente de la dosis, sin embargo, a la dosis más alta (100 nM) ambos compuestos provocaron una reversión del efecto, esto podría deberse a un mecanismo de las células para contrarrestar los eventos de muerte desencadenados por ambos agonistas. Posteriormente, se evaluó la localización subcelular de A20, para ello las células se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  durante 48 horas. A continuación, se realizó un fraccionamiento subcelular para obtener la fracción nuclear y citosólica. Los niveles proteicos de A20 se evaluaron por Western blot. Como se observa en la **Figura I-10**, A20 se detectó solo en el citosol y luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  se observó una disminución significativa con respecto al control. Esto concuerda con estudios previos que demostraron una localización citoplasmática de A20 principalmente en compartimentos de membrana endocítica asociados al lisosoma (Li et al., 2008). Por último, para evaluar la participación del VDR en la expresión de A20, se empleó la línea celular vGPCR en donde la expresión del receptor se encuentra suprimida (vGPCR-shVDR) o la línea control (vGPCR-shctrl). Las células se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o su análogo, durante 48 horas (**Figura I-11**). Como se observó anteriormente, ambos compuestos disminuyeron significativamente los niveles

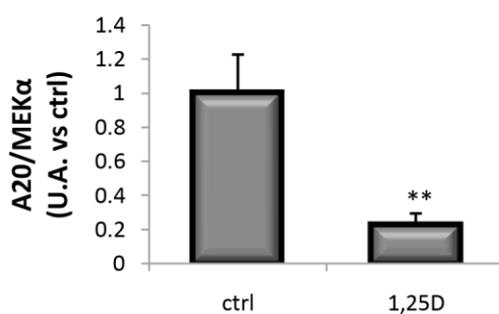
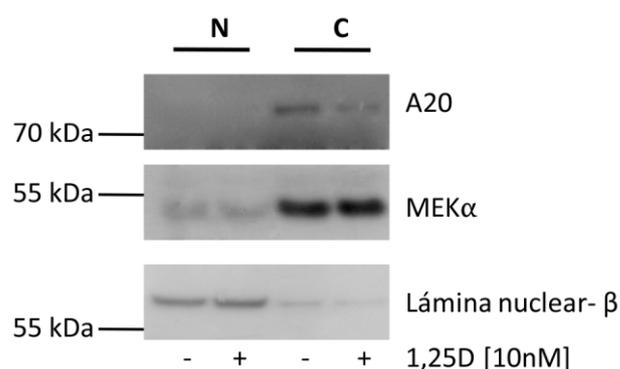
proteicos de A20 y dicho efecto fue revertido cuando el VDR fue silenciado, indicando que, tanto el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  como el TX 527, regulan a A20 por un mecanismo genómico dependiente del VDR.



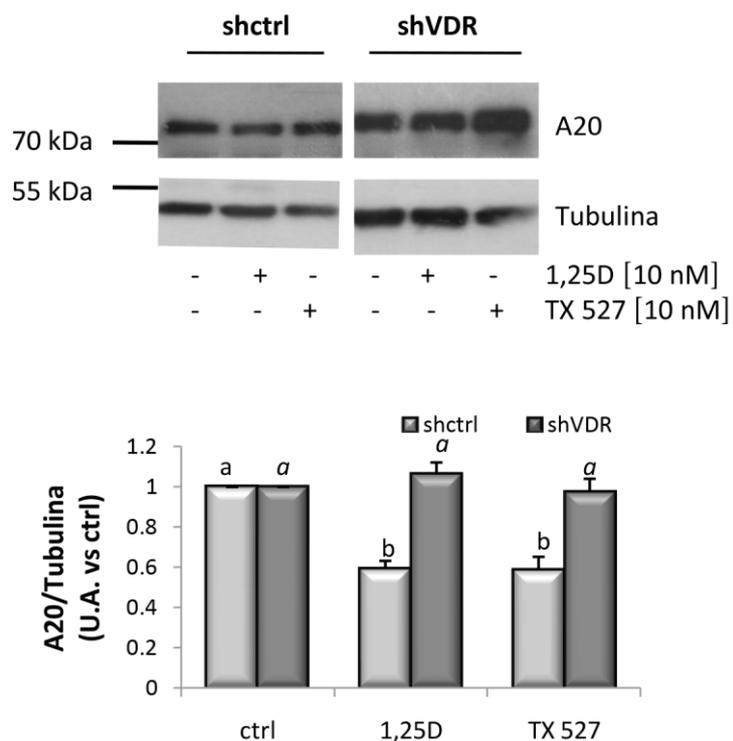
**Figura I-8.** El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 disminuyen la expresión génica de A20 en células vGPCR. Las células vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) durante 3-72 horas. Se aisló el ARN total y se obtuvo el ADNc a partir de 1  $\mu\text{g}$  de ARN por transcripción reversa. Se analizó la expresión de A20, y GAPDH como control de siembra, por qRT-PCR. Los gráficos de barra muestran los resultados cuantitativos expresados como la relación entre 1,25D o TX 527 en comparación con el control (vehículo). Los resultados de seis experimentos independientes se analizaron estadísticamente a través de la prueba t de Student (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).



**Figura I-9. El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 disminuyen los niveles proteicos de A20 en forma dependiente del tiempo y dosis en células vGPCR.** Las células vGPCR se trataron con: **A)** 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) durante 12-72 horas, y **B)** concentraciones crecientes de 1,25D o TX 527 (0,1-100 nM) o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas. Los niveles proteicos de A20 y Tubulina se analizaron por Western blot. Se muestra un blot representativo de al menos tres experimentos independientes y la cuantificación de las bandas de A20, normalizadas con Tubulina, presentada en gráficos de barras. El análisis estadístico de los resultados se realizó en el estudio tiempo respuesta por la prueba t de Student (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ) y en el dosis respuesta por ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni, en donde las diferencias significativas se representan con distintas letras ( $p < 0,01$ ).



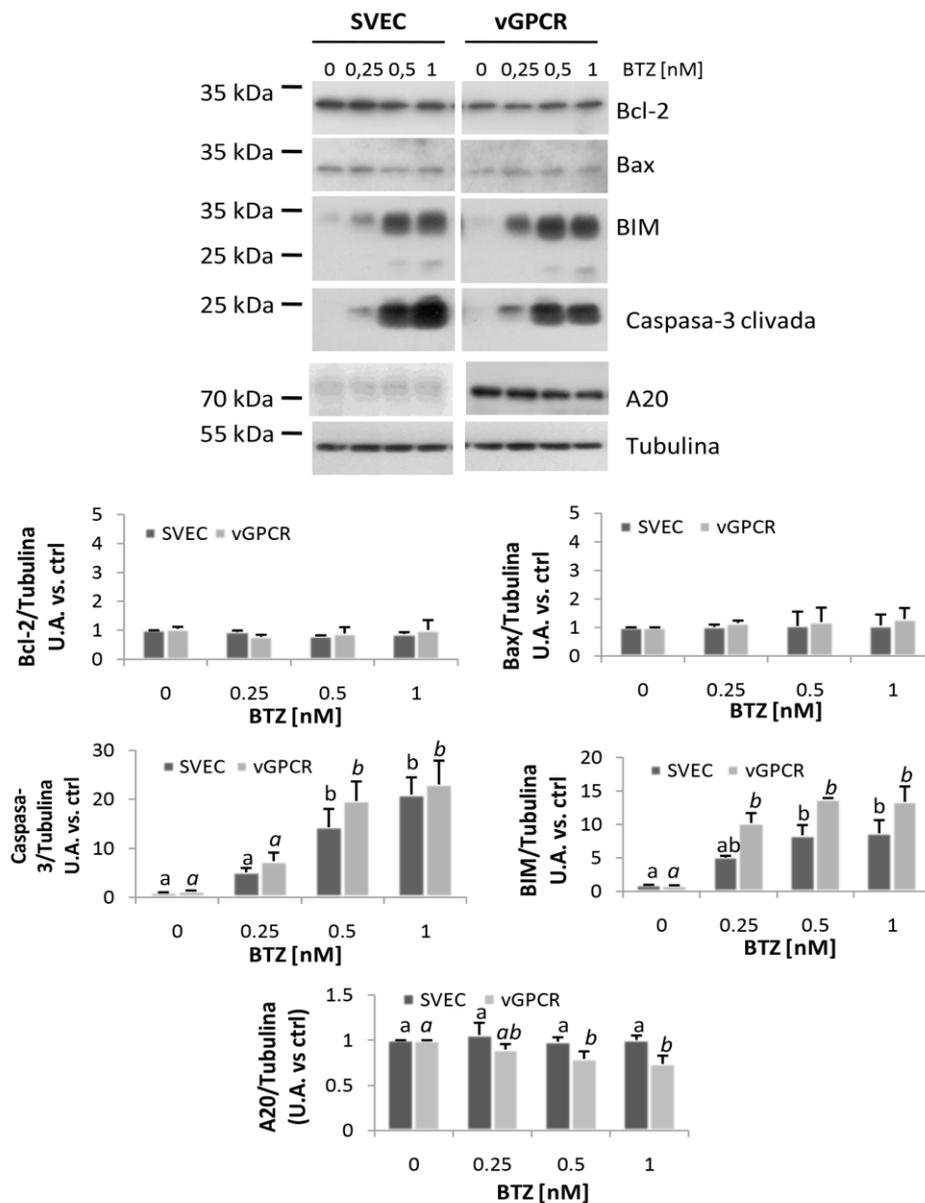
**Figura I-10. A20 disminuye en el citosol por acción del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Las células vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) durante 48 horas. Se realizó un fraccionamiento subcelular para obtener la fracción nuclear (N) y el citosol (C). Los niveles proteicos de A20 se analizaron por Western blot. La pureza de las fracciones se determinó a través del análisis de marcadores específicos, MEK $\alpha$  para C y Lámina nuclear- $\beta$  para N. Se muestra un blot representativo de seis experimentos independientes y la cuantificación correspondiente al citosol representada en un gráfico de barras. Los datos se analizaron estadísticamente por la prueba t de Student en donde se comparó el efecto del 1,25D respecto del ctrl (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).



**Figura I-11. La regulación de A20 por  $1\alpha,25(OH)_2D_3$  y TX 527 es dependiente del VDR.** Las células vGPCR-shctrl (shctrl) y vGPCR-shVDR (sh-VDR) se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(OH)_2D_3$  (1,25D) o TX 527 o vehículo (ctrl, 0,01% de etanol) durante 48 horas. A20 se analizó por Western blot como en la Fig. I-9. Se muestra un blot representativo de cuatro experimentos independientes, y la cuantificación representada en gráficos de barras. El análisis estadístico se realizó primeramente por ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni, en donde diferentes letras indican las diferencias significativas entre condiciones ( $p < 0,01$ ).

## ***El Bortezomib induce la apoptosis regulando el balance de proteínas anti- y pro-apoptóticas similarmente a los agonistas del VDR***

El análogo del ácido bórico dipeptídico VELCADE™ (Bortezomib; conocido como PS-341, LDP-341 y MLM341) es un inhibidor potente y selectivo del proteasoma, una enzima multicatalítica que está involucrada en muchas señales reguladoras degradando proteínas o sus inhibidores (Adams and Kauffman, 2004). Bajas concentraciones de Bortezomib en el orden de los nanomolares es suficiente para inhibir la activación de NF-κB (Blackburn et al., 2010). La regulación negativa de la vía NF-κB es parte del mecanismo implicado en los efectos anti-proliferativos del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en células endoteliales transformadas por el vGPCR (Gonzalez-Pardo et al., 2012; González-Pardo et al., 2013). En base a estos antecedentes del grupo, se investigó si la inhibición de la vía NF-κB por Bortezomib, induce apoptosis provocando un cambio en el balance entre las proteínas anti- y pro-apoptóticas. Para ello, las células SVEC y vGPCR se trataron con concentraciones crecientes de Bortezomib (0,25-1 nM) o vehículo (0,1% de DMSO) durante 24 horas. Los niveles proteicos de Bcl-2, A20, Bax y BIM, como también el clivaje de caspasa-3 se evaluaron por Western blot. Los resultados presentados en la **Figura I-12** muestran un aumento significativo en los niveles proteicos de la proteína pro-apoptótica BIM, acompañado por el clivaje de caspasa-3 y no se observaron cambios en los niveles de Bax ni en Bcl-2 en ambas líneas celulares (SVEC y vGPCR). En presencia de Bortezomib, los niveles proteicos de A20 disminuyeron de manera dependiente de la concentración en las células vGPCR, mientras que en las SVEC, no se observaron variaciones significativas.



**Figura I-12. El inhibidor del proteasoma, Bortezomib, induce la expresión de BIM, inhibe a A20 y provoca el clivaje de caspasa-3.** Las células SVEC y vGPCR fueron tratadas con concentraciones crecientes de Bortezomib (BTZ, 0,25-1 nM) o vehículo (0,1% de DMSO) durante 24 horas. Los niveles proteicos de BIM, Bcl-2, Bax, caspasa-3 clivada, A20 y Tubulina como control de siembra, se analizaron por Western blot. Se muestra un blot representativo, de al menos tres experimentos, y la cuantificación correspondiente representada en gráficos de barras. Las diferencias significativas se analizaron por ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni. Diferentes letras representan las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

La apoptosis es un proceso celular organizado que se lleva a cabo en condiciones fisiológicas normales en los diferentes tejidos del organismo. La desregulación de este proceso puede alterar el equilibrio entre la proliferación y la muerte celular, dando como resultado el desarrollo de patologías como el cáncer (Wong, 2011). De hecho, la evasión de la muerte celular programada se ha reconocido como una de las seis características distintivas en la fisiología celular de la mayoría de los cánceres humanos (Hanahan and Weinberg, 2011). Por otra parte, diferentes tipos de cánceres que poseen alteraciones en las proteínas implicadas en la señalización de la muerte celular, a menudo son resistentes a la quimioterapia y son más difíciles de tratar. Motivo por el cual, en los últimos años, se han desarrollado drogas cuyo potencial terapéutico tenga principal acción sobre el potencial proliferativo de las células cancerosas, con resultados prometedores (Fesik, 2005). Los integrantes de la familia de proteínas Bcl-2 tienen un rol fundamental en la regulación de la muerte celular y son capaces de regular diversos mecanismos celulares involucrados en la apoptosis, necrosis y autofagia (Cory et al 2003; Kroemer & Levine, 2008; Reed, 2008). Un desequilibrio en la expresión de proteínas pro- y anti-apoptóticas colaboran en el desarrollo de la enfermedad. El gen Bcl-2 ha sido implicado en una serie de cánceres, linfomas de células B y T, cervicales, pulmonares, de mama, próstata y cánceres colorectales (Yip and Reed, 2008) y como ya se mencionó, la expresión de Bcl-2 es regulada en células endoteliales que expresan el vGPCR colaborando de esta manera con la supervivencia celular, sugiriendo un papel importante para Bcl-2 en la sarcomagénesis inducida por KSHV (Abboud et al., 2013). Por otra parte, es común encontrar alteraciones en la expresión de miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 en células cancerosas, lo que resulta en la pérdida de su función como supresores tumorales (Reed, 2008). En células de cáncer de próstata se demostró que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induce apoptosis por disrupción mitocondrial y activación de la vía intrínseca de la apoptosis, disminuyendo la expresión de genes anti-apoptóticos como Bcl-2 y aumentando genes pro-apoptóticos como Bax (Krishnan and Feldman, 2011). En este trabajo de tesis, si bien se observaron variaciones en los niveles de expresión génica de Bcl-2 en ambas líneas

celulares, y solo de Bax en SVEC, se evidenció que estos cambios no se reflejaron en los niveles proteicos de Bcl-2 y Bax. Sin embargo, a diferencia de otros tipos celulares, se observó un aumento en los niveles de expresión génica y proteica de BIM con ambos agonistas en células SVEC y vGPCR por un mecanismo que depende de la expresión del VDR. Este desbalance provocado por BIM entre proteínas anti y pro apoptóticas es parte del mecanismo desencadenante del clivaje de caspasa -3 previamente reportado conduciendo finalmente a la apoptosis. Reportes previos demuestran que las vías de señalización de mTOR/Akt y ERK1/2 cooperan en la progresión del cáncer de próstata y en la transición de la enfermedad a su estadio independiente de andrógenos por activación de vías apoptóticas que incluyen la activación de BIM (Kinkade et al., 2008). Al estimular células con factores de crecimiento se observó un aumento en la activación de ERK1/2 con la consecuente disminución de BIM, y se cree que el proteasoma estaría involucrado en su degradación (Ley et al., 2005). No obstante, los resultados en este trabajo indican que al inhibir la expresión de Akt o ERK1/2 con inhibidores farmacológicos la expresión de BIM no se vio modificada en presencia de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sugiriendo que la regulación de BIM en células endoteliales (SVEC) y transformadas por el vGPCR, es por una vía de señalización independiente de Akt y ERK1/2.

Por otra parte, se sabe que, los factores de transcripción Forkhead, FOXO1 (FKHR), FOXO3a (FKHRL1) y FOXO4 (AFX) desempeñan un papel fundamental en la supresión tumoral, induciendo la detención del crecimiento y la apoptosis. La pérdida de función de estos factores de transcripción y su posterior degradación proteasomal ha sido implicada en la transformación y malignidad celular (Huang et al., 2005). En linfocitos, se vio que las citoquinas promueven la supervivencia mediante la regulación del factor de transcripción FOXO3a y BIM (Dijkers et al., 2000). Recientemente se ha demostrado que, el tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  regula la unión de FOXO3a y FOXO4 a las regiones reguladoras del ADN mediante una interacción directa entre el VDR, FOXO3a o FOXO4, y los reguladores FOXO1, Sirt1 (Sirtuina 1, una histona deacetilasa de clase III) y la proteína fosfatasa 1 (An et al., 2010). En este sentido, los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  no modifica la expresión ni la activación de los factores de transcripción FOXO3a y FOXO1.

Estudios en melanoma han demostrado que factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento de fibroblastos e IL-3 pueden regular el estado de fosforilación de ciertos miembros de la familia Bcl-2 a través de la vía de MAPKs/ERK; aumentando la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial, liberación del citocromo c provocando el ensamblaje de un complejo activador de caspasas o apoptosoma (Sheridan et al., 2008). En estudios en células HeLa tratadas con Deguelina, un flavonoide presente en el reino vegetal, se observó una disminución en la fosforilación de ERK1/2 con la consecuente activación de la apoptosis mediante una vía que involucra la liberación y activación de las proteínas pro-apoptóticas Bax y BAD fosforilada en su residuo serina 112, con la consecuente formación de poros en la membrana externa mitocondrial (Hafeez et al., 2016). En este trabajo de tesis se vio que el tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 indujo cambios en la fosforilación de BAD en su residuo serina 112, mostrando un aumento sostenido en la fosforilación de 6 a 72 horas, exceptuando las 24 horas de tratamiento en donde observamos un pico de disminución significativo. La proteína BAD puede actuar promoviendo el desarrollo de la apoptosis a través de su fosforilación y activación (She et al., 2002) o puede también formar heterodímeros con otros miembros de la familia de proteínas Bcl-2. Estos complejos migran a la membrana externa mitocondrial, en donde colaboran con la formación de poros en la misma (Youle and Strasser, 2008). En este sentido, se observó que BAD en su forma inactiva, desfosforilada, forma complejos con la proteína Bcl-2 como parte del mecanismo de acción del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . En apoyo a estos resultados, se ha demostrado que BAD puede formar complejos inhibitorios en la mitocondria con Bcl-2, sin embargo si esta proteína se fosforila, se produce la consecuente liberación de Bcl-2 que al unirse a otras proteínas pro-apoptóticas como Raf-1, contribuyen a la disminución de la supervivencia celular (Jin et al 2005). BAD podría jugar un rol dual en el mecanismo de acción de la hormona y su análogo, por un lado, estaría involucrado en la promoción de la apoptosis a través de su fosforilación en el residuo serina 112, o podría estar siendo utilizado por las células como una estrategia para contrarrestar los eventos de muerte a las 24 horas de tratamiento.

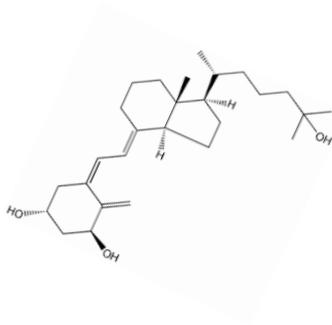
A20, también conocida como proteína inducida por el factor de necrosis tumoral (TNFAIP), se identificó en células endoteliales como un gen de respuesta primaria

inducida por el tratamiento con TNF. Numerosos estudios demostraron que, A20 no sólo actúa como un inhibidor de la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de TNF, sino también actúa como un inhibidor de la activación de NF- $\kappa$ B en respuesta a IL-1 y CD40. Esta proteína, además, se encuentra involucrada en la señalización celular a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y en la activación de los receptores de antígenos en células T y B (Catrysse et al., 2014). La proteína A20 tiene la peculiaridad de tener un comportamiento dual, ya que no sólo es un inhibidor de la activación de NF- $\kappa$ B, sino que también se comporta como una molécula anti-apoptótica en algunos sistemas celulares (Hymowitz and Wertz, 2010). Estudios en ratones con deficiencia en A20 (Tnfrif3<sup>-/-</sup>), mostraron que desarrollan inflamación espontánea y letalidad perinatal (Lee, 2000; Turer et al., 2008), además se ha observado que mutaciones bialélicas de este gen son patogénicas en una variedad de linfomas humanos (Compagno et al., 2009; Kato et al., 2009; Malynn and Ma, 2009). Estudios *in vitro* demostraron que A20 se encuentra altamente expresada en células de cáncer de próstata contribuyendo a la supervivencia celular, y que el TNF,  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y andrógenos regulan negativamente a esta proteína (Golovko et al 2005). Los resultados de este trabajo revelaron que las células vGPCR presentan altos niveles citoplasmáticos de A20 en comparación con las SVEC y su expresión disminuye por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 a través de un mecanismo genómico que involucra al VDR.

La inhibición de la vía de señalización NF- $\kappa$ B es parte del mecanismo implicado en los efectos anti-proliferativos del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en células endoteliales transformadas por el vGPCR (Gonzalez-Pardo et al., 2012). Además, se evidenció que la inhibición de la vía NF- $\kappa$ B por Bortezomib, o el agonista del VDR TX 527, disminuyen la proliferación y la expresión de genes pro-inflamatorios en células vGPCR (Gonzalez-Pardo et al., 2010; González-Pardo et al., 2013). Al inhibir la vía NF- $\kappa$ B con Bortezomib en células vGPCR se observó un cambio en los niveles de proteínas pro- y anti-apoptóticas, de manera comparable al  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y su análogo; aumento en los niveles de BIM, acompañado por un aumento en el clivaje de caspasa-3 y una disminución en los niveles de A20, mientras que las proteínas Bcl-2 y Bax no mostraron variaciones significativas.

## CONCLUSIÓN

En conjunto, estos resultados demuestran que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527, inducen un desbalance en los niveles de proteínas pro- y anti-apoptóticas en células SVEC y vGPCR por un aumento de BIM, disminución de A20, sin variar los niveles de Bcl-2 ni Bax; evento acompañado por variaciones en los niveles de p-BAD serina 112. Aunque el mecanismo de inducción de apoptosis no se ha dilucidado completamente, se puede inferir a partir de los resultados obtenidos que la proteína Bcl-2 podría asociarse a BAD en la membrana mitocondrial formando un complejo inhibitorio, o liberarse y activarse a través de su fosforilación en el residuo serina 112 e inducir el clivaje de la caspasa-3 a través de un mecanismo que involucra la inhibición de A20. La inhibición de la vía NF- $\kappa$ B por Bortezomib involucra a esta vía como parte del mecanismo de inducción de la apoptosis mediado por ambos agonistas del VDR,  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527, en las células vGPCR.



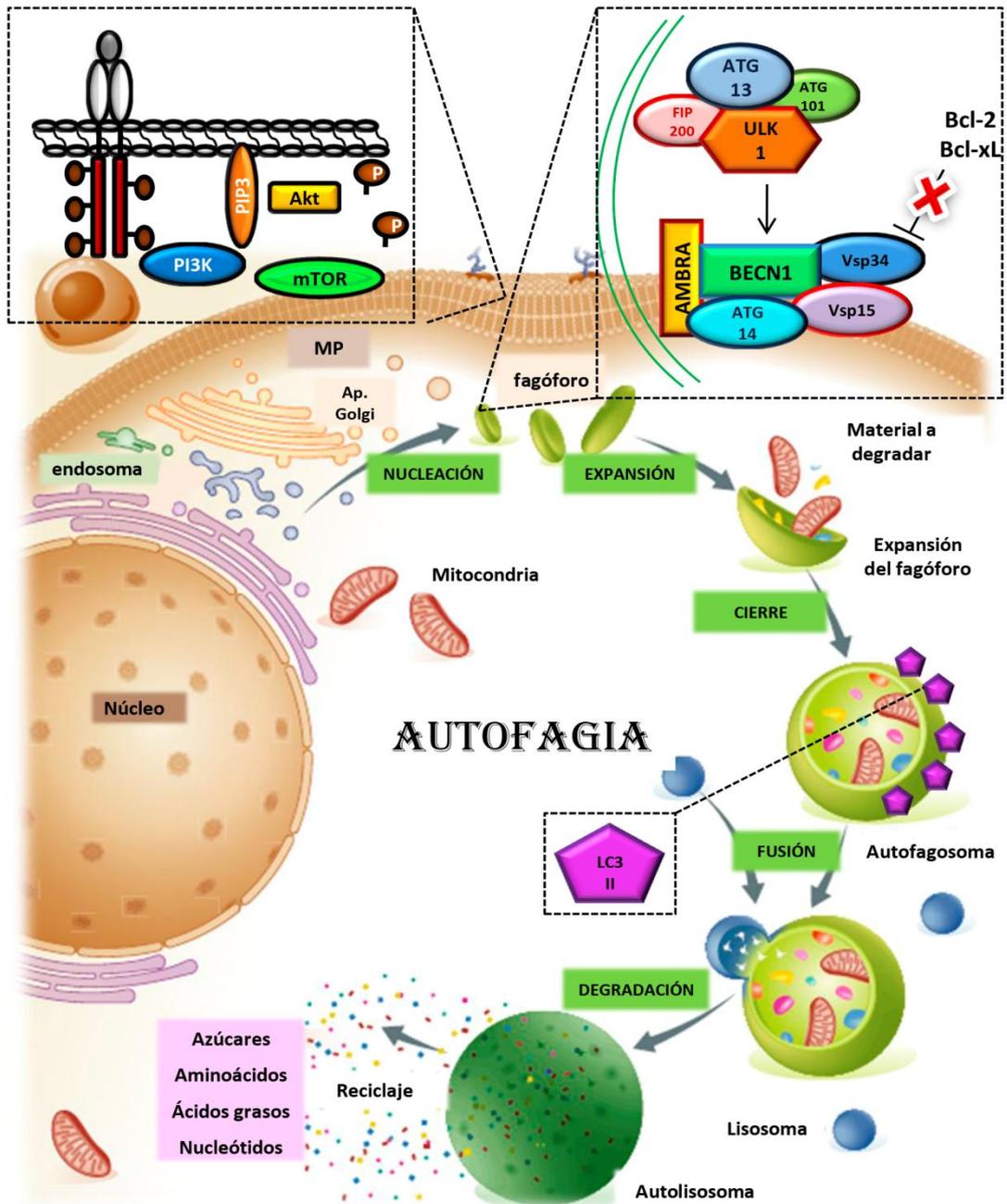
## CAPITULO II

Inducción de la autofagia  
por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 en  
células endoteliales  
transformadas por vGPCR

## INTRODUCCIÓN

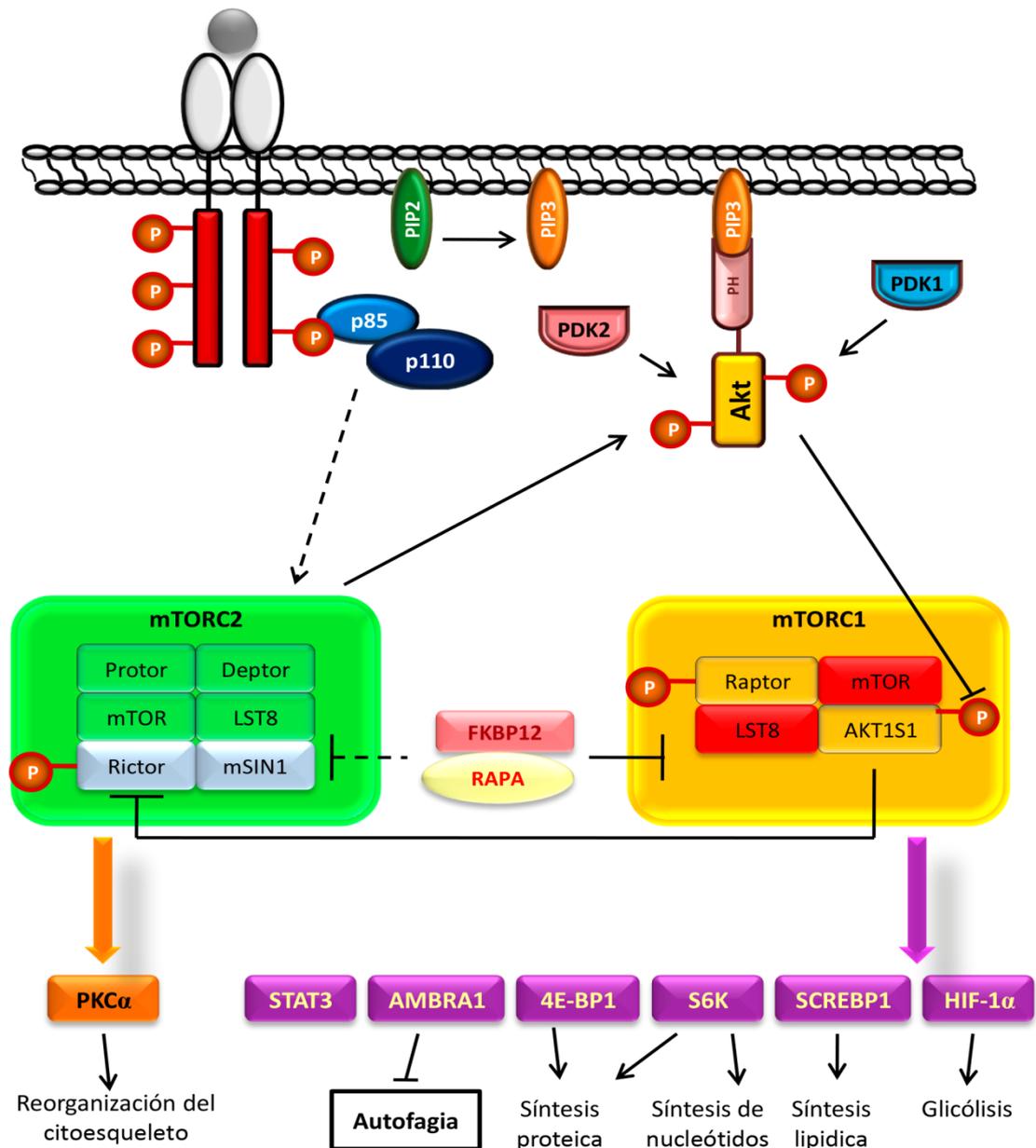
La autofagia es un proceso metabólico de autodegradación de los componentes intracelulares, tales como proteínas y orgánulos, y es importante para mantener el metabolismo y la homeostasis celular. Los bajos niveles de autofagia basal previenen la acumulación gradual de proteínas y orgánulos dañados en tejidos que resultan tóxicos con el paso del tiempo (White, 2015). Existen varios tipos de autofagia, cada uno implica el suministro de carga intracelular a los lisosomas para su degradación. La forma predominante de la autofagia, la macroautofagia, se caracteriza por englobar compuestos citoplasmáticos en una estructura de doble membrana, denominada autofagosoma, que se unirá a lisosomas para realizar la degradación enzimática de dichos compuestos. Se ha observado que, defectos en el buen funcionamiento de este proceso metabólico pueden llevar al desarrollo de diferentes enfermedades, tales como enfermedad hepática, neurodegeneración, enfermedad de Crohn, síndrome metabólico y cáncer (Rabinowitz and White, 2010). La autofagia cumple un rol dual en el desarrollo del cáncer contribuyendo tanto a la promoción de la supervivencia celular como a la muerte de acuerdo al contexto en el que se encuentren las células (Rosenfeldt and Ryan, 2011). La autofagia se divide en etapas mecánicamente distintas que incluyen; la inducción, reconocimiento y selección del material a degradar, la formación de los autofagosomas, la fusión de éstos a lisosomas y la descomposición enzimática de los componentes celulares con la consecuente liberación de los productos degradados al citosol (He and Klionsky, 2009). En células normales mTOR (mammalian Target of Rapamycin) es el principal regulador de la inducción de la autofagia. En respuesta a variaciones en la cantidad y disponibilidad de nutrientes, factores de crecimiento y aminoácidos se activa la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR la cual conduce a la supresión de la autofagia con el consecuente aumento en la proliferación celular (Chen and Karantza-Wadsworth, 2009). Existen varios inductores de autofagia que operan en general activando cascadas de transducción de señales que resultan en la inhibición del complejo 1 de mTOR (Inoki et al., 2012; Laplante and Sabatini, 2012). Entre otros efectos, esto permite la activación de proteínas que son cruciales en el proceso de formación de los autofagosomas, como ULK-1, ATG13 y

BECN1 (Galluzzi et al., 2015; Nazio et al., 2013). Algunos miembros de la familia Bcl-2, como Bcl-2 o Bcl-xL son conocidos inhibidores de los procesos apoptóticos pero, recientemente, se ha demostrado que también pueden actuar como inhibidores de la autofagia. En este mecanismo, BECN1 interactúa a través de su dominio BH3 con miembros de la familia Bcl-2, dicha interacción permitiría interrumpir la autofagia asociándose y separando el complejo BECN1-VPS34, necesario para la formación del fagóforo (Into et al., 2012; Marquez & Xu, 2012). Por tanto, BECN1 es un nexo importante entre la autofagia y la muerte celular programada (He and Levine, 2010). El posterior crecimiento de la membrana aislada para dar lugar a la elongación y expansión del fagóforo depende de dos sistemas de conjugación de proteína ATG. El primero está mediado por la interacción de ATG12, ATG5 y ATG16L1, que junto con ATG7, forman un complejo multimérico que activa al segundo sistema. El segundo culmina con la lipidación de las proteínas ATG8, de las cuales la más importante en el proceso de autofagia es LC3. Pro-LC3 se transforma primero en su forma madura LC3-I y posteriormente se conjuga con el lípido fosfatidil-etanolamina (PE). EL nuevo conjugado PE-LC3-I, también denominado LC3-II, se une fuertemente a las membranas autofagosomales y permite la fusión de las membranas lipídicas. Por tanto, la formación del autofagosoma está regulado por al menos tres complejos moleculares: el sistema de conjugación LC3 y la regulación de los complejos ULK1 y BECN1 (Into et al., 2012). Posteriormente, el adaptador p62/SQSTM1 interacciona con LC3 permitiendo la entrada de cargas ubiquitinadas en el interior del autofagosoma (Pankiv et al., 2007) y los autofagosomas se unen a lisosomas formando un orgánulo llamado autolisosoma, delimitado por una membrana única. Los lisosomas poseen enzimas capaces de degradar el material que se ha internalizado. Al final del proceso, el autolisosoma lleva en su interior productos de la degradación de las moléculas capturadas (Into et al., 2012) (**Figura II-A**).



**Figura II-A. Activación y desarrollo de la autofagia.** La activación de la autofagia se inicia con la inactivación del eje PI3K/Akt/mTOR y segregación progresiva del material citoplasmático por estructuras de doble membrana, el fagóforo. La iniciación y elongación del fagóforo tiene lugar por la formación de los complejos ULK1 y BECN1. Cuando el fagóforo se cierra, es denominado autofagosoma y presenta en su superficie moléculas de LC3-II. La fusión de autofagosomas con los lisosomas, genera el autolisosoma donde se produce la degradación de la carga autofagosómica. Adaptado de Galluzi y col. (Galluzi et al., 2015).

Las fosfatidilinositol 3 quinasas (PI3Ks) constituyen una familia de quinasas caracterizadas por su capacidad de fosforilar el grupo hidroxilo (OH-) de la posición 3' del anillo inositol de moléculas llamadas fosfatidilinositol, para generar el segundo mensajero fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>). La activación de receptores tirosina quinasa da como resultado la producción de PIP<sub>2</sub> y PIP<sub>3</sub> por PI3K en el lado interno de la membrana plasmática. Akt interactúa con estos fosfolípidos, provocando su translocación a la membrana interna, donde es fosforilada y activada por PDK1 y PDK2. La proteína Akt activada modula la función de numerosos sustratos implicados en el crecimiento y proliferación celular (Porta et al., 2014). mTOR es regulada por diversas señales metabólicas que desencadenarán la activación de Akt con la consecuente fosforilación de esta proteína localizada en el citoplasma celular formando los complejos mTORC1 y mTORC2. El complejo mTORC1 está compuesto por mTOR, una proteína regulatoria asociada a mTOR denominada Raptor, la subunidad LST8, deptor y un sustrato de Akt rico en prolina, Akt1S1. El complejo mTORC2 se caracteriza por poseer un dominio insensible a la rapamicina denominado Rictor, una proteína quinasa activada por estrés mSIN1, protor, deptor y LST8 (Laplante and Sabatini, 2012). mTORC1 integra señales de crecimiento que reflejan la disponibilidad de nutrientes y energía para promover la proliferación celular cuando las condiciones son favorables, o la autofagia, cuando no lo son. mTORC2, por su parte, promueve la supervivencia activando a Akt (**Figura II-B**) (Perl, 2016). En los últimos años, se ha demostrado que los componentes de la vía PI3K/Akt/mTOR se encuentran, con frecuencia, alterados en diferentes tipos de cáncer humanos (LoPiccolo et al., 2008). Existe evidencia que indica que el 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> es capaz de desencadenar la autofagia como parte de su mecanismo de acción. Wang y colaboradores demostraron que el 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> induce la autofagia en células de leucemia mieloide humanas regulando positivamente la expresión de BECN1 e inhibiendo la fosforilación de mTOR (Wang et al., 2008). Además, en cáncer de mama, se evidenció que el 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> estimula la activación de procesos autofágicos y en un grado mayor cuando la expresión del VDR fue bloqueada; sugiriendo que el VDR actúa como un represor constitutivo de los procesos autofágicos (Tavera-Mendoza et al., 2017).

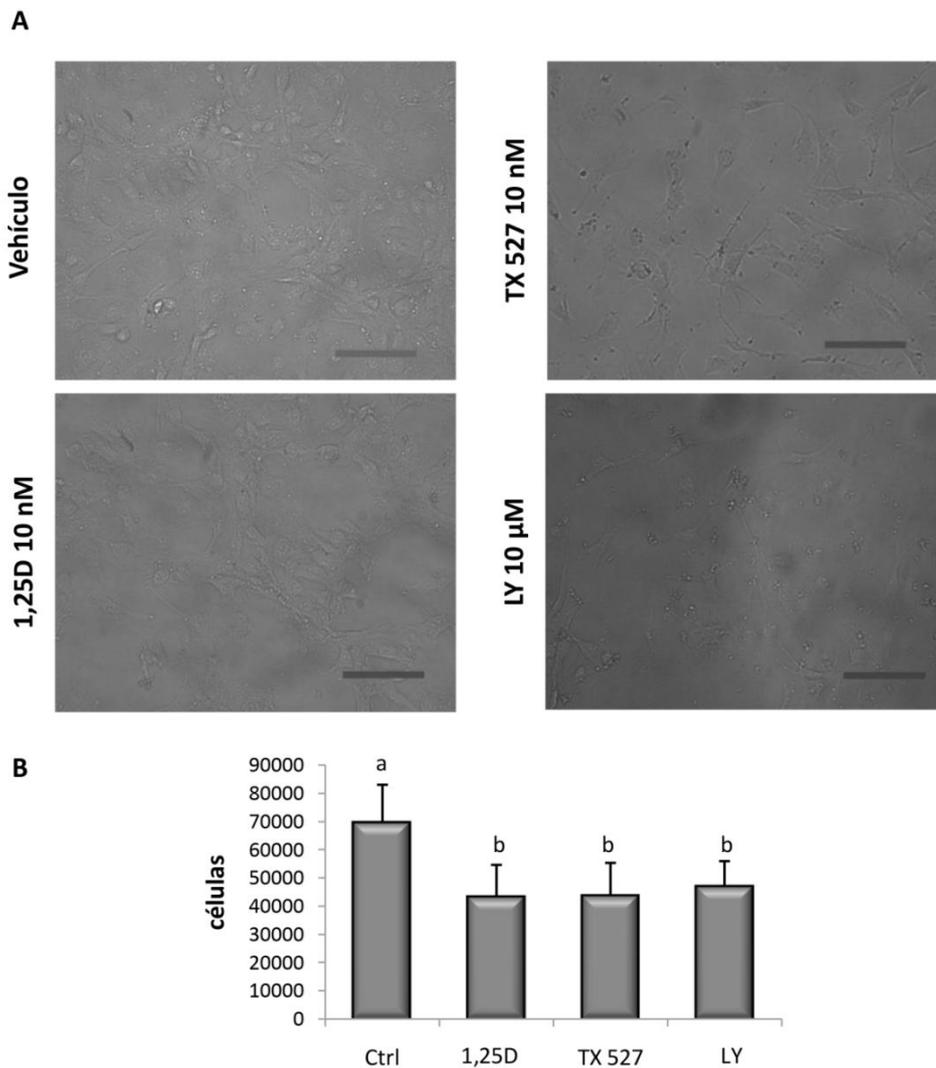


**Figura II-B. Activación de la vía PI3K/Akt/mTOR.** La activación de los receptores tirosina quinasa localizados en la membrana plasmática da como resultado la autofosforilación y como consecuencia la activación de sus residuos de tirosina. La proteína PI3K se recluta a la membrana plasmática para unirse a los residuos de fosfotirosinas presentes en la cara citoplasmática del receptor y activarse. Las proteínas PDKs fosforilan a Akt en sus residuos serina (S473) y treonina (T308) activándola. Akt modula la función de numerosos sustratos implicados en la regulación de la supervivencia, progresión del ciclo celular y el crecimiento celular (Vara et al., 2004). Akt regula la fosforilación de mTOR, el cual se encuentra en el citoplasma formando dos complejos (mTORC1 y mTORC2), que regulan diferentes procesos celulares, entre ellos la autofagia. Adaptado de Perl (Perl, 2016).

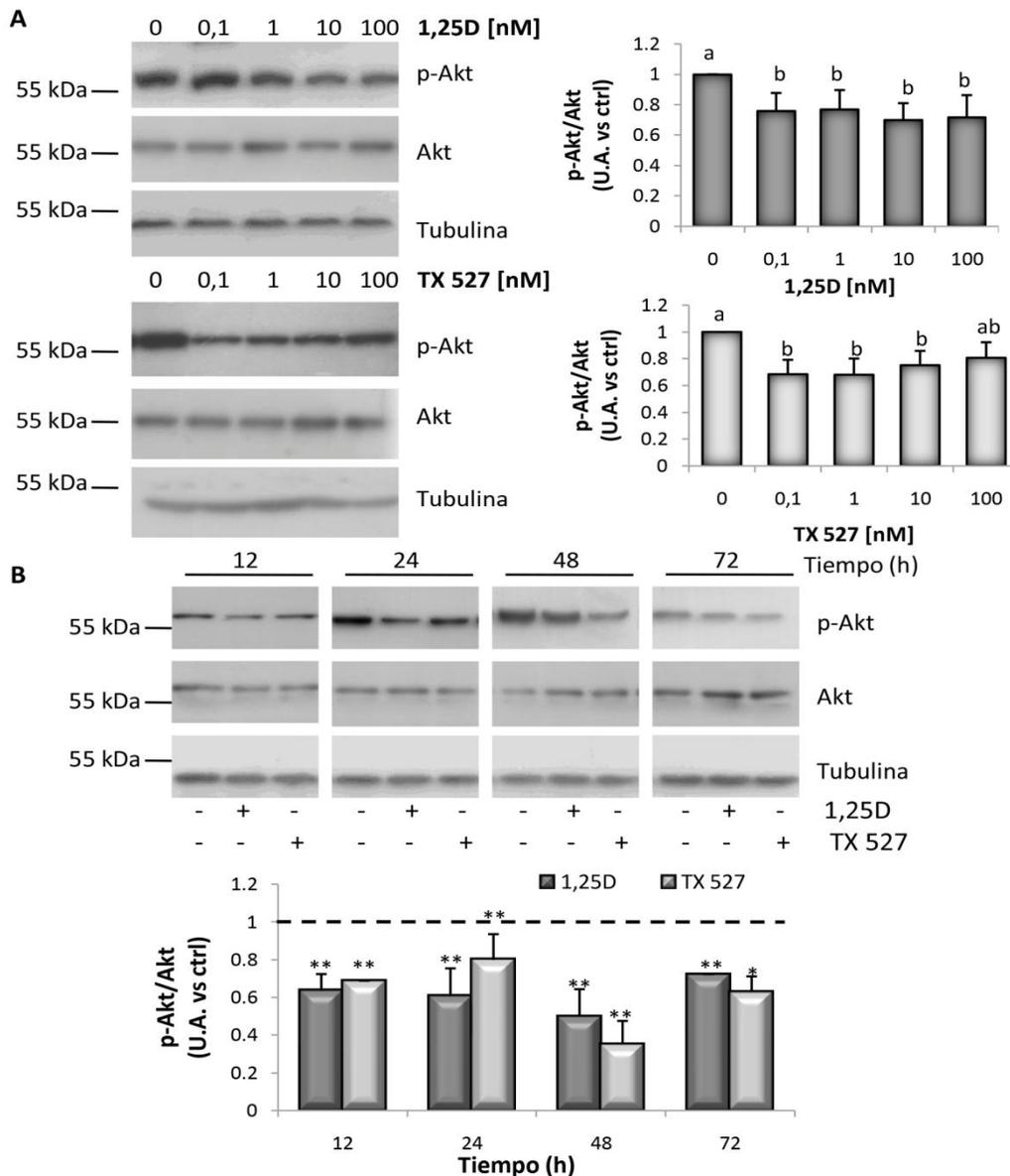
## RESULTADOS

### *El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y su análogo menos calcemiante TX 527, ejercen sus efectos anti-proliferativos por un mecanismo que depende de la inactivación de Akt*

La vía PI3K/Akt/mTOR representa uno de los mecanismos oncogénicos más destacado activado por el vGPCR, evento que ha sido revelado por modelos animales de sarcoma de Kaposi (Montaner et al., 2001; Sodhi et al., 2004, Sodhi et al., 2006). A su vez, en modelos celulares, Martin y colaboradores, reportaron que la expresión de vGPCR en células endoteliales estimula potentemente a Akt (pAkt S473) y mTOR, evento acompañado de cambios morfológicos, con aumento del tamaño celular y mayor supervivencia de las células tras la privación de factores de crecimiento (Martin et al., 2011). En este trabajo de tesis, se investigó si el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o el análogo TX 527, ejercen sus efectos anti-proliferativos a través de la regulación de Akt en células endoteliales transformadas por el vGPCR. Para ello, las células vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 o 10  $\mu\text{M}$  de LY294002 (inhibidor PI3K/Akt) o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas (**Figura II-1**). Finalizado el tratamiento, se tomaron micrográficas de cada condición en un microscopio de contraste de fases (**Figura II-1A**) y luego las células se tripsinizaron y contaron en una cámara de Neubauer (**Figura II-1B**). Los resultados mostraron una disminución significativa en el número de células vGPCR en presencia de LY294002, efecto que fue acompañado por cambios morfológicos en las células, de manera similar al  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527, presumiendo que la inhibición de Akt inhibe la proliferación. Para evaluar esta posibilidad, se estudió el estado de fosforilación de Akt como medida de su actividad en estudios dosis y tiempo respuesta (**Figura II-2**). En primer lugar, las células se trataron con concentraciones crecientes de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 (0,1-100 nM) o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas; luego, los niveles proteicos de Akt y su estado de fosforilación se analizaron por Western blot. Los resultados en el panel **II-2A** muestran que ambos compuestos provocaron una disminución significativa en la fosforilación de Akt sin modificar los niveles de expresión proteica de manera dependiente de la dosis.



**Figura II-1. El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 disminuyen la proliferación de las células vGPCR por un mecanismo que involucra a Akt.** Las células vGPCR se sembraron y se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) o 10  $\mu\text{M}$  de LY294002 (LY) durante 48 horas. **A)** micrografías representativas obtenidas por microscopía de contraste de fase, barra: 30  $\mu\text{m}$ , magnificación 200x. **B)** Las células se contaron en cámara de Neubauer y los resultados, de al menos tres experimentos independientes, se presentaron en un gráfico de barras. El análisis estadístico se realizó primeramente por ANOVA simple, seguido de la prueba de Bonferroni. Las diferencias significativas se indican con diferentes letras ( $p < 0,01$ ).

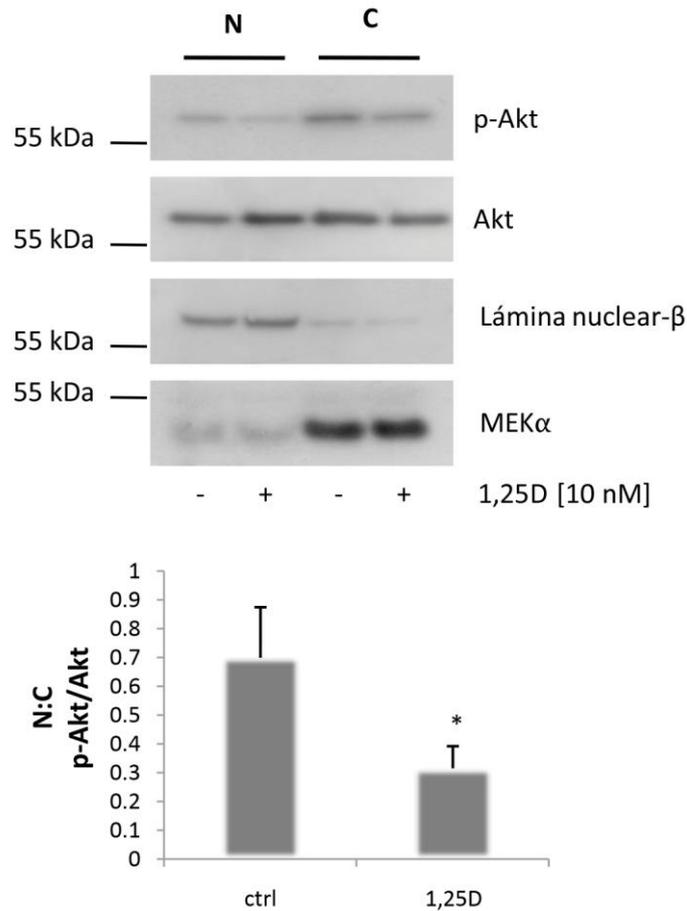


**Figura II-2. El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 disminuyen la fosforilación de Akt de manera dependiente de la dosis y el tiempo.** Las células vGPCR se trataron con **A)** concentraciones crecientes de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o TX 527 (0-100 nM), o vehículo (0,01% de etanol) por 48 horas o bien **B)** 10 nM de 1,25D o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) a diferentes tiempos (12-72 h). La fosforilación de Akt y su nivel proteico total se analizó por Western blot, se empleó Tubulina como control de siembra. En **A** y **B** se muestra un blot representativo de al menos tres experimentos independientes y la cuantificación en gráficos de barra. El análisis estadístico en **A** se realizó por ANOVA-simple seguido de la prueba de Bonferroni. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones con un  $p < 0,01$ ; y en **B** se comparó el efecto de cada tratado (1,25D o TX 527) con el control a cada tiempo por la prueba t de Student (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

En segundo lugar, las células vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) durante diferentes tiempos (12-72 h). Los resultados que se muestran en el panel **II-2B**, revelan que la fosforilación de Akt disminuyó significativamente a partir de las 12 horas de tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 siendo máximo su efecto a las 48 horas.

### ***El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibe la translocación de Akt fosforilada al núcleo***

Para ahondar en el mecanismo de acción del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sobre Akt, se investigó si la disminución en la fosforilación de Akt afecta a su localización subcelular. Para ello, las células vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas. Luego, las células se colectaron y homogenizaron en buffer TES y se realizó un fraccionamiento subcelular para obtener la fracción nuclear (**N**) y el citosol (**C**). Los niveles de Akt fosforilada y total se analizaron por Western blot y la pureza de las fracciones se determinó a través de marcadores específicos, MEK $\alpha$  para citosol y Lámina nuclear- $\beta$  para núcleo. Los resultados en la **Figura II-3** muestran que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  provocó una disminución significativa en el núcleo de la forma fosforilada de Akt con respecto al citosol sugiriendo la atenuación de la actividad de Akt en el núcleo.



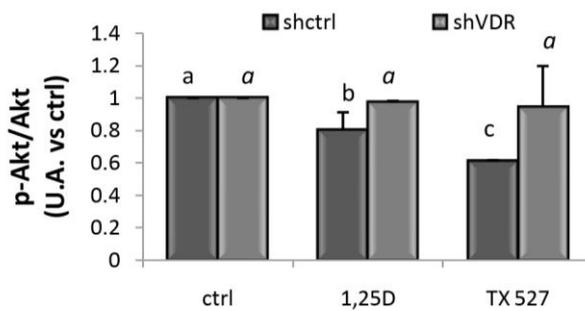
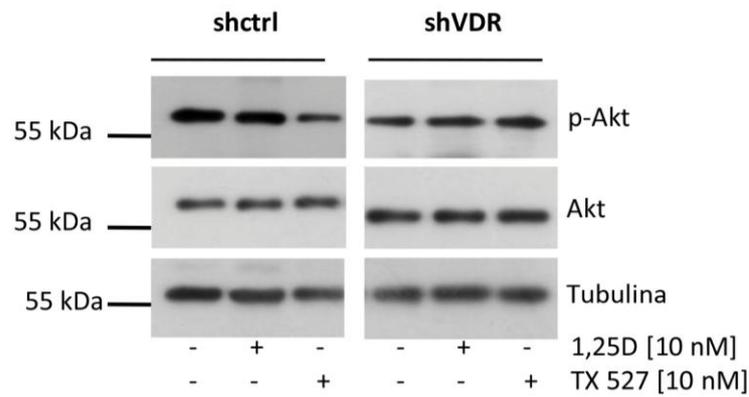
**Figura II-3. Localización subcelular de Akt por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en células vGPCR.** Las células vGPCR se cultivaron y trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas. Las células se colectaron en buffer TES y se realizó un fraccionamiento subcelular para obtener la fracción nuclear (N) y el citosol (C). Los niveles de Akt fosforilada y total y marcadores específicos para cada fracción, MEK $\alpha$  para C y Lamina nuclear- $\beta$  para N, se analizaron por Western blot. Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes y la cuantificación representada como un gráfico de barras en donde se expresa el radio de p-Akt en N con respecto al C (N:C). El análisis estadístico se realizó por la prueba t de Student donde se evaluó las diferencias significativas entre el 1,25D y el control (\* $p < 0,05$ ).

### ***El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y TX 527 disminuyen la activación de Akt por un mecanismo que depende del VDR***

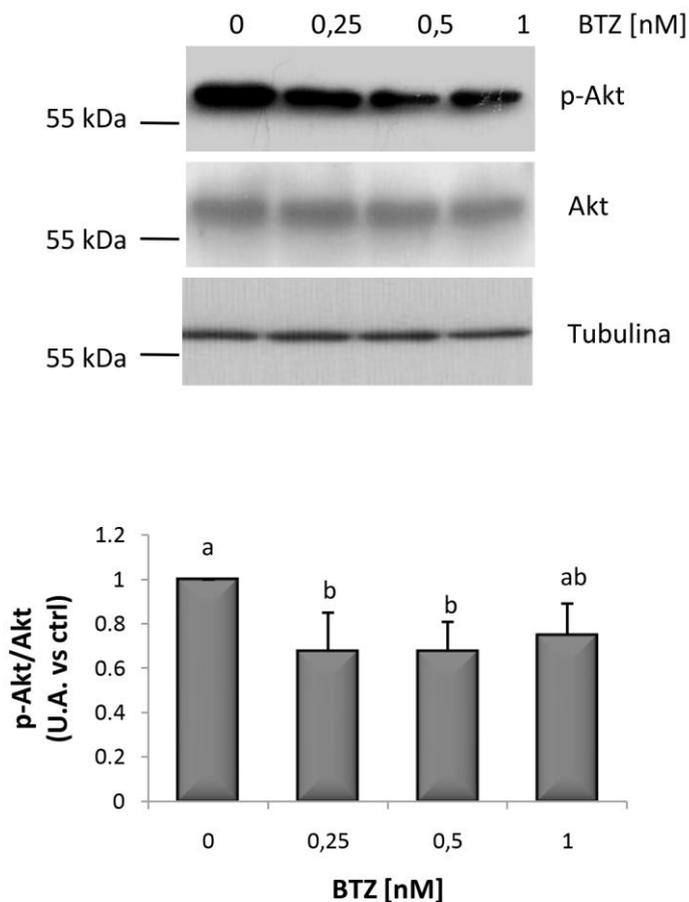
Como se mencionó previamente, el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ejerce sus efectos a través de un mecanismo genómico, regulando la transcripción de genes, y uno no genómico de respuestas rápidas iniciadas en la membrana (Norman, 2008). A continuación, se investigó si el silenciamiento del VDR afecta a la activación de Akt. Para ello, se utilizó la línea celular vGPCR-shVDR, donde la expresión del VDR se encuentra silenciada, o la línea control, vGPCR-shctrl. Ambas líneas celulares se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas (**Figura II-4**). Como anteriormente se observó, el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y su análogo TX 527, disminuyeron significativamente la fosforilación de Akt luego de 48 horas de tratamiento, mientras que cuando se silenció la expresión del VDR, la fosforilación de Akt no se vio afectada por los agonistas. Estos resultados sugieren la participación del VDR en la regulación de la fosforilación de Akt por el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527.

### ***De manera similar a los agonistas del VDR, el Bortezomib disminuye la fosforilación de Akt en células vGPCR***

Resultados de nuestro grupo han revelado que la inhibición de la vía NF- $\kappa$ B por Bortezomib, cumple una función importante en la regulación del ciclo celular (González-Pardo et al., 2013). Esta regulación podría atribuirse, entre otras cosas, a una inhibición en la actividad de Akt. Para evaluar esta posibilidad, las células vGPCR se trataron con concentraciones crecientes de Bortezomib (0,25-1 nM) o vehículo (0,1% de DMSO) durante 24 horas y luego el estado de fosforilación de Akt se evaluó por Western blot (**Figura II-5**). Los resultados indican que el Bortezomib indujo una disminución en la fosforilación de Akt en forma dependiente de la dosis, sin embargo, a mayor concentración, 1 nM, la fosforilación de Akt tendió a aumentar, sugiriendo probablemente que Akt se activa con el fin de activar la supervivencia celular y contrarrestar la apoptosis inducida por Bortezomib.



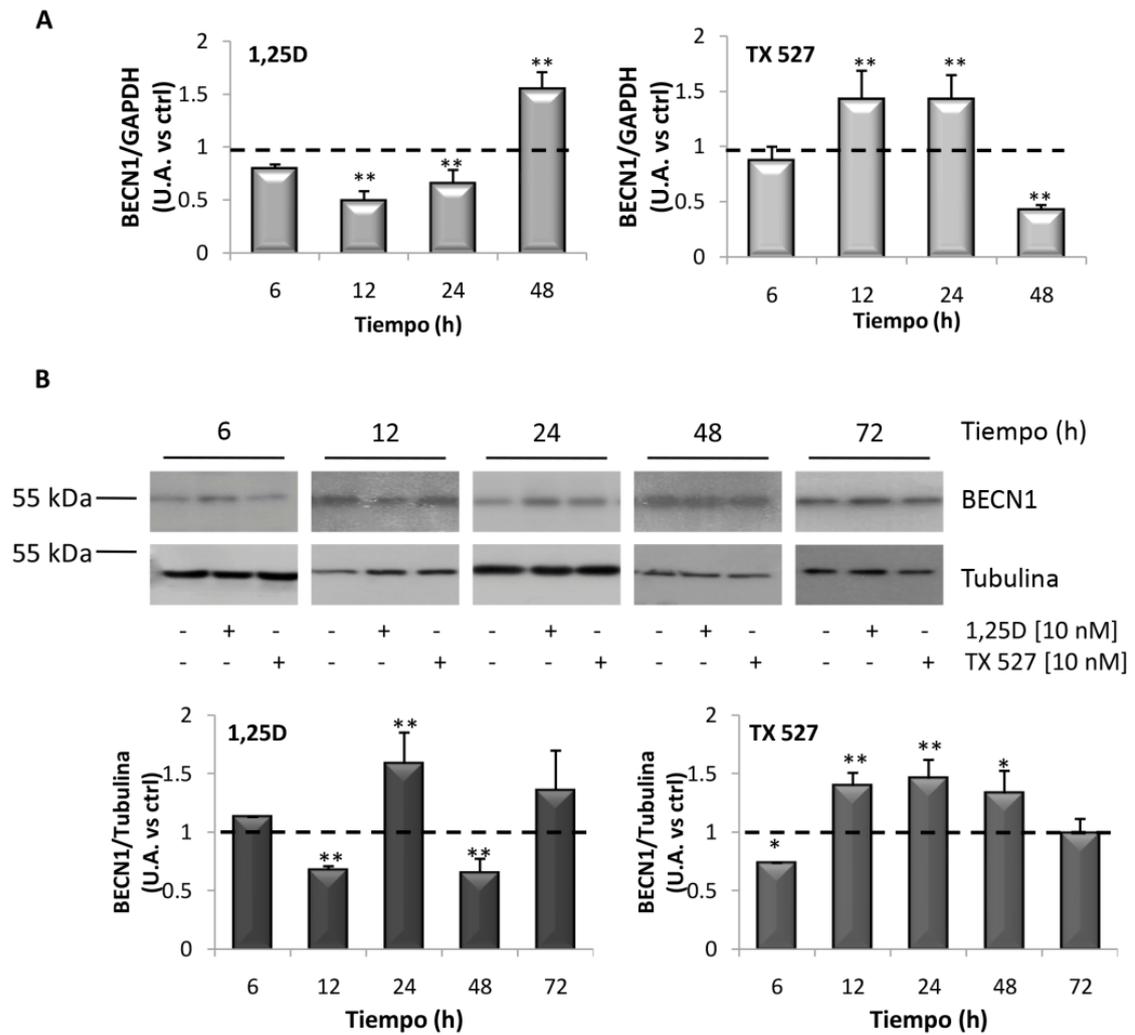
**Figura II-4. Dependencia del VDR en la fosforilación de Akt por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527.** Las células vGPCR-shctrl (shctrl) y vGPCR-shVDR (shVDR) se cultivaron y trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas. Se evaluaron los niveles de Akt fosfoforilada y total por Western blot y se empleó Tubulina como control de siembra. Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes y la cuantificación representada en un gráfico de barras. Las diferencias estadísticas se analizaron por ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni. Las diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura II-5. El Bortezomib provoca una disminución en la fosforilación de Akt.** Las células vGPCR se trataron con concentraciones crecientes de Bortezomib (BTZ; 0,25-1 nM) o vehículo (0,1% de DMSO) durante 24 horas. La fosforilación de Akt y los niveles totales de Akt se analizaron por Western blot empleando Tubulina como control de siembra. Se muestra un blot representativo y la cuantificación de cuatro experimentos independientes en un gráfico de barras. Las diferencias estadísticas entre las condiciones se analizaron por ANOVA simple, seguido de la prueba de Bonferroni. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

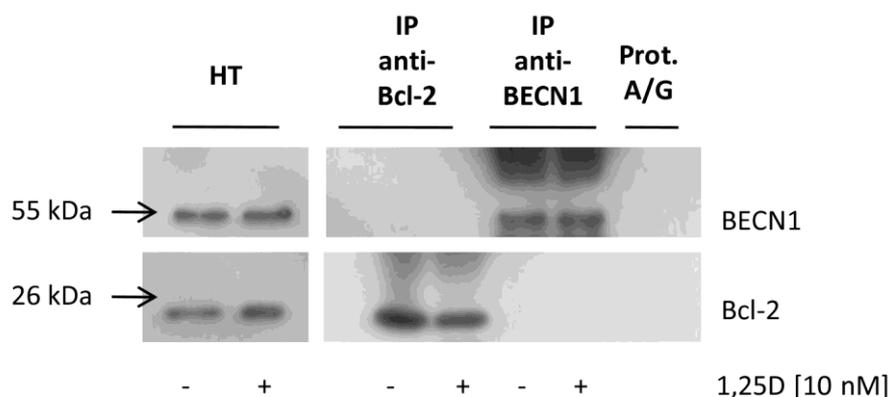
### ***El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y TX 527 inducen cambios en la expresión de BECN1***

En base a reportes previos, se evaluó si BECN1 es regulada por los agonistas del VDR. Para ello, las células vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) a diferentes tiempos (**Figura II-6**). En primer lugar, se analizaron los niveles de ARNm de BECN1 en estudios tiempo respuesta (6-48 h). Para ello, se extrajo el ARN total y se retro transcribió ADNc como se mencionó anteriormente; la expresión de BECN1 se analizó por qRT-PCR (**Figura II-6A**). El tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  provocó una disminución significativa de BECN1 a las 12 y 24 horas, mientras que a 48 horas se vio un aumento altamente significativo. Si bien, el TX 527 provocó un aumento significativo de BECN1 a las 12 y 24 horas, también indujo una disminución significativa a las 48 horas. En segundo lugar, se investigó si los cambios en la expresión del ARNm se traducen en cambios en los niveles proteicos de BECN1. Para ello, las células vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) durante 12 a 72 horas (**Figura II-6B**). La cuantificación de los resultados obtenidos reveló que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  indujo un aumento significativo en los niveles proteicos de BECN1 a 24 horas y una disminución a 12 y 48 horas. El TX 527, por su parte, indujo un aumento significativo en BECN1 en forma dependiente del tiempo entre las 12 a 48 horas. La diferencia observada en la respuesta de BECN1 al tratamiento con los agonistas podría explicarse en base a observaciones previas que revelan un potencial inhibitorio mayor del TX 527 con respecto al  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en la proliferación de las células vGPCR (Gonzalez-Pardo et al., 2010).



**Figura II-6. El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 inducen cambios en la expresión de BECN1.** Las células vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) durante diferentes tiempos para evaluar la expresión génica (6-48 h) y proteica (12-72 h) de BECN1. **A)** Se aisló el ARN total y a partir del ADNc se evaluó la expresión de BECN1 y los valores obtenidos se normalizaron con GAPDH como se muestra en el gráfico de barras. **B)** Los niveles proteicos de BECN1 y Tubulina, utilizada como control de siembra, se analizaron por Western blot. Se muestra un blot representativo y la cuantificación de al menos tres experimentos independientes en gráficos de barras. Las diferencias significativas entre el 1,25D o TX527 y su respectivo control a cada tiempo se analizaron por la prueba t de Student (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

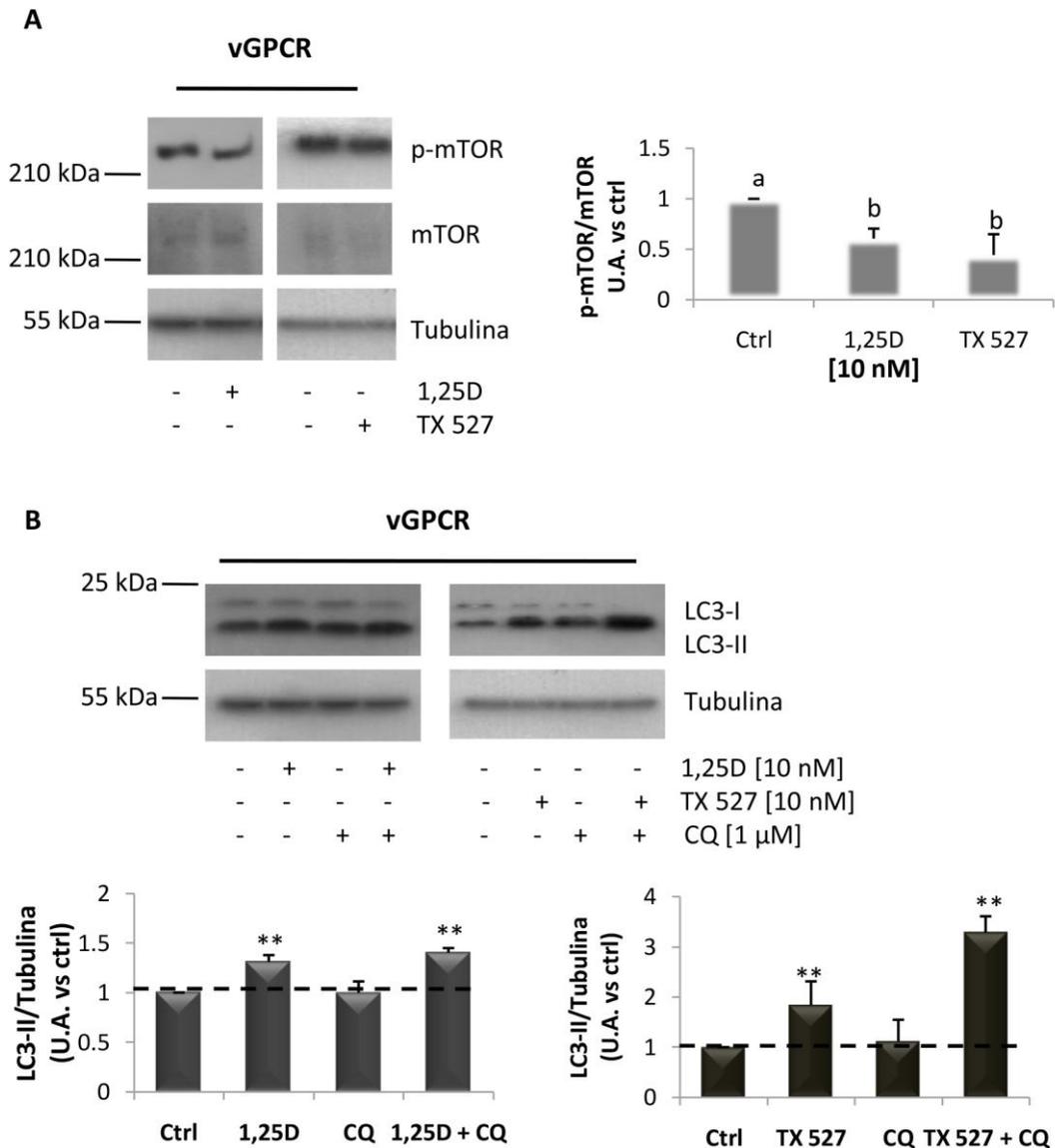
Como se mencionó previamente, la asociación entre BECN1 y miembros de la familia Bcl-2 con dominio BH3 pueden formar un complejo inhibitorio que favorece a la supervivencia celular e inhibe la autofagia (Into et al., 2012). A continuación, se evaluó si Bcl-2 interactúa con BECN1 como parte del mecanismo de acción de supervivencia desencadenado en las células vGPCR por co-inmunoprecipitación. Las células vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o vehículo (0,01% de etanol) durante 16 horas. Se eligió este tiempo de tratamiento en base a resultados previos donde se evidenció un aumento en la actividad apoptótica a partir de las 24 horas de exposición al agonista (González-Pardo et al., 2014) y al supuesto que la autofagia se dispararía como un mecanismo complementario a la apoptosis. Finalizado el tratamiento, las células se colectaron en buffer de co-inmunoprecipitación y la asociación de BECN1 con Bcl-2 se analizó en los inmunocomplejos por Western blot. Los resultados en la **Figura II-7** muestran que en condiciones basales no hay asociación de Bcl-2 con BECN1 y no se observaron cambios luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .



**Figura II-7. BECN1 y Bcl-2 no interactúan en células vGPCR.** Las células vGPCR fueron tratadas con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) durante 16 horas. Se colectaron las células en buffer de co-inmunoprecipitación. 250  $\mu\text{g}$  de proteínas totales se incubaron con anti-Bcl-2 o bien con anti-BECN1 durante cinco horas en agitación; luego se agregaron 25  $\mu\text{l}$  de proteína A/G como se describió en métodos. Finalmente, los niveles de expresión proteica de Bcl-2 y BECN1 se evaluaron por Western blot. Se muestra un blot representativo de tres experimentos realizados de manera independiente.

### ***El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y TX 527 inhiben la fosforilación de mTOR e inducen la autofagia***

Fleet y colaboradores reportaron que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  suprime la activación de mTOR a través de un mecanismo que involucra la asociación de BECN1 con PI3K en células de leucemia, HL-60, contribuyendo al desarrollo de una respuesta autofágica (Fleet et al., 2012). A continuación, se evaluó el estado de fosforilación de mTOR como medida de su actividad y los niveles de LC3-II como marcador de autofagia. Para ello, las células vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas (**Figura II-8A**) o bien, treinta minutos previos a la finalización del tratamiento, se adicionó cloroquina (1  $\mu\text{M}$ , CQ) como inhibidor del flujo autofágico al disminuir la fusión autofagosoma-lisosoma (Mauthe et al., 2018) (**Figura II-8B**). Los resultados en el panel **II-8A** muestran que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 disminuyeron la fosforilación de mTOR, sin provocar cambios en los niveles totales de expresión. En el panel **II-8B**, se observa que ambos agonistas provocaron un aumento significativo en la expresión de LC3-II y por lo tanto la autofagia. Debido a que la acumulación de autofagosomas resulta tóxica para las células (Fields et al., 2015; Khoh-Reiter et al., 2015), se postula que la inducción de la formación de autofagosomas por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 y luego el bloqueo de la degradación de los autofagosomas con cloroquina, resultaría perjudicial para la supervivencia de las células vGPCR, permitiendo observar un efecto mayor en la inducción de autofagia. En presencia de CQ, los niveles de LC3-II fueron comparables a la condición control y se observaron más elevados en presencia de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 (**Figura II-8B**).

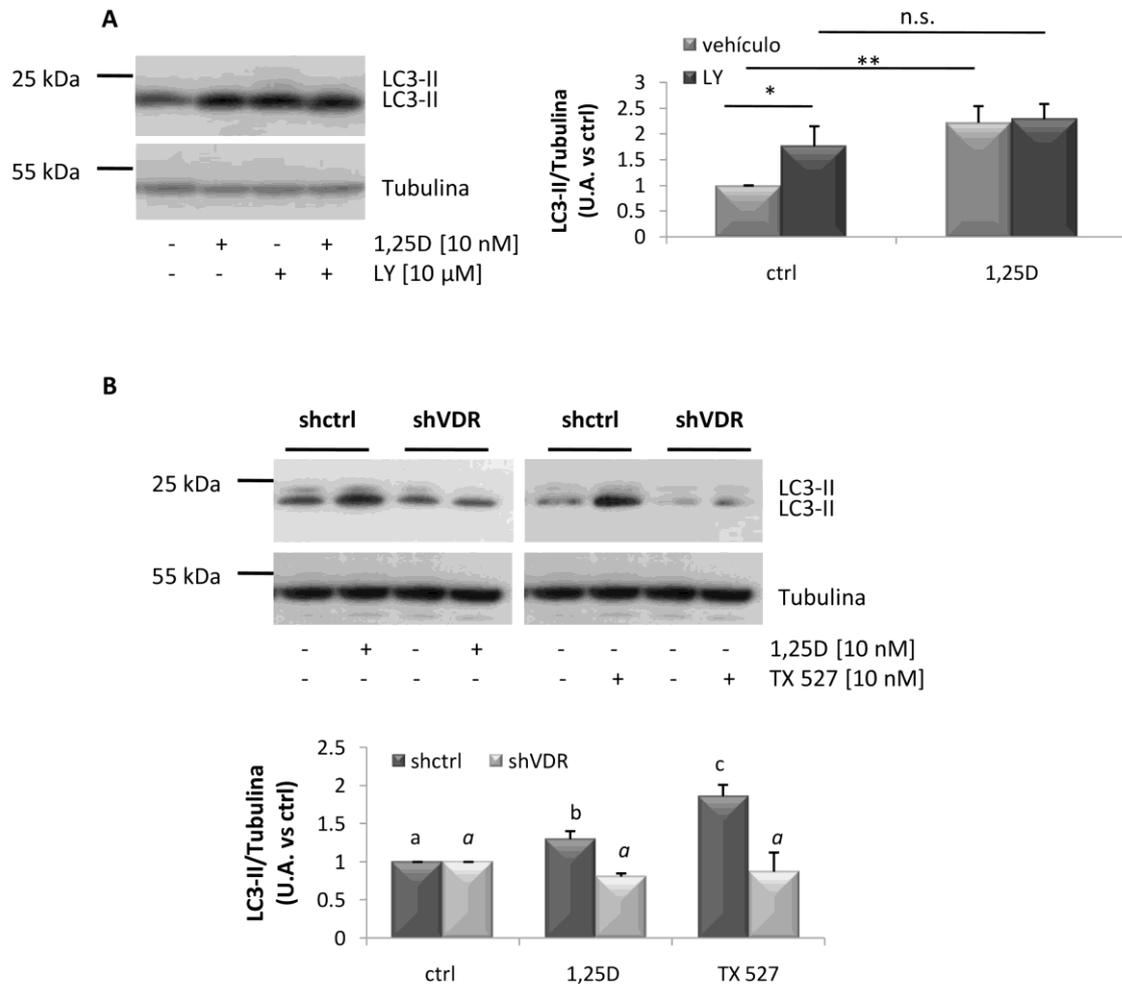


**Figura II-8.** El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 disminuyen la fosforilación de mTOR e inducen la autofagia en células vGPCR. Las células vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o TX 527 o vehículo (0,01 de etanol) durante 48 horas y treinta minutos previos a la finalización del tratamiento con 1,25D, se agregó 1  $\mu\text{M}$  de cloroquina (CQ). Los niveles proteicos de mTOR fosforilada y total (A) o LC3 (B) se analizaron por Western blot empleándose Tubulina como control de siembra. Se muestra un blot representativo y la cuantificación de tres experimentos independientes representada en gráficos de barras. Las diferencias significativas entre condiciones se evaluaron en A) mediante ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni ( $p < 0,05$ ) o B) por la prueba t de Student entre 1,25D o TX 527 y ctrl o bien CQ (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

### ***La inhibición de la vía PI3K/Akt/mTOR induce autofagia y es dependiente del VDR***

Con el fin de evaluar la participación del eje PI3K/Akt/mTOR en la autofagia desencadenada por el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , las células vGPCR se incubaron con 10  $\mu\text{M}$  de LY294002 (LY) o vehículo (0,01% de etanol) durante 15 minutos. Posteriormente, las células se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas y el marcador LC3 se evaluó por Western blot. La **figura II-9A** muestra que en presencia del inhibidor farmacológico LY, los niveles de LC3-II aumentaron significativamente y en forma comparable al tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Es más, en presencia de LY y  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  no se observó un mayor aumento en LC3-II por lo que se puede inferir que estarían actuando por la misma vía.

A su vez, se investigó si el VDR participa en la inducción de LC3-II por ambos agonistas, para ello, se silenció su expresión de manera estable como previamente se describió. Las células vGPCR-shVDR o vGPCR-shctrl se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas y los niveles proteicos de LC3 y Tubulina se analizaron por Western blot (**Figura II-9B**). Los resultados muestran un aumento significativo en la cantidad de LC3-II al tratar a las células con ambos agonistas, aumento que fue suprimido al silenciar el VDR.



**Figura II-9. La inhibición del eje PI3K/Akt/mTOR provoca un aumento en los niveles de LC3 en células vGPCR, por un mecanismo que depende de la expresión del VDR. A)** Las células vGPCR se incubaron con 10 μM de LY294002 (LY) o vehículo (0,01% de etanol) durante 15 minutos previos al tratamiento. Posteriormente, se trataron con 10 nM de 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas. Se evaluaron los niveles de expresión proteica de LC3 y Tubulina por Western blot. Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes, y la cuantificación representada en gráficos de barras. **En A)** las diferencias significativas entre pares de condiciones se evaluaron a través de la prueba t de Student (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, n.s.: no significativo). **En B)** las diferencias significativas entre el control (vehículo) y los agonistas se analizaron por ANOVA simple, seguido por la prueba de Bonferroni. Las diferencias significativas entre condiciones se indican con distintas letras (p < 0,05).

## DISCUSIÓN

La apoptosis y la autofagia son procesos evolutivamente conservados que regulan el destino celular. Ambos procesos son importantes para el desarrollo y fisiología normal de los tejidos y se ha observado que se encuentran regulados en una amplia gama de enfermedades. Estudios recientes demuestran que, a pesar de las marcadas diferencias entre ambos procesos, su regulación se encuentra íntimamente relacionada por lo que se ha comenzado a pensar en la apoptosis y autofagia como dos procesos que contribuyen para desencadenar la muerte celular, más que como procesos que actúan por separado (Thorburn, 2008). Es de conocimiento que la infección con KSHV induce la expresión de proteínas virales que contribuyen al desarrollo de las diferentes malignidades, se ha observado que vFLIP, por ejemplo, suprime la apoptosis y la autofagia favoreciendo de esta manera la supervivencia celular. Por otra parte, la infección con KSHV activa a mTOR, un regulador negativo de los procesos autofágicos, y una molécula importante para la modulación de la proliferación celular y angiogénesis (Mesri et al., 2010). La autofagia es inducida por varias formas de estrés celular incluyendo; inanición, hipoxia e infección, así como también puede ser inducida por fármacos utilizados en la terapia contra el cáncer y otras enfermedades (Høyer-Hansen and Jäätelä, 2008; Martin et al., 2011).

Numerosos estudios han demostrado que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  tiene la capacidad de inducir autofagia en diferentes tipos celulares. Estudios en células de linfoma y cáncer de mama, evidenciaron que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y el análogo sintético EB1089, presentan un efecto citotóxico desencadenando la muerte celular por un proceso independiente de caspasas caracterizado por un incremento en la actividad lisosomal (Høyer-Hansen et al., 2010). Sumado a esto, el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ha mostrado inducir la autofagia en diferentes tipos de cáncer, como por ejemplo, en leucemia mieloide y carcinoma de células escamosas de cuello (Tavera-Mendoza et al., 2006; Wang et al., 2008). Este efecto del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  no se limita a células cancerosas. Concentraciones en el orden picomolar del metabolito, han demostrado inducir la autofagia en monocitos primarios y macrófagos sugiriendo que dicho agonista podría estimular la autofagia en condiciones fisiológicas normales (Fabri and Modlin, 2009). En este trabajo de tesis se

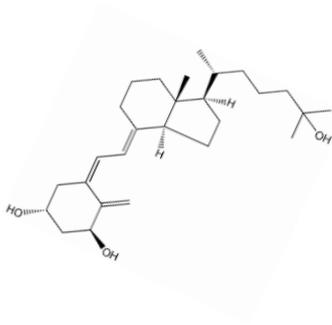
obtuvo evidencia que indica que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 inducen la autofagia en células que expresan el vGPCR. A su vez, la inhibición de la vía de señalización PI3K/Akt provocó la disminución en la proliferación celular de manera comparable a los agonistas del VDR. Como previamente se mencionó, Akt juega un rol crucial en el desarrollo del sarcoma de Kaposi (Sodhi et al., 2006, 2004). Explorando en el mecanismo de acción de ambos agonistas en la regulación de Akt, se determinó que ambos compuestos reducen el estado de fosforilación Akt, con su consecuente inactivación, de manera dependiente de la dosis y del tiempo. Es más, ambos compuestos disminuyeron la translocación de la forma fosforilada de Akt al núcleo. La regulación de la actividad de Akt por ambos agonistas mostró ser un evento regulado genómicamente a través de la participación del VDR. En sustento de estos resultados, hallazgos recientes en estudios *in vitro* e *in vivo* en un modelo de cáncer de mama, mostraron un rol activo del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en la inducción de la autofagia por un mecanismo que involucra la participación del VDR (Tavera-Mendoza et al., 2017). Similarmente a los agonistas del VDR, el Bortezomib, provocó una disminución en la fosforilación de Akt en forma dependiente de la dosis. En apoyo a este resultado, estudios en diferentes líneas celulares de hepatocarcinoma, demostraron que el Bortezomib disminuye la fosforilación y activación de Akt precediendo a la muerte celular por apoptosis (Chen et al., 2008).

BECN1 es una proteína que se encuentra expresada en muchos tejidos humanos, existe evidencia que sugiere que el factor de transcripción E2F y el NF- $\kappa$ B están involucrados en la regulación de su expresión (Kang et al., 2011). Esta proteína reguladora, principalmente de la inducción de la autofagia, puede interaccionar con proteínas de la familia Bcl-2, formando complejos con Bcl-xL y Bcl-2, que favorecen a la supervivencia celular (Fu et al., 2013). Los resultados obtenidos en este capítulo revelaron que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 regulan la expresión de BECN1 sin mostrar asociación con Bcl-2; lo que sugiere que BECN1 podría estar implicada en la formación de fagóforos y consecuente inducción de la autofagia. En apoyo con estos resultados, el compuesto EB1089, análogo sintético del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , demostró disminuir la proliferación celular en células de cáncer de mama (MCF-7) a través de la activación de vías apoptóticas y autofágicas con participación de BECN1 (Høyer-Hansen et al., 2005). Es más, como previamente se mencionó, el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , induce autofagia con

incremento en los niveles de BECN1 desencadenando la diferenciación de células de leucemia mieloide e inhibición de la apoptosis (Wang et al., 2008). En el mismo trabajo, se demostró que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  provoca la fosforilación de la proteína proapoptótica BAD, dando como resultado la disociación del complejo BAD/Bcl-xL y posterior asociación de BECN1 con Bcl-xL para suprimir de esta manera la apoptosis (Wang et al., 2008). En este trabajo de tesis, también se obtuvo evidencia que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 disminuyen la fosforilación de mTOR, e inducción de la autofagia por aumento del marcador LC3-II, evento que es desencadenado por inactivación de la vía Akt/mTOR. La inhibición del flujo autofágico con cloroquina, mostró un aumento mayor en los niveles de LC3-II por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527. Los niveles de LC3-II observados luego del tratamiento con cloroquina fueron comparables a los niveles basales de LC3-II, esta evidencia sugiere la presencia de una autofagia basal en las células vGPCR, proceso que contribuye a prevenir la muerte de células tumorales (Costas and Rubio, 2017). La inhibición farmacológica de PI3K mostró un aumento en los niveles de LC3-II comparable al observado al tratar células vGPCR con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , estos resultados en conjunto con la regulación observada sobre Akt y mTOR, nos permite inferir que la autofagia inducida por el agonista es iniciada en la membrana citoplasmática por inactivación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR. Estudios *in vivo* demostraron que el tratamiento con Hesperidina atenúa las lesiones del miocardio producidas por isquemia/reperfusión al suprimir la autofagia a través de la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR (Li et al., 2018).

## **CONCLUSIÓN**

En conjunto, estos resultados indican que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 inducen la autofagia a través de la inactivación del eje PI3K/Akt/mTOR por un mecanismo dependiente del VDR con participación de BECN1. La interrupción del flujo autofágico con cloroquina potenció la autofagia provocada por los agonistas sugiriendo que la inhibición del flujo autofágico, mediante acidificación autofagosómica contribuiría a disminuir aun más la proliferación celular debido a un efecto citotóxico mayor.



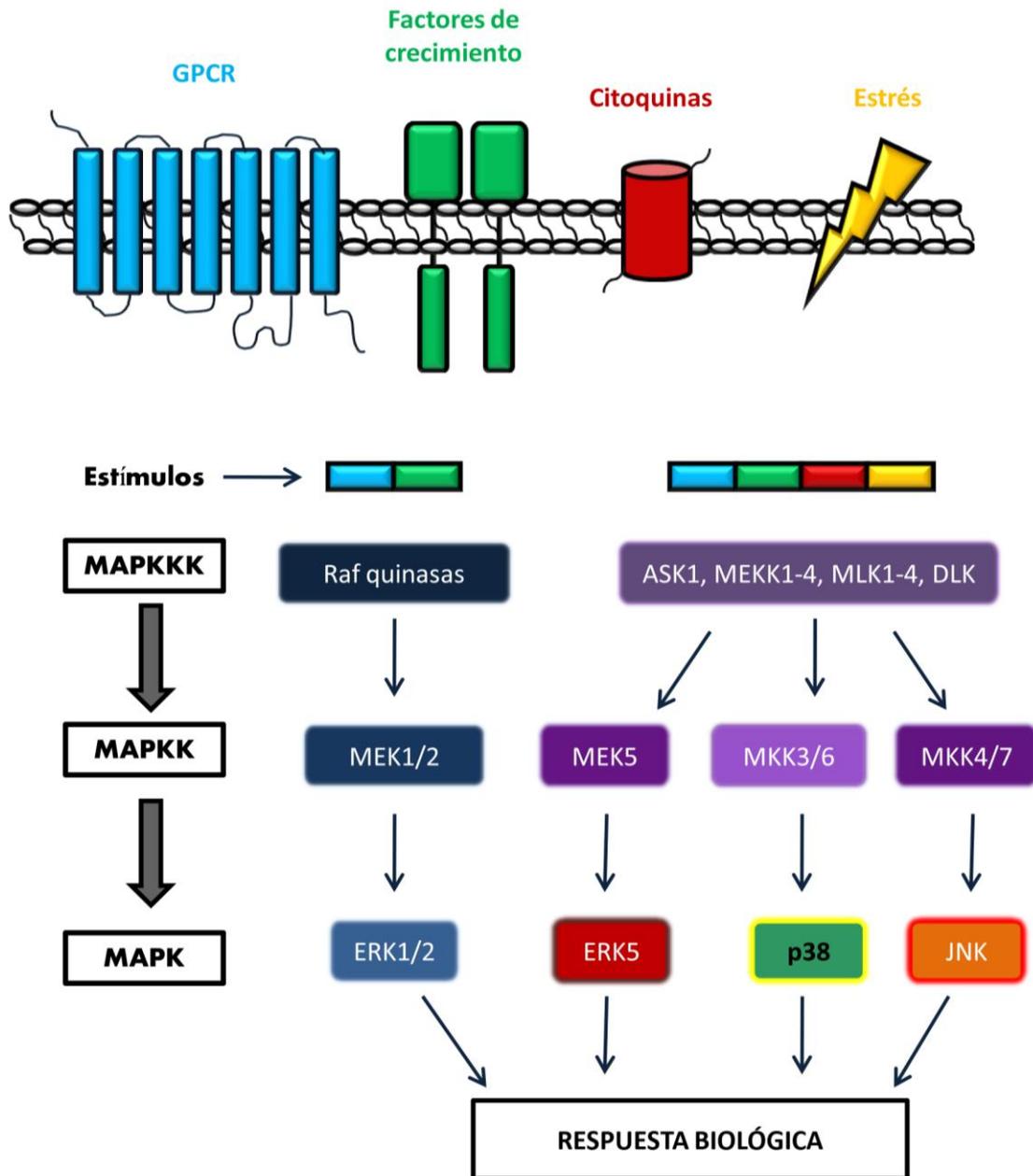
## CAPITULO III

Regulación y participación de  
las MAPKs en el mecanismo  
de acción del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y  
TX 527

## INTRODUCCIÓN

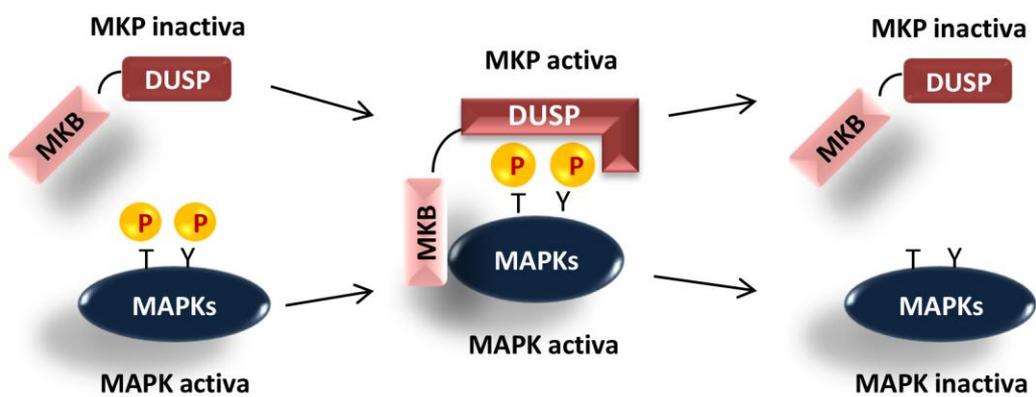
Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) se encuentran involucradas en la mayoría de las vías de transducción que regulan a las células eucarióticas. Todas las células eucarióticas poseen múltiples rutas de señalización que involucran a las proteínas MAPKs, lo que le permite a las células responder coordinadamente a múltiples estímulos (Cargnello and Roux, 2011). Las MAPKs de mamíferos pueden ser activadas por una gran variedad de estímulos que incluyen, hormonas, factores de crecimiento, citoquinas inflamatorias y condiciones de estrés ambiental, como por ejemplo, la radiación y lesiones isquémicas (Yang et al., 2013). Estos estímulos pueden actuar a través de diferentes familias de receptores de membrana, algunos de ellos acoplados a proteínas G (GPCR), receptores de citoquinas y receptores Serina/Treonina quinasa. La activación de las vías de las MAPKs coordinan diversos mecanismos celulares tales como la expresión génica, la maquinaria del ciclo celular, metabolismo celular, motilidad, supervivencia, apoptosis y diferenciación (Krishna and Narang, 2008). En mamíferos, se han caracterizado cuatro grupos de MAPKs; ERK (1/2), p38 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ), JNK (1/2 y 3) y ERK5 (Cossa et al., 2013) (**Figura III-A**). Las vías de señalización que involucran a las MAPKs son vías críticas para la supervivencia, diseminación y resistencia a la terapia farmacológica en diferentes tipos de cáncer (De Luca et al., 2012). Las vías que involucran a la quinasa regulada por señal extracelular, ERK1/2, es un nodo convergente de señalización que recibe numerosos estímulos, incluido el estrés metabólico interno, el daño en el ADN y alteraciones en los niveles proteicos, así como también la señalización externa de factores de crecimiento, interacciones célula-matriz e interacciones célula-célula (Roskoski, 2012; Yang et al., 2013). La alteración de genes responsables de la regulación del ciclo celular, la integridad del genoma y la supervivencia pueden conducir a una mayor amplificación de proteínas que conducen a la alteración del microambiente tumoral, lo que conduciría a una sobreactivación de la vía (Yang et al., 2013). En reportes previos se ha demostrado que la activación de ERK1/2 inducida por KSHV es crucial para el desarrollo del sarcoma de Kaposi (Sharma-walia et al., 2005). Además, se ha observado que la infección por KSHV también activa las vías que involucran a JNK y p38 en la etapa temprana de la infección. La inducción

de estas tres vías conduce a la modulación de la replicación lítica de KSHV y la producción de viriones durante la infección primaria (Pan et al., 2006).

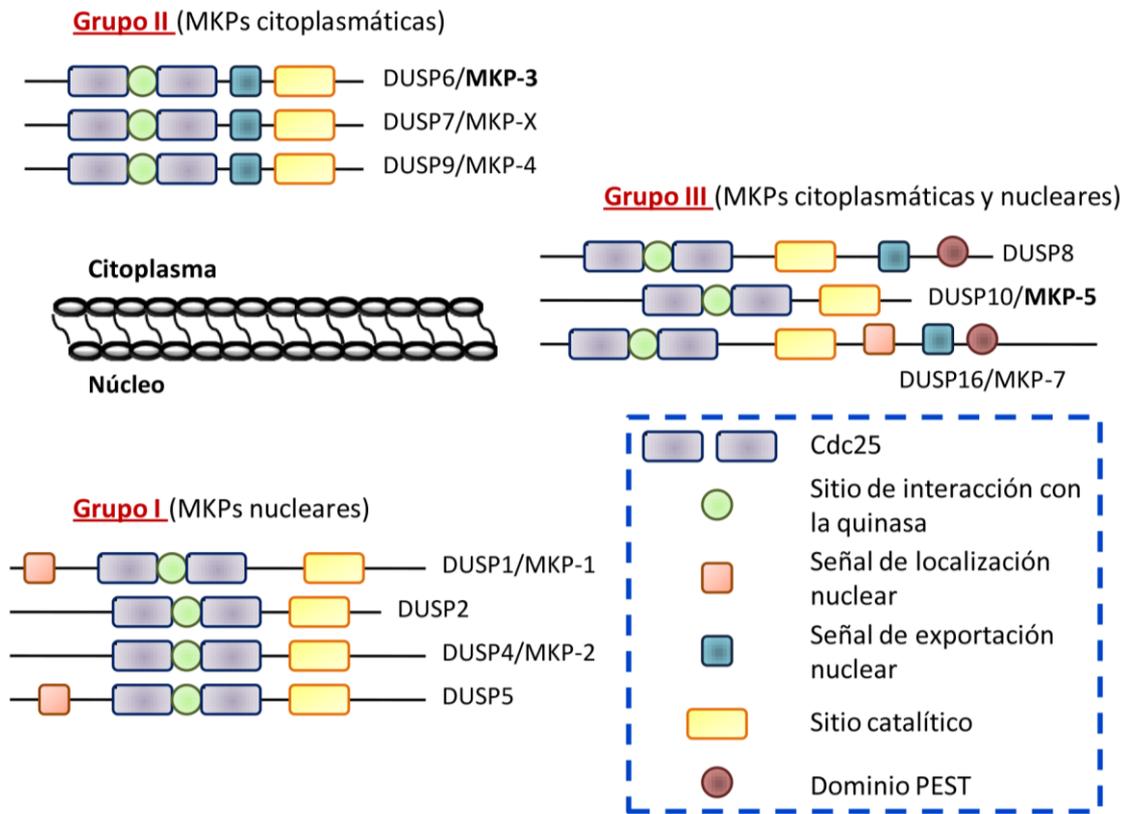


**Figura III-A. Rutas de señalización de MAPKs encontradas en mamíferos.** Activación de las MAPKs en respuesta a diferentes estímulos. Tras su activación, las MAPKs activan factores de transcripción en el núcleo para desencadenar las distintas respuestas biológicas. Adaptado de Cossa y col. (Cossa et al., 2013).

La activación de las MAPKs requiere la fosforilación en residuos treonina y tirosina, los cuales están altamente conservados en estas proteínas. Una vez activas, son capaces de fosforilar una amplia variedad de proteínas diana (Hömmö et al., 2015). El estado de fosforilación, y por lo tanto la actividad de las MAPKs, está regulado por proteínas fosfatasas activadas por mitógeno (MKPs o DUSPs), un subgrupo de fosfatasas de doble especificidad, que tienen la capacidad de desfosforilar ambos residuos; tirosina y treonina, en sus proteínas diana (Huang and Tan, 2012; Patterson et al., 2009) (**Figura III-B**). Hay diferentes tipos de MKPs, las cuales se diferencian entre sí por la especificidad por el sustrato, distribución tisular, localización subcelular, y se dividen en tres diferentes grupos. El primer grupo está formado por proteínas nucleares, como es el caso de MKP-1; el segundo grupo incluye a MKP-3, una fosfatasa citosólica específica de ERK1/2; y el tercer grupo contiene a MKP-5, que es una fosfatasa específica de p38 y JNK, y se encuentran en el núcleo y en el citosol (Kidger & Keyse, 2016) (**Figura III-C**).



**Figura III-B. Fosfatasas activadas por mitógeno: Inactivación de MAPKs por MKPs.** La unión de la fosfatasa a la proteína MAPK activa al dominio MKB provocándose un cambio conformacional en el dominio DUSP de la fosfatasa incrementando su actividad catalítica para desfosforilar a la MAPK en los residuos tirosina y treonina, desactivándola. Adaptado de Low (Low and Zhang, 2016).



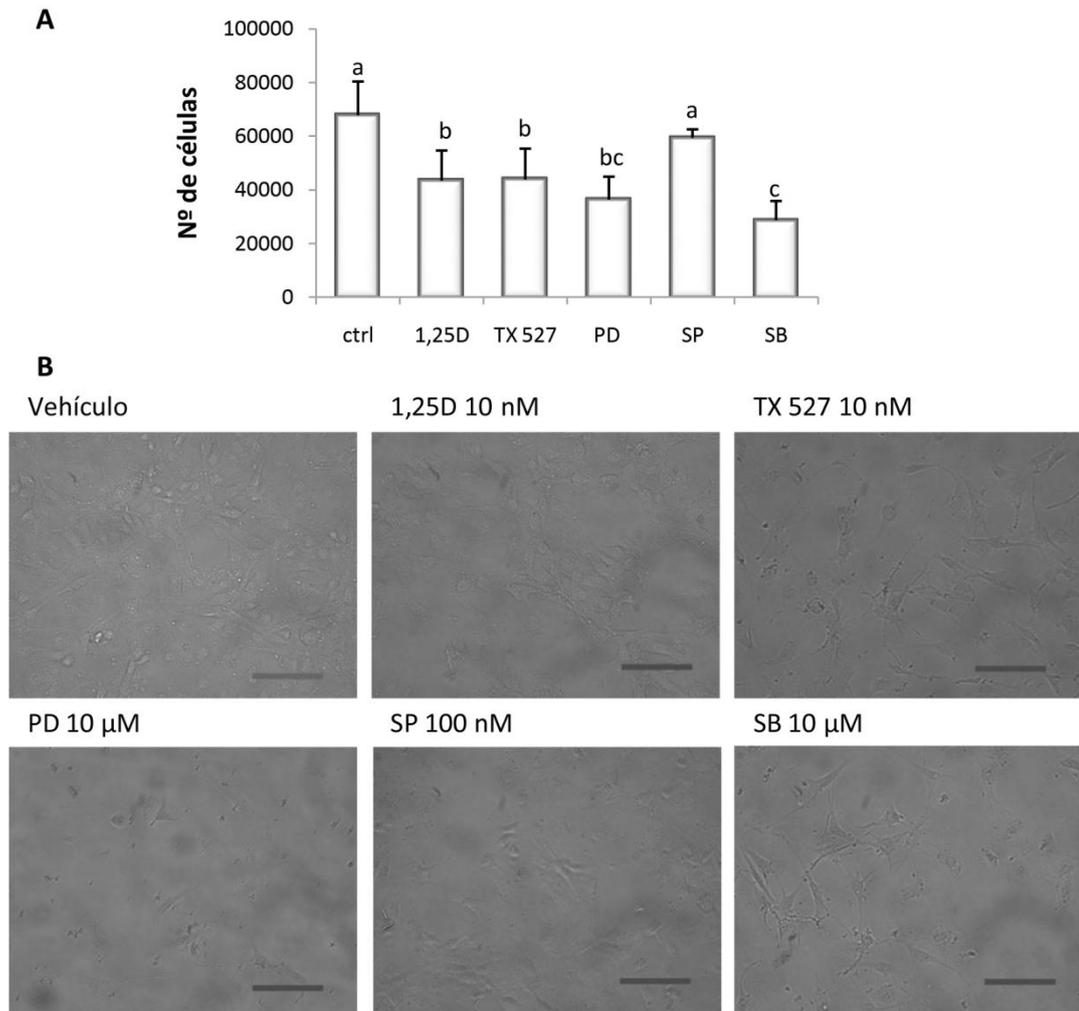
**Figura III-C. Clasificación, localización y estructura de las MKPs.** Las MKPs se clasifican en tres grupos de acuerdo a su localización subcelular y especificidad de sustrato. El grupo I está formado por proteínas nucleares como MKP-1, el grupo II, compuesto por fosfatasas citosólicas como MKP-3 y el grupo III contiene fosfatasas presentes tanto en el núcleo como en el citosol como MKP-5. Adaptado de Caunt y Keyse (Caunt and Keyse, 2013).

## RESULTADOS

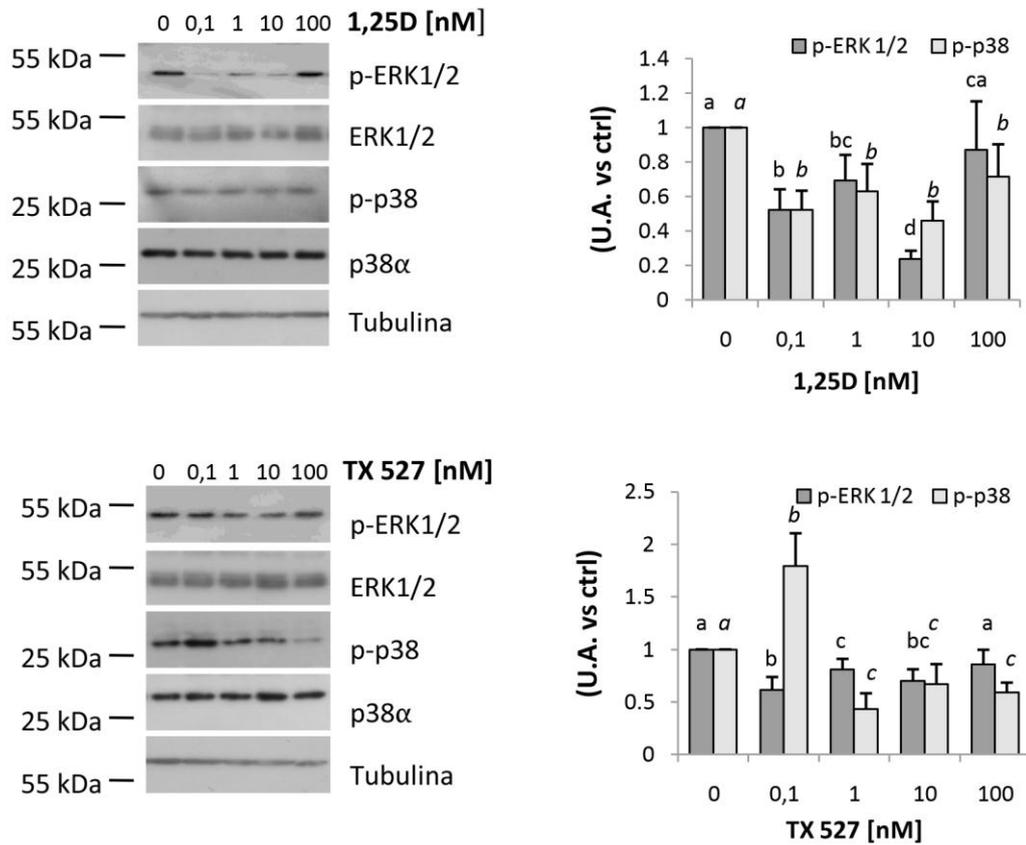
### *El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y TX 527 ejercen sus efectos anti-proliferativos a través de la inhibición de las MAPKs*

Con el fin de evaluar la participación de las MAPKs en los efectos anti-proliferativos del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y su análogo TX 527, las células vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) o se incubaron con inhibidores específicos: 10  $\mu\text{M}$  de PD98059 (ERK1/2), 100 nM de SP600125 (JNK1/2) o 10  $\mu\text{M}$  de SB203580 (p38 $\alpha/\beta$ ) durante 48 horas. Para evaluar la proliferación, las células se colectaron y contaron en una cámara de Neubauer y los datos obtenidos se presentaron en gráficos de barras (**Figura III-1A**). Los resultados muestran que en presencia de los inhibidores de ERK1/2 y p38 el número de células vGPCR disminuyó significativamente en forma similar a las células tratadas con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 como previamente se había reportado (Gonzalez-Pardo et al., 2010). Sin embargo, en presencia del inhibidor de JNK, no se observaron diferencias significativas con respecto al control. En paralelo, se evaluó si la presencia de los inhibidores provoca cambios morfológicos en las células a través de micrografías tomadas en un microscopio de contraste de fases al finalizar el tiempo de tratamiento. En la **Figura III-1B**, se muestra una micrografía representativa de tres experimentos independientes en donde se observó que, en presencia del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , TX 527, PD98059 o SB203580, las células se presentaron mayormente redondeadas, con núcleos condensados, a diferencia de las células tratadas con el vehículo (control), donde se apreció la morfología ahusada característica de estas células que expresan el vGPCR. Estos resultados sugieren que ERK1/2 y p38 participan en el mecanismo antineoplásico de acción del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y el análogo TX 527. Para explorar en profundidad esta posibilidad, a continuación, se estudió si ambos compuestos regulan el estado de fosforilación de ERK1/2 y p38. Las células vGPCR se trataron con concentraciones crecientes de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 (0,1-100 nM) o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas. El estado de fosforilación de las quinasas se evaluó por Western blot. La **figura III-2** indica que ambos compuestos inducen una disminución significativa en la fosforilación de ERK1/2 y p38 de manera dependiente de la dosis y sin modificar los niveles proteicos de expresión

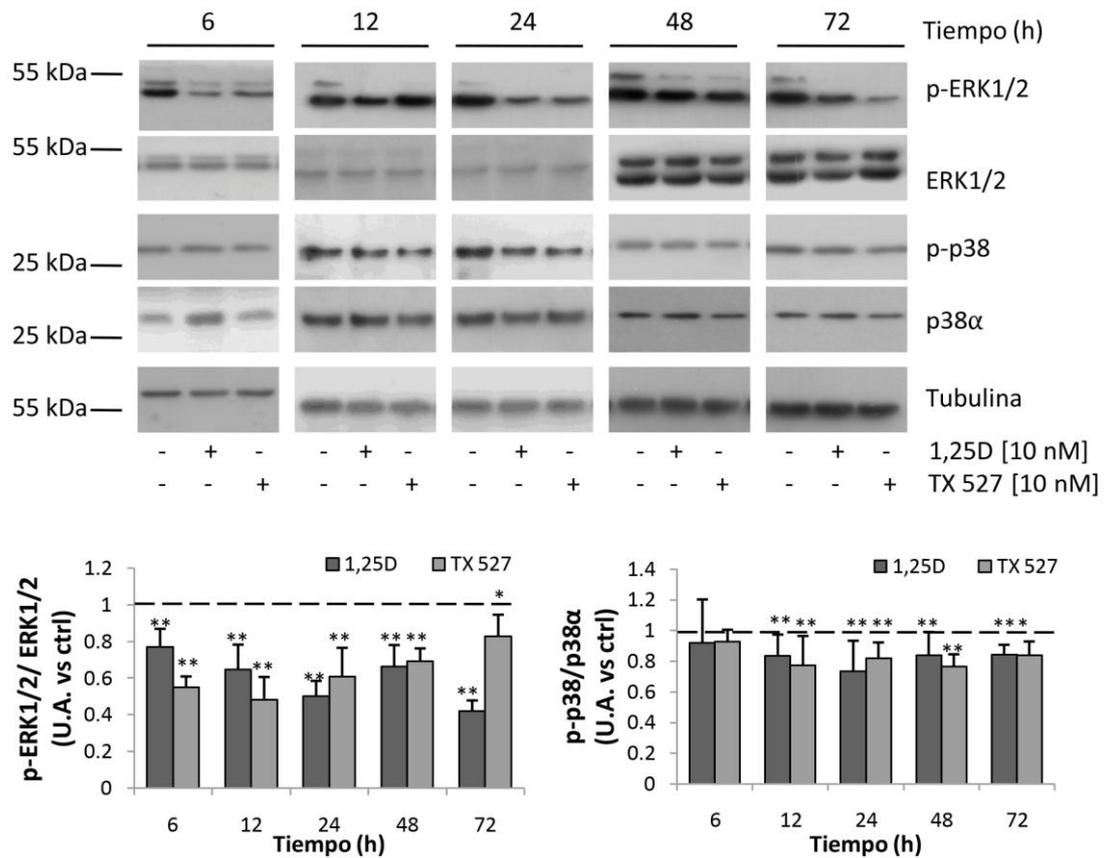
de ambas quinasas. A 100 nM, sin embargo, la fosforilación de ERK1/2 se vio incrementada, posiblemente, para contrarrestar el efecto citotóxico de ambos compuestos. Seguidamente, se estudió el perfil temporal de fosforilación de ERK1/2 y p38. Para ello, las células vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) durante diferentes tiempos (6-72 horas) (**Figura III-3**). Los resultados muestran una disminución sostenida en la fosforilación de ERK1/2 en función del tiempo, mientras que la fosforilación de p38 se vio disminuida a partir de las 12 horas de tratamiento con el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527.



**Figura III-1.** El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 disminuyen la proliferación en células vGPCR por un mecanismo que involucra a ERK1/2 y p38 MAPK. Las células vGPCR se sembraron en placas de 24 pocillos por triplicado y trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) o se incubaron con 10 µM de PD98059 (PD), 100 nM de SP600125 (SP) o 10 µM de SB203580 (SB) durante 48 horas. **A)** Las células se contaron en cámara de Neubauer y los resultados obtenidos de al menos tres experimentos independientes se representaron en un gráfico de barras. El análisis estadístico se realizó por ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni. Las diferencias significativas entre condiciones se indican con diferentes letras ( $p < 0,01$ ). **B)** Las micrografías se obtuvieron por microscopia de contraste de fases. Barra: 30 µm; magnificación 200x.



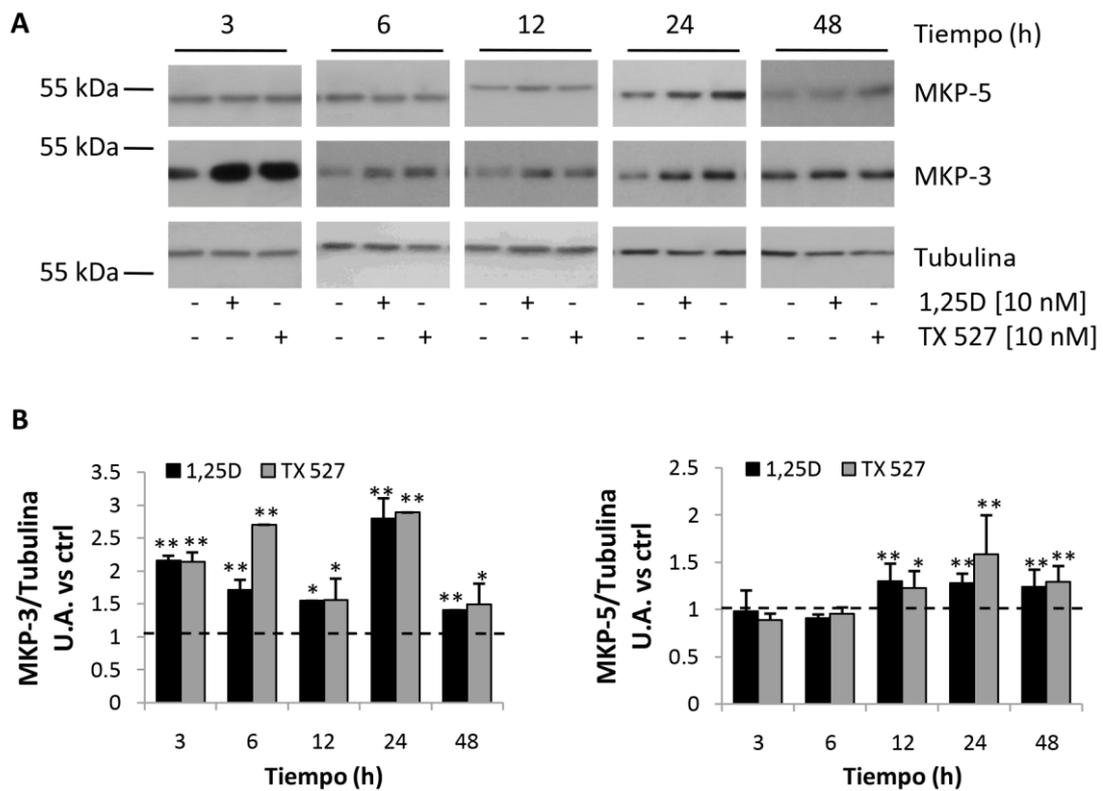
**Figura III-2. El  $1\alpha,25(OH)_2D_3$  y TX 527 inducen cambios en la fosforilación de ERK1/2 y p38 de manera dependiente de la dosis.** Las células vGPCR se trataron con concentraciones crecientes de  $1\alpha,25(OH)_2D_3$  (1,25D) o TX 527 (0,1-100 nM) o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas. La fosforilación de ERK1/2 y p38 y sus respectivos niveles proteicos se analizaron por Western blot, se empleó Tubulina como control de siembra. Se muestra un blot representativo de al menos seis experimentos independientes con su respectiva cuantificación representada en gráficos de barras. El análisis estadístico se realizó por ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni. Diferentes letras indican diferencias significativas con un  $p < 0,01$  (1,25D) o  $p < 0,05$  (TX 527).



**Figura III-3. El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 disminuyen la fosforilación de ERK1/2 y p38 de manera dependiente del tiempo.** Las células vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) durante 6-72 horas. Los lisados celulares se procesaron para evaluar por Western blot los niveles de ERK1/2, p38 y sus respectivas formas fosforiladas. Las bandas de los blots se cuantificaron y normalizaron con Tubulina. Se muestra un blot representativo de al menos cuatro experimentos independientes y la cuantificación en gráficos de barra expresando la relación entre p-ERK1/2 respecto de ERK1/2 y p-p38 respecto de p38α en función del tiempo. Las diferencias estadísticas entre cada condición tratada con su respectivo control a cada tiempo se analizaron por la prueba t de Student (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01).

### ***El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y TX 527 modulan la expresión de las MAPK fosfatasas***

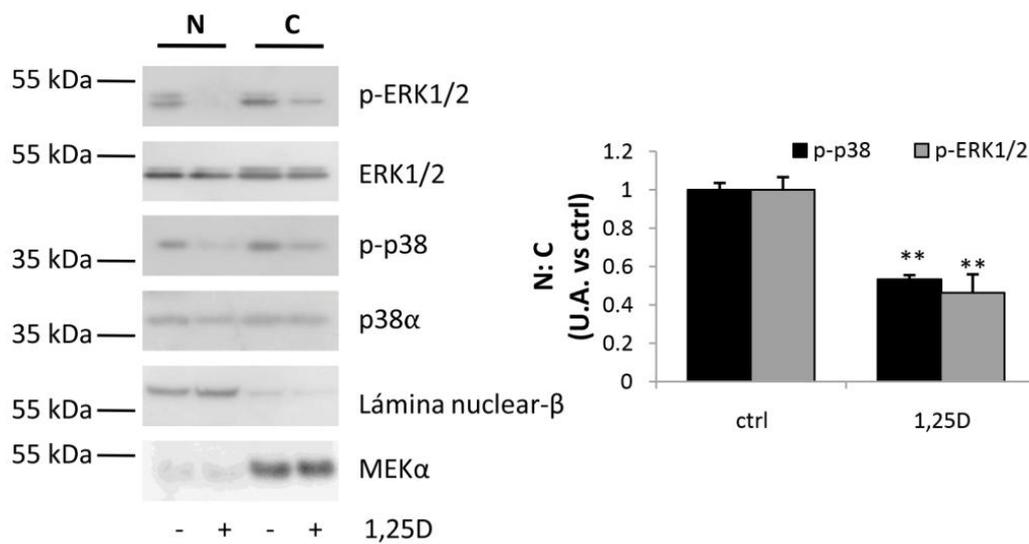
Como se mencionó anteriormente, el estado de fosforilación, y por lo tanto la actividad de las MAPKs, está regulado por MKPs. A continuación, se investigó si el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 regulan la expresión de las fosfatasas MKP-3 y MKP-5 en función del tiempo (3-48 h) y si este evento se relaciona con los cambios en la fosforilación de ERK1/2 y p38 observados (**Figura III-4**). Los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo en los niveles de expresión de MKP-3 a partir de las 3 horas, mientras que MKP-5 mostró un aumento sostenido a partir de las 12 horas de tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527. Estos resultados se correlacionan con los tiempos donde se observó una disminución en la fosforilación de ERK1/2 y p38 MAPK sugiriendo que dicho efecto podría estar mediado por un aumento en la expresión de las fosfatasas específicas, MKP-3 y MKP-5 respectivamente, en lugar de una acción inhibitoria en el flujo ascendente de las quinasas.



**Figura III-4.** El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y su análogo TX 527 aumentan la expresión de las fosfatasa MKP-3 y MKP-5 en función del tiempo. Las células vGPCR se cultivaron y trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) durante 3-48 horas. Los niveles de expresión proteica de MKP-3 y MKP-5 se analizaron por Western blot. Se empleó Tubulina como control de siembra. En **A**, se muestra un blot representativo de al menos tres experimentos independientes para cada tiempo y en **B**, la cuantificación de los blots expresada como el radio entre los niveles de MKP-3 o MKP-5 versus Tubulina con respecto al control en gráficos de barras. Los resultados obtenidos para cada tratamiento fueron comparados con su respectivo control a cada tiempo y las diferencias estadísticas se evaluaron por la prueba t de Student (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

### ***El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibe la translocación de ERK1/2 y p38 MAPK en su forma activa al núcleo***

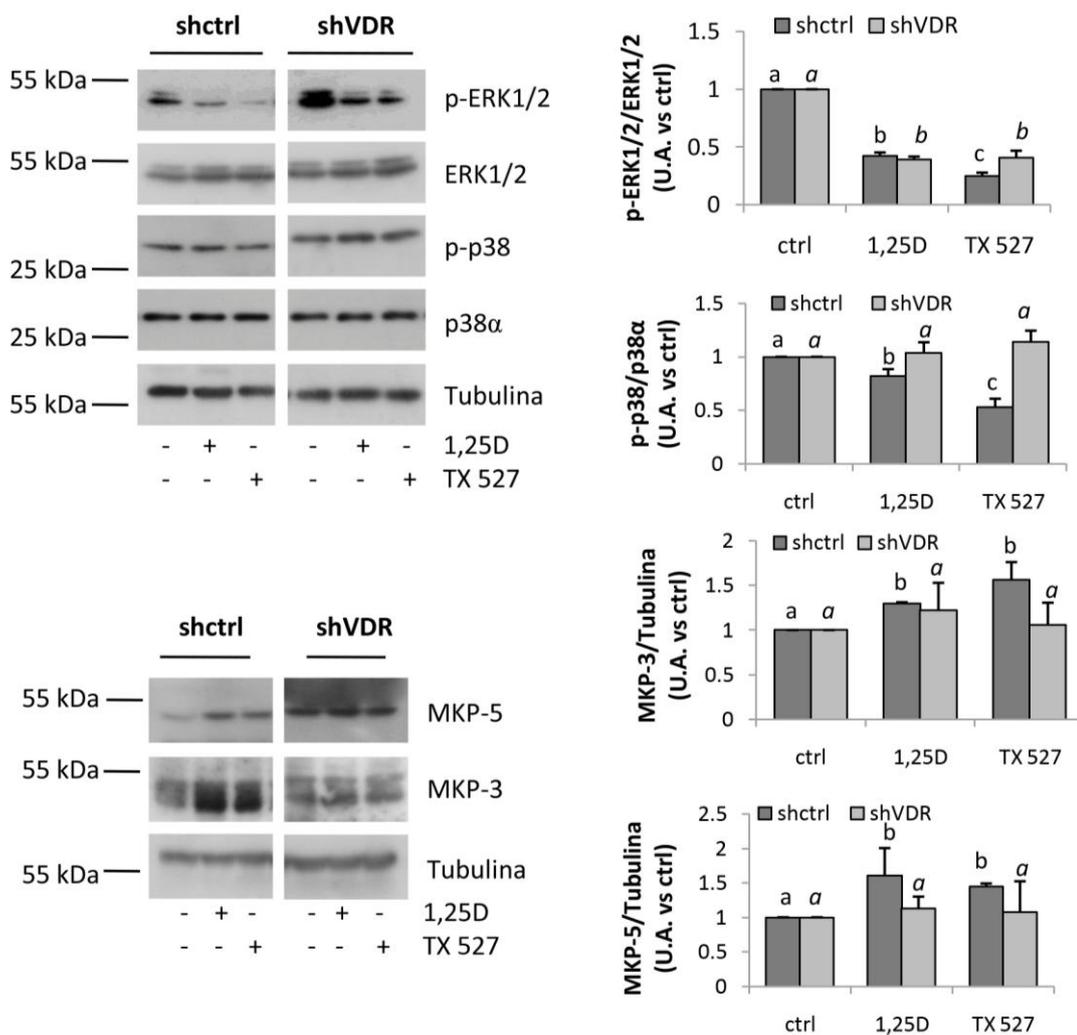
Se investigó si la disminución en la fosforilación de las quinasas por el agonista afecta su localización. Para ello, las células vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  durante 48 horas. Las células se colectaron en buffer TES y se realizó un fraccionamiento subcelular para obtener la fracción nuclear y el citosol. Los resultados que se presentan en la **Figura III-5** muestran blots representativos de las forma fosforilada y total de ERK1/2 y p38 en la fracción nuclear (**N**) y citosol (**C**); como marcadores de las fracciones se emplearon Lámina nuclear- $\beta$  y MEK $\alpha$  respectivamente. Para evidenciar si el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  afecta a la translocación de las quinasas en su forma fosforilada/total, los blots se cuantificaron y se graficó el radio entre el **N** y **C** de la relación entre la cantidad fosforilada de cada quinasa con respecto a su total en cada fracción y condición. El análisis cuantitativo de los resultados reveló una disminución significativa en el núcleo de la forma fosforilada de ERK1/2 y p38 con respecto al citosol luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .



**Figura III-5. Localización subcelular de p38 y ERK1/2 en células vGPCR.** Las células vGPCR se cultivaron y trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas. Las células se colectaron en buffer TES y se realizó un fraccionamiento subcelular para obtener la fracción nuclear (N) y el citosol (C). Se evaluaron los niveles proteicos de p-ERK1/2, ERK1/2, p-p38 y p38 $\alpha$ . La pureza de las fracciones se determinó a través de marcadores específicos, MEK $\alpha$  para C y Lámina nuclear- $\beta$  para N. Se muestra un blot representativo de tres experimentos realizados de manera independiente y su cuantificación representada en un gráfico de barras. Las diferencias significativas entre la condición tratada y control se evaluaron a través de una prueba t de Student (\*\* $p < 0,01$ ).

### ***Dependencia del VDR en la regulación de MAPKs y MKPs por el $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y TX 527***

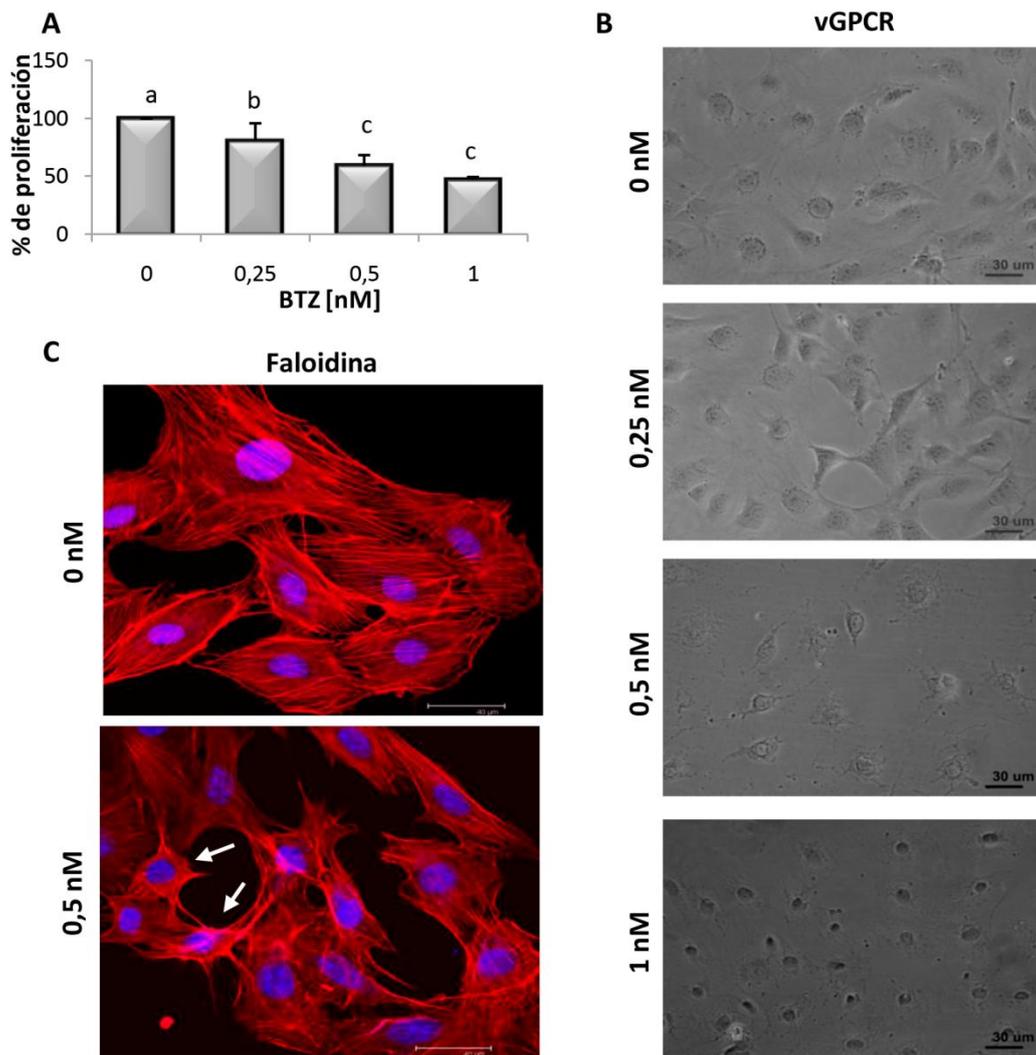
Como se mencionó previamente, el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ejerce sus efectos a través de un mecanismo genómico, regulando la transcripción de genes, y uno no genómico de respuestas rápidas iniciadas en la membrana (Norman, 2008). Se postula que los efectos del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ocurren por interacción con su receptor, VDR. El VDR contiene dominios específicos para la unión al ligando, una vez unido, forma un heterodímero con el receptor X retinoideo (RXR), esta heterodimerización es importante ya que permite la translocación del complejo VDR-RXR- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  al núcleo (Fleet et al., 2012). Sin embargo, no se sabe si todas las acciones del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  involucran la interacción directa o no de la hormona con su receptor nuclear. Para investigar la participación del VDR en la regulación de las MAPKs y MKPs de interés por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y su análogo, se utilizó la línea celular vGPCR que expresa establemente un shARN dirigido contra el VDR provocando su silenciamiento (vGPCR-shVDR) o un shARN control (vGPCR-shctrl). Las células se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas. Luego, se analizó el estado de fosforilación de ERK1/2 y p38 y los niveles de expresión proteica de las fosfatasas MKP-3 y MKP-5 por Western blot. La **Figura III-6** muestra que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y el TX 527 disminuyeron la fosforilación de ERK1/2 y p38 sin modificar los niveles de proteína total luego de las 48 horas de tratamiento como se observó previamente; mientras que, cuando el VDR fue silenciado, la fosforilación de ERK1/2 no se vio afectada y el efecto inhibitorio en la fosforilación de p38 fue revertido. A su vez, el aumento en la expresión de las fosfatasas MKP-3 y MKP-5 inducido por ambos agonistas del VDR fue suprimido cuando el receptor fue silenciado.



**Figura III-6. Dependencia del VDR en la regulación de MAPKs y MKPs inducida por el  $1\alpha,25(OH)_2D_3$  y TX 527.** Las líneas celulares vGPCR-shctrl (shctrl) y vGPCR-shVDR (shVDR) fueron cultivadas y tratadas con 10 nM de  $1\alpha,25(OH)_2D_3$  (1,25D) o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas. La fosforilación de ERK1/2 y p38, y niveles de expresión de MKP-3 y -5 se analizaron como en las Figuras III-3 y 4 respectivamente. Se muestra un blot representativo, de al menos tres experimentos independientes, y la respectiva cuantificación representada en gráficos de barras. El análisis estadístico se realizó primeramente por ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni. Las diferentes letras indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$  para MKP-3, MKP-5 y p-ERK1/2 y un  $p < 0,01$  para p-p38.

### ***De manera similar a los agonistas del VDR, el Bortezomib inhibe la proliferación de las células vGPCR***

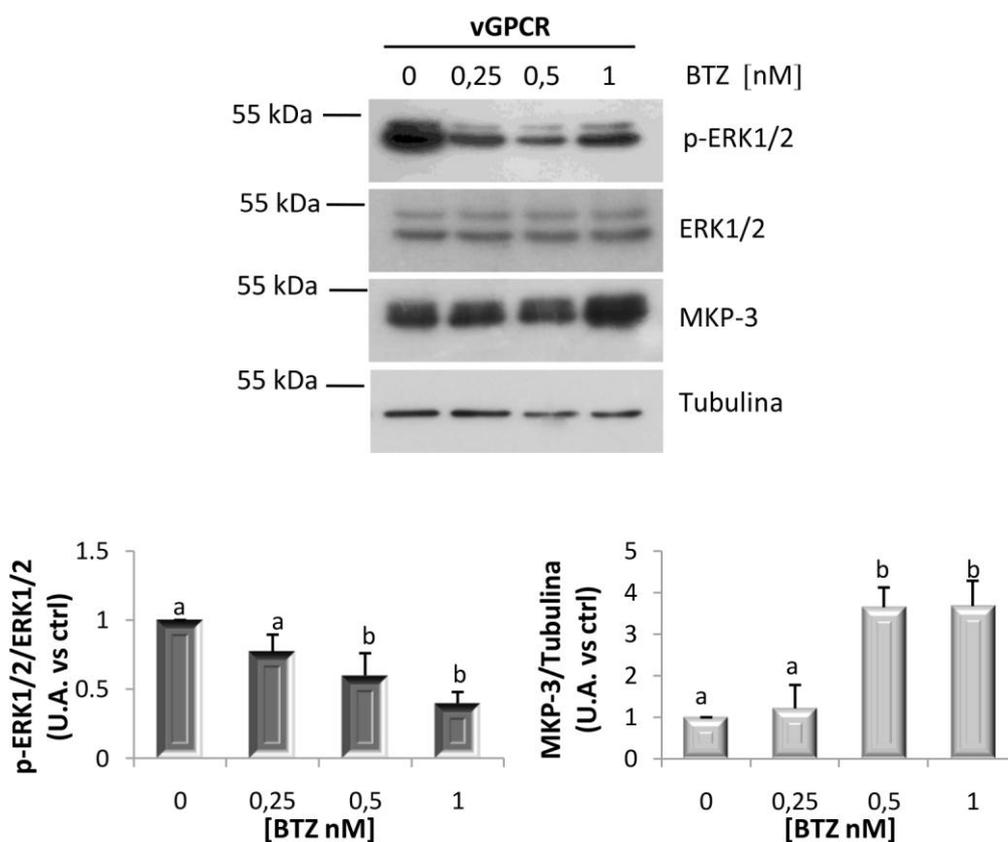
Dada la participación de la vía NF- $\kappa$ B en las acciones de ambos agonistas del VDR, se indagó sobre el mecanismo de acción del Bortezomib en la proliferación de las células vGPCR. Para ello, las células se trataron con concentraciones crecientes de Bortezomib (0,25-1 nM) o vehículo (0,1% de DMSO) en DMEM suplementado con 2% de SFB durante 24 horas (**Figura III-7**). La proliferación se analizó mediante el recuento celular en cámara de Neubauer. Como se muestra en la **Figura III-7A**, el número de células vGPCR disminuyó significativamente al aumentar la concentración de Bortezomib, siendo 0,5 nM y 1 nM las más efectivas. En paralelo (**Figura III-7B**), se observaron cambios morfológicos a través de microscopía de campo claro, las células se encontraron redondeadas y con núcleos condensados al aumentar la concentración de Bortezomib. A nivel molecular, la F-actina evidenciada por la presencia de faloidina, permitió visualizar filamentos de actina definidos y organizados, distribuidos por todo el citoplasma de las células tratadas con el vehículo (control), mientras que en las células tratadas con 0,5 nM de Bortezomib mostraron un citoplasma más contraído y con filamentos desorganizados e irregulares debido a la despolimerización de la actina (**Figura III-7C**).



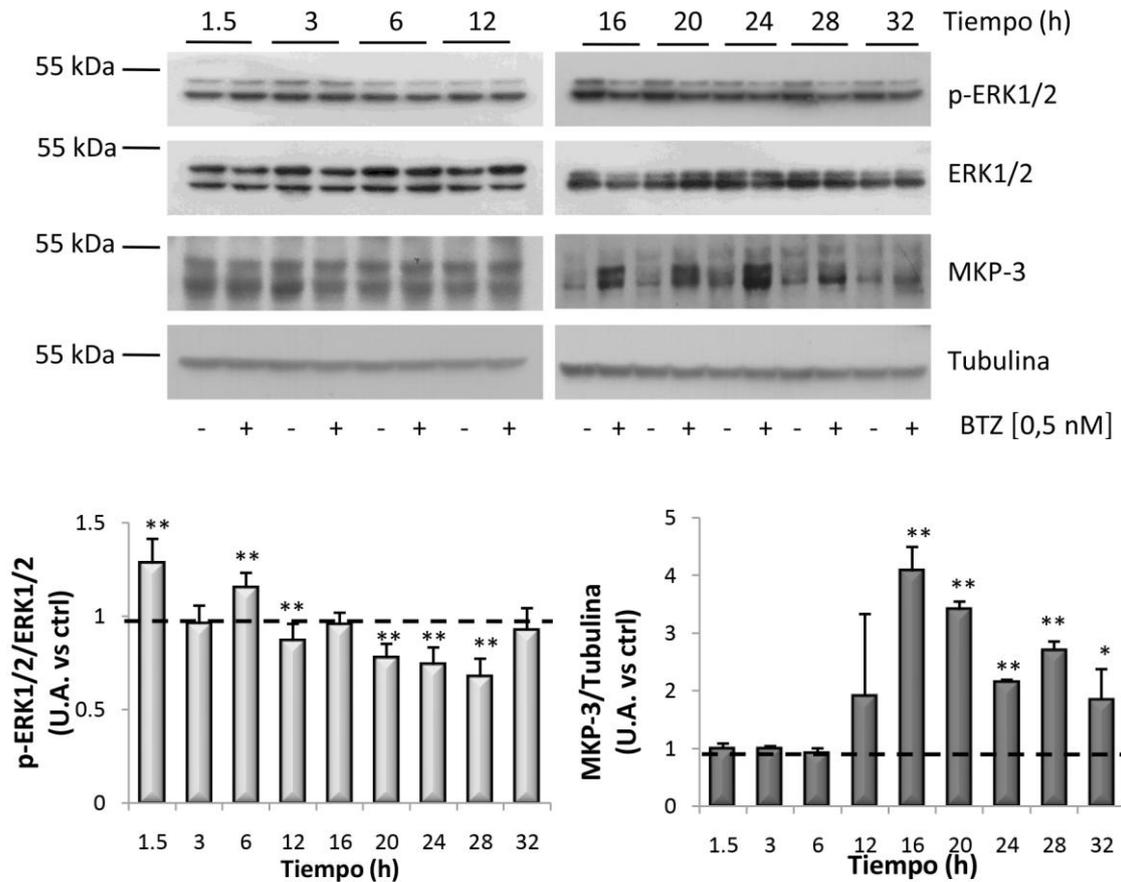
**Figura III-7. El Bortezomib disminuye el n3mero de c3lulas vGPCR e induce cambios en la morfolog3a celular.** Las c3lulas vGPCR se trataron con concentraciones crecientes de Bortezomib (BTZ, 0,25-1 nM) o veh3culo (0,1% de DMSO) durante 24 horas. **A)** Las c3lulas se contaron en c3mara de Neubauer, se calcul3 el porcentaje de proliferaci3n, calculado a partir del n3mero de c3lulas de cuatro experimentos independientes. Los valores porcentuales (media  $\pm$  S.D.) se representaron luego en gr3ficos de barras. Las diferencias significativas entre las condiciones se analizaron por ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni, diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). **B)** En paralelo, se tomaron micrograf3as de cada condici3n en un microscopio de contraste de fase. Magnificaci3n 200x. **C)** Las c3lulas tratadas con 0,5 nM de BTZ o veh3culo (0,1% de DMSO) se fijaron e incubaron con Faloidina (rojo) y DAPI (azul). Las micrograf3as se obtuvieron por microscop3a confocal y son representativas de tres experimentos independientes. Magnificaci3n 630x.

### ***El Bortezomib modula el estado de fosforilación de ERK1/2 y los niveles proteicos de MKP-3 en células vGPCR***

ERK1/2 se encuentra altamente activado en células endoteliales que expresan el vGPCR (Martin and Gutkind, 2008). En base a resultados previos y lo observado en este trabajo de tesis, la disminución en la proliferación celular promovida por el Bortezomib podría atribuirse a una inhibición en la actividad de ERK1/2, modulada por la fosfatasa MKP-3. Para evaluar esta idea, las células se trataron con concentraciones crecientes de Bortezomib (0,25-1 nM) o vehículo (0,1% de DMSO) durante 24 horas y luego se analizó el estado de fosforilación de ERK1/2 y el nivel de expresión proteica de MKP-3 por Western blot. En la **Figura III-8** se observa que, el Bortezomib indujo una disminución significativa en la fosforilación de ERK1/2 en forma dependiente de la concentración, sin mostrar variaciones en los niveles proteicos de ERK1/2 total. A su vez, los niveles de MKP-3 aumentaron significativamente en forma dependiente de la concentración. A continuación, para evaluar los cambios en función del tiempo (1,5-32 h), las células vGPCR se trataron en presencia de 0,5 nM de Bortezomib o vehículo (0,1% de DMSO). En la **Figura III-9** se muestran los resultados del perfil temporal de la fosforilación de ERK1/2 y niveles proteicos de ERK1/2 y MKP-3. Para evaluar los cambios en la fosforilación de ERK1/2, se analizó la relación de la proteína fosforilada con respecto a ERK1/2 total y los cambios en los niveles de MKP-3 con respecto a Tubulina. La cuantificación de los datos obtenidos mostró que a tiempos cortos de tratamiento (1,5-16 h), ERK1/2 presentó un patrón fluctuante de fosforilación. A partir de las 20 horas de tratamiento, la fosforilación de ERK1/2 disminuyó significativamente y se sostuvo hasta las 28 horas de tratamiento con Bortezomib. Los niveles proteicos de MKP-3 no sufrieron cambios a tiempos cortos (1,5-12 h) y a partir de las 16 horas de tratamiento se observó un aumento altamente significativo de MKP-3, el cual fue disminuyendo sin perder significancia hasta las 32 horas de tratamiento.



**Figura III-8. El Bortezomib reduce la fosforilación de ERK1/2 e induce la acumulación de MKP-3 de manera dependiente de la concentración.** Las células vGPCR se trataron con dosis crecientes de Bortezomib (BTZ, 0,25-1 nM) durante 24 horas. Los niveles de ERK1/2 total y fosforilada, MKP-3 y Tubulina, esta última utilizada como control de siembra, se analizaron por Western blot. Se muestra un blot representativo, de al menos cinco experimentos, y la cuantificación de los blots se representó en gráficos de barra. Los resultados obtenidos para las diferentes condiciones se analizaron por ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni. Las diferentes letras indican diferencias significativas con un  $p < 0,01$ .



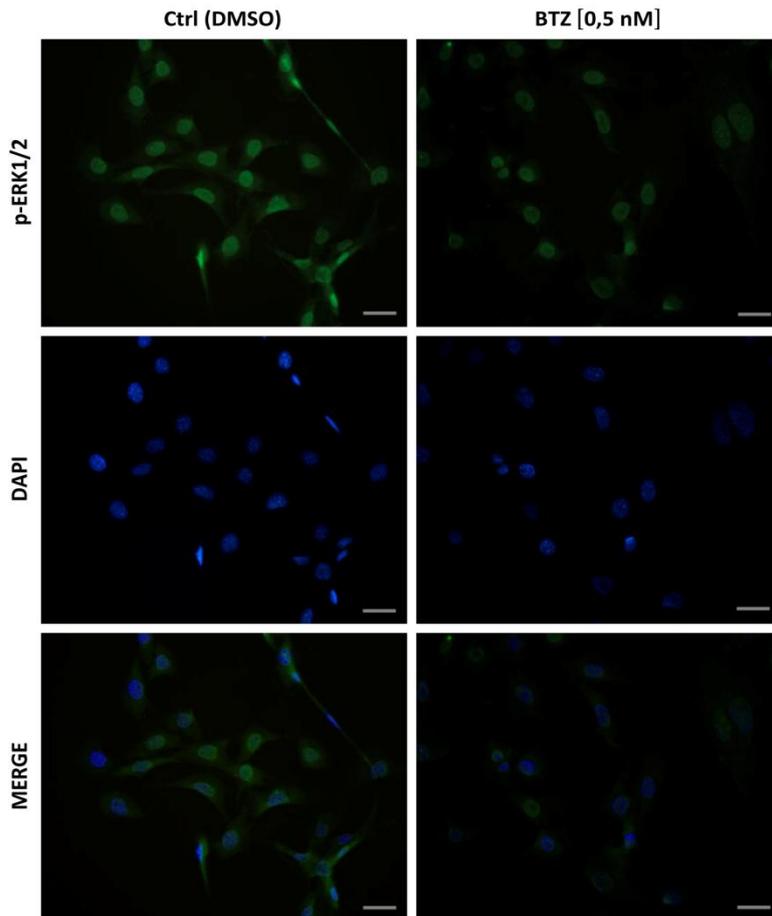
**Figura III-9. Perfil temporal de ERK1/2 y MKP-3 inducido por Bortezomib en células vGPCR.** Las células vGPCR se trataron con 0,5 nM de Bortezomib (BTZ) o vehículo (0,1% de DMSO) durante 1,5-32 horas. Las proteínas ERK1/2 y fosforilada, MKP-3 y Tubulina se analizaron como en la Figura III-8. Se muestra un blot representativo, de al menos tres experimentos, y la respectiva cuantificación. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente, donde se comparó el efecto del tratamiento a cada tiempo con su respectivo control mediante la prueba *t* de Student (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

### ***El Bortezomib regula la localización de ERK1/2 fosforilada***

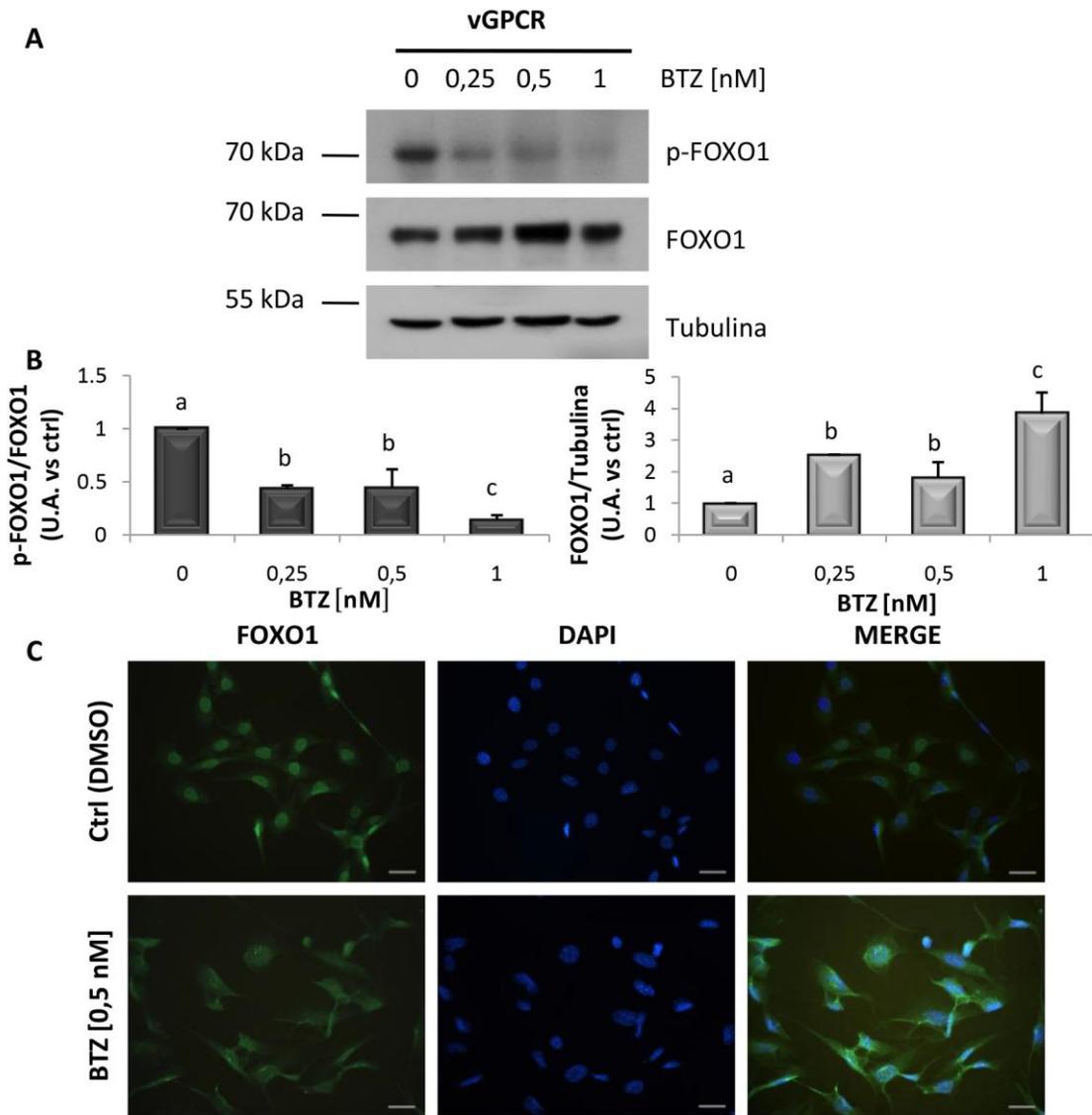
Dado que el Bortezomib, al igual que los agonistas del VDR, disminuye la fosforilación de ERK1/2, a continuación se estudió si el Bortezomib afecta también su localización subcelular. Para ello, las células vGPCR se trataron con 0,5 nM de Bortezomib o vehículo (0,1% de DMSO) durante 24 horas, y la localización se analizó por inmunocitoquímica (**Figura III-10**). En las células controles, se observó una mayor intensidad de fluorescencia de ERK1/2 fosforilada en la región nuclear, en comparación con las células tratadas con Bortezomib (**Figura III-10**).

### ***El Bortezomib actúa a través de un mecanismo que involucra la activación y modulación del factor de transcripción FOXO1***

A continuación, se investigó si el Bortezomib modula FOXO1 como parte de su mecanismo de acción. Para ello, las células vGPCR se trataron con concentraciones crecientes de Bortezomib (0,25-1 nM) o vehículo (0,1% de DMSO) durante 24 horas y luego se evaluaron los niveles proteicos de FOXO1 y su estado de fosforilación por Western blot (**Figura III-11**). La cuantificación de los datos obtenidos reveló que el Bortezomib disminuye la fosforilación de FOXO1, efecto que fue mayor a una concentración de 1 nM (**Figura III-11B**). Dicho cambio tuvo lugar a pesar de observarse un aumento significativo en los niveles proteicos totales de FOXO1, cambios que se visualizaron por normalización con Tubulina. Por otra parte, el hecho de que el Bortezomib reduzca la relación p-FOXO1/FOXO1 pero incremente FOXO1/Tubulina sugiere que este inhibidor es capaz de regular FOXO1 en dos niveles, promoviendo la expresión y disminuyendo la fosforilación, lo cual aumentaría su translocación al núcleo y actividad. Dada esta posibilidad, posteriormente, se estudió la localización subcelular de FOXO1. Para ello, las células vGPCR se trataron con 0,5 nM de Bortezomib o vehículo (0,1% de DMSO) durante 24 horas y la localización de FOXO1 se analizó por inmunocitoquímica (**Figura III-11C**). En condiciones basales, FOXO1 mostró una señal difusa tanto en el citosol como en el núcleo, mientras que en presencia de Bortezomib se observó un aumento en la fluorescencia del factor de transcripción FOXO1 en el compartimento nuclear.



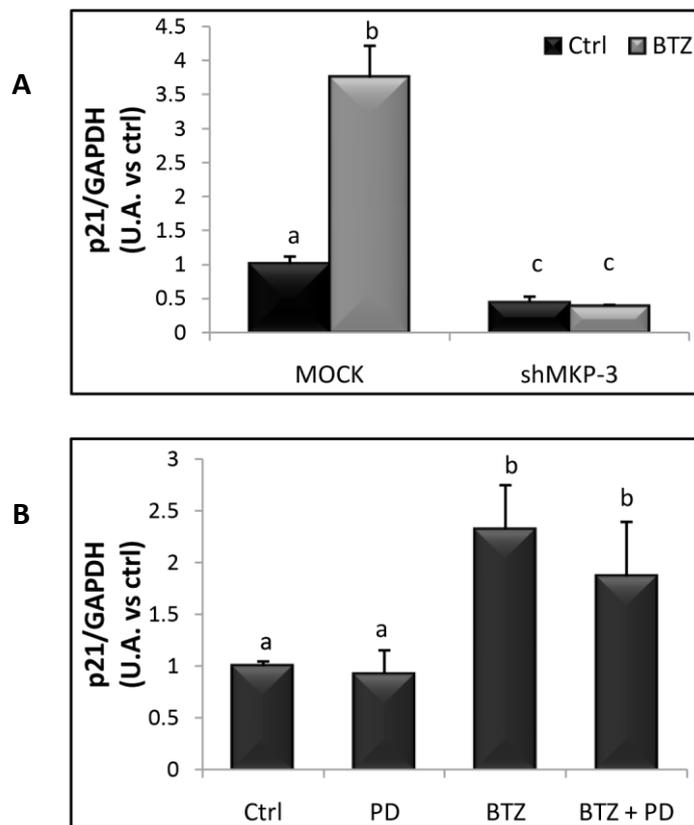
**Figura III-10. El Bortezomib disminuye la fosforilación nuclear de ERK1/2.** Las células vGPCR se trataron con 0,5 nM de Bortezomib (BTZ) o vehículo (0,1% de DMSO) durante 24 horas. Las células se fijaron con metanol e incubaron con un anticuerpo anti-p-ERK1/2 (verde) y el núcleo se marcó con DAPI (azul). Se muestra una micrografía representativa de cada condición tomadas en un microscopio de fluorescencia de tres experimentos independientes. Magnificación de 200x. Barra: 30  $\mu$ m.



**Figura III-11: El Bortezomib disminuye la fosforilación del factor de transcripción FOXO1.** Las células vGPCR; **A)** se trataron con concentraciones crecientes de Bortezomib (BTZ, 0,25-1 nM) o vehículo (0,1% de DMSO) durante 24 horas. Se realizó un ensayo de Western blot para evaluar los niveles proteicos de p-FOXO1, FOXO1 y se empleó Tubulina como control de siembra. Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes; **B)** La cuantificación de los resultados obtenidos se expresó en gráficos de barras en donde las diferencias significativas entre condiciones se evaluaron por ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni, diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ); y **C)** Las células tratadas con 0,5 nM de BTZ o vehículo (0,1% de DMSO) se fijaron con metanol e incubaron con anticuerpo anti-FOXO1 (verde) y DAPI (azul) para marcación nuclear. Se muestra una micrografía representativa de tres experimentos independientes. Magnificación 200x.

### ***El Bortezomib induce un aumento en la expresión de p21 en forma dependiente de MKP-3***

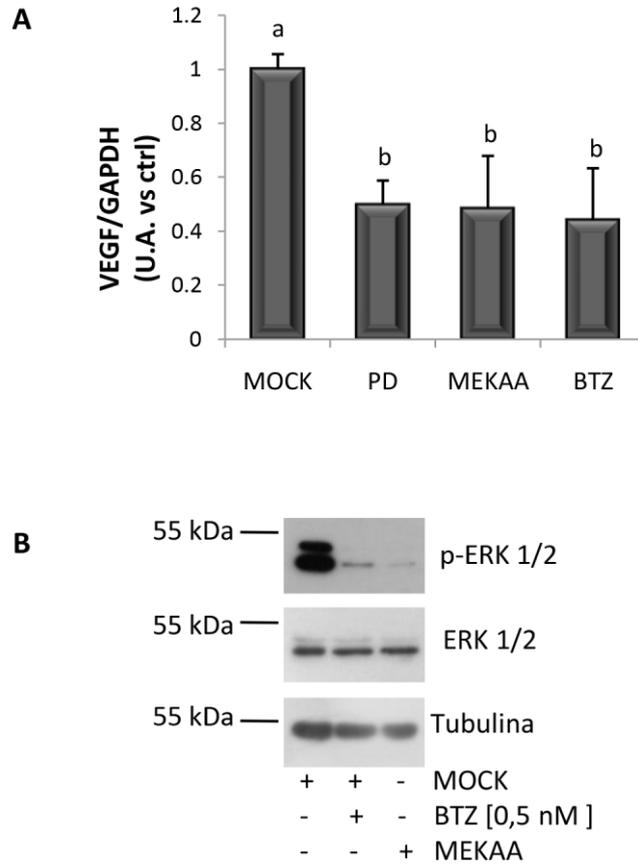
Se investigó si el Bortezomib regula los niveles de ARNm de p21 y de ser así, si MKP-3 y ERK1/2 estarían implicadas en este evento. Para ello, las células vGPCR se transfectaron por 24 horas con un plásmido conteniendo una secuencia dirigida contra la expresión de MKP-3 de ratón (shMKP-3) o un plásmido vacío como control (MOCK) y luego se trataron con 0,5 nM de Bortezomib o vehículo (0,1% de DMSO) durante 24 horas. La expresión de p21 se analizó por qRT-PCR y los resultados obtenidos para cada condición fueron normalizados con GAPDH (**Figura III-12**). En la **Figura III-12A** se observa que el tratamiento con Bortezomib aumentó significativamente los niveles del ARNm de p21, efecto que fue bloqueado cuando se silenció MKP-3. Es importante destacar que los niveles basales de p21 fueron menores en las células con el MKP-3 silenciado. Estos resultados indican que MKP-3 es necesario para regular la expresión de p21. A su vez, se investigó si la inducción de p21 por Bortezomib involucra a la acción ERK1/2. Para ello, las células vGPCR se incubaron durante 15 minutos con 10  $\mu$ M de PD98059, inhibidor de MEK1/2, seguido del tratamiento con 0,5 nM de Bortezomib o vehículo (0,1% de DMSO) durante 24 horas. Como se observa **Figura III-12B**, al inhibir ERK1/2 no se observaron variaciones significativas en los niveles de p21 con respecto al control. Por el contrario, cuando las células fueron tratadas con Bortezomib se observó un aumento significativo en los niveles del ARNm de p21, efecto que se mantuvo al combinar el Bortezomib y la inhibición farmacológica de ERK1/2 con PD98059.



**Figura III-12. Rol de ERK1/2 y MKP-3 en la expresión de p21 inducida por Bortezomib en células vGPCR. A)** Las células se transfectaron con un shARN contra MKP-3 (shMKP-3) o con un vector vacío (MOCK) y se trataron con 0,5 nM de Bortezomib (BTZ) o vehículo (ctrl, 0,1% de DMSO) durante 24 horas. **B)** Las células se pre-incubaron con 10  $\mu$ M de PD98059 (PD) y se trataron con 0,5 nM de BTZ durante 24 horas. Los niveles de expresión génica de p21 y GAPDH se evaluaron por qRT-PCR. Los resultados obtenidos, de tres experimentos independientes, se representaron en gráficos de barras. La significación estadística de los datos se realizó mediante un análisis de ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos para cada condición ( $p < 0,05$ ).

### ***El Bortezomib inhibe la expresión de VEGF a través de la inactivación de ERK1/2***

Se estudió si el Bortezomib regula además la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) a través de ERK1/2 como parte de su mecanismo de acción. Para ello, las células vGPCR se transfectaron con un plásmido conteniendo una secuencia de la forma dominante negativa de MEK (MEKAA), inhibiendo así la fosforilación de ERK1/2, o el vehículo de transfección (MOCK) o con 10  $\mu$ M de PD98059 o 0,5 nM de Bortezomib durante 24 horas (**Figura III-13**). Se extrajo el ARN total correspondiente a cada condición y se analizaron los niveles de expresión de VEGF por qRT-PCR. La cuantificación de los datos obtenidos reveló, como se esperaba, que las células vGPCR, en condiciones basales, expresan altos niveles de VEGF y estos niveles de expresión disminuyeron significativamente cuando se provocó la inhibición ERK1/2 por la presencia de MEKAA o PD98059. Es más, el tratamiento con Bortezomib redujo los niveles de expresión de VEGF de manera comparable a la inhibición de ERK1/2 por ambos mecanismos (**Figura III-13A**). En paralelo, se corroboró la disminución de la fosforilación de ERK1/2 por MEKAA por Western blot (**Figura III-13B**). Las bandas proteicas muestran una disminución en la fosforilación de ERK1/2 en las células tratadas con Bortezomib, comparable con la disminución producida en células transfectadas con el plásmido MEKAA. Los niveles de expresión de ERK1/2 no variaron en las diferentes condiciones.



**Figura III-13. El Bortezomib inhibe la expresión de VEGF a través de un mecanismo dependiente de ERK1/2.** Las células vGPCR se cultivaron y transfectaron con MEKAA o con un vector vacío (MOCK) durante 24 horas o pre-incubaron con 10  $\mu$ M de PD98059 (PD) 15 minutos previos al tratamiento con 0,5 nM de Bortezomib (BTZ) o vehículo (DMSO) durante 24 horas. **A)** El ARN total se extrajo y los niveles de expresión génica de VEGF y GAPDH se analizaron por qRT-PCR. Las diferencias estadísticas entre las condiciones, de tres experimentos independientes, se realizó por ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones ( $p < 0,05$ ). **B)** Los niveles de p-ERK1/2, ERK1/2 y Tubulina, utilizada como control de siembra, se analizaron por Western blot. Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes.

## DISCUSIÓN

El vGPCR activa diferentes vías de señalización celular que incluyen a PLC, PKC, MAPKs, PI3k/Akt/mTOR y NF- $\kappa$ B, implicadas en la regulación de la supervivencia celular e inflamación en células endoteliales (Montaner, 2007). En este trabajo de tesis se obtuvo evidencia demostrando que, al inhibir farmacológicamente a las proteínas quinasas ERK1/2 y p38, la proliferación de células endoteliales transformadas por la expresión del vGPCR disminuyó significativamente, indicando un destacado rol de estas quinasas en la proliferación celular. La inhibición farmacológica de JNK no tuvo efecto en la proliferación, lo que permite inferir que esta quinasa no se encuentra involucrada en los eventos desencadenados por ambos agonistas del VDR. En sustento de los resultados obtenidos, estudios realizados por Schwartz y colaboradores en otro modelo de células endoteliales tumorales, revelaron que el tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  disminuye la proliferación celular a través del aumento en la expresión del VDR y p27, acompañado por una disminución en la fosforilación de Akt y ERK1/2 (Schwartz et al., 2002). Otros grupos también han reportado que vías mitogénicas, como ERK1/2, también se vieron inhibidas por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Capiati et al., 2004; Park et al., 2000). También, Nonn y colaboradores demostraron que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  provoca un aumento en la expresión de la fosfatasa MKP-5 con la consecuente inactivación de p38 e IL-6, contribuyendo de esta manera al potencial anti-inflamatorio del metabolito hormonalmente activo en células de cáncer de próstata (Nonn et al., 2006). Los resultados obtenidos en este trabajo revelaron que tanto el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  como TX 527 provocan una disminución en la fosforilación de ERK1/2 y p38 sostenida en el tiempo acompañado por un aumento en la expresión de las fosfatasas específicas para ERK1/2 y p38, MKP-3 y MKP-5 respectivamente en las células que expresan el vGPCR. Sumado al mecanismo de acción inhibitorio, se encontró que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  disminuye la localización nuclear de ERK1/2 y p38 en su estado fosforilado afectando la función nuclear de las quinasas. A su vez, se demostró la participación del VDR en la regulación de la fosforilación de p38, expresión de MKP-3 y MKP-5, mientras que la regulación en la fosforilación de ERK1/2 fue independiente del VDR, posiblemente a través de un mecanismo regulatorio, no genómico, iniciado rápidamente en la

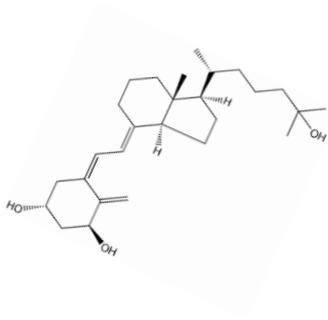
membrana. Como se describió anteriormente, el Bortezomib es un inhibidor potente y selectivo del proteasoma y de la vía de NF- $\kappa$ B. Se ha demostrado que, la inhibición del proteasoma bloquea la activación de NF- $\kappa$ B inducida por la quimioterapia, dando como resultado una quimiosensibilidad mejorada y un aumento de la apoptosis (Adams and Kauffman, 2004). En estudios previos del grupo, se demostró que el Bortezomib induce arresto del ciclo celular en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> acompañado por una disminución en la actividad nuclear de NF- $\kappa$ B en células endoteliales que expresan el vGPCR, y que el tratamiento combinado con TX 527 no potencia el efecto indicando que ambos compuestos actúan a través del mismo mecanismo (González-Pardo et al., 2014). En este trabajo de tesis, se indagó sobre el mecanismo inhibitorio del Bortezomib en la proliferación de células vGPCR. De manera similar a los agonistas del VDR, el Bortezomib indujo una disminución en la proliferación celular acompañado por cambios morfológicos en las células de características que pueden ser comparadas con la morfología de células apoptóticas. En otros tipos celulares donde se induce la apoptosis, también se han observado cambios en el citoesqueleto de actina. Por ejemplo, gypenosides, un compuesto natural de *Gynostemma pentaphyllum*, induce muerte celular y alteraciones en microfilamentos de actina en células de cáncer colorrectal humano, SW-480 (Yan et al., 2014). Además, se ha demostrado que la dexametasona colabora en la desorganización del citoesqueleto y de esta manera disminuye la tumorigenicidad de células de cáncer de mama humano, T47D (Meng and Yue, 2014). A su vez, a tiempos largos de tratamiento con Bortezomib, se observó una disminución en la fosforilación de ERK1/2 acompañada por un aumento en los niveles de MKP-3, la cual al acumularse podría estar provocando la desfosforilación de ERK1/2. A tiempos cortos de tratamiento la fosforilación de ERK1/2 mostró niveles fluctuantes pero no se observaron cambios en los niveles de MKP-3. Como ERK1/2 es sustrato de MKP-1 y MKP-2, la desfosforilación de ERK1/2 a tiempos cortos de tratamiento podría ser producido por acción de estas fosfatasas, las cuales son degradadas por el proteasoma (Boutros et al., 2008; Peng et al., 2010). MKP-1, es el producto de un gen temprano, el cual se traduce y se degrada rápidamente, lo que conduce a un aumento transitorio en los niveles de esta proteína. Consistente con esto, se ha demostrado que el Bortezomib induce la acumulación de MKP-1 en células MDA-MB-231, un efecto detectado incluso a las 4 horas de incubación (Patel et al., 2015). En resumen, un

aumento temprano y transitorio de MKP-1 seguido por un aumento similar de MKP-2 podría explicar las oscilaciones en niveles de p-ERK1/2 en el período de 1,5 a 16 horas. Estos cambios en la fosforilación de ERK1/2 por Bortezomib, fueron acompañados por modificaciones en su localización subcelular, observándose menos cantidad de ERK1/2 fosforilada en el núcleo luego de 24 horas de tratamiento con el compuesto. Se ha demostrado que, la fosfatasa MKP-3 además de tener su efecto clásico afectando la fosforilación de ERK1/2, puede también actuar sobre FOXO1, promoviendo su translocación al núcleo con la consecuente activación de genes clave, como por ejemplo, para las vías involucradas en la gluconeogénesis (Jiao et al., 2012; Wu et al., 2010). En contraposición al  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , el Bortezomib demostró regular a FOXO1 provocando una disminución en su fosforilación y un aumento en su expresión; evento que se traduce en la translocación de FOXO1 al compartimento nuclear. El proteasoma podría ser el encargado de la degradación de FOXO1, lo cual explicaría que al tratar a las células con Bortezomib se observe una acumulación del mismo debido a que no se puede degradar (Iwaihara et al., 2015; Jang et al., 2016). En apoyo a estos resultados, recientemente, se ha demostrado que la dexametasona, una sustancia sintética glucocorticoide, aumenta la expresión de la proteína MKP-3 tanto en cultivo de células de hepato-carcinoma como en hígado de ratón a través de un mecanismo que requiere la activación de FOXO1. Además, la sobreexpresión de FOXO1 es suficiente para inducir la expresión de MKP-3 (Feng et al., 2014). La creciente evidencia indica que, FOXO1 es necesario para la transcripción del inhibidor del ciclo celular p21 (Kloet et al., 2015; Mori Sequeiros García et al., 2013; Roy et al., 2010). Respaldado por estos reportes, los resultados de este trabajo indican que el Bortezomib provoca un aumento en la expresión del inhibidor del ciclo celular p21, por un mecanismo que no involucra a la quinasa ERK1/2 en las células vGPCR. Por lo tanto, es probable que se requiera la actividad de MKP-3 para la desfosforilación de FOXO1 en lugar de ERK1/2. Sin embargo, la vía de señalización implicada en la regulación de p21 parece ser variable de acuerdo al tipo celular. Por ejemplo, la droga antifúngica terbinafina disminuye los niveles de p-ERK1/2 e induce el aumento en la expresión de p21 con la consecuente detención del ciclo celular en cultivos de células endoteliales de cordón umbilical, dándole un rol activo a ERK1/2 en la modulación de p21 (Ho et al., 2008). Por el contrario, el promotor tumoral 12-Otetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) aumenta la

expresión de p21 en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, efecto que se vio bloqueado cuando se inhibió MEK1/2 en las células, indicando que la inducción en la expresión de p21 por TPA es por un mecanismo que involucra a ERK1/2 (Han et al., 2012). Estos estudios revelan que el Bortezomib puede inducir la expresión de p21, probablemente a través de un mecanismo que involucra a FOXO1 mediado por MKP-3. La expresión continua de vGPCR además de activar a las MAPKs promueve la expresión de varios factores, inclusive el VEGF (Martin & Gutkind, 2009). En este sentido, los resultados obtenidos revelaron que el Bortezomib reduce la expresión génica de VEGF a través de la disminución en la fosforilación, y consecuente actividad, de ERK1/2 provocada probablemente por acumulación y actividad de MKP-3.

## **CONCLUSIÓN**

En conjunto, estos resultados indican que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y el análogo TX 527 ejercen sus efectos antineoplásicos a través de la regulación de la fosforilación de las MAPKs ERK1/2 y p38 posiblemente a través de un aumento en la expresión de las fosfatasas específicas MKP-3 y MKP-5 respectivamente. Es más, el Bortezomib, en forma comparable a los agonistas del VDR, induce cambios en la supervivencia de células que expresan el vGPCR a través de la regulación de ERK1/2 y MKP-3. En contraposición a lo observado por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , el Bortezomib regula la activación de FOXO1 siendo parte de su mecanismo antineoplásico de acción. Esta diferencia puede deberse a que el Bortezomib además de inhibir la vía NF- $\kappa$ B regula otros eventos al inhibir el proteasoma.



## CAPITULO IV

Desarrollo de esferoides multicelulares a partir de células endoteliales y transformadas por el receptor vGPCR: Rol del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

## INTRODUCCIÓN

Los esferoides multicelulares (MCS) son agregados celulares que tienen complejas interacciones de tipo célula-célula y célula-matriz, esto da como resultado la generación de un gradiente de nutrientes, gases y factores de crecimiento que representa de mejor manera el microambiente celular presente en los tejidos vivos, en comparación con los cultivos celulares bidimensionales. En los cultivos en monocapa, las células se encuentran expuestas a una superficie sólida en el lado basal, a un líquido en la superficie apical y carecen de contacto con la matriz extracelular, con lo cual deben producir ajustes en su citoesqueleto para adherirse a la superficie sólida de cultivo y esto puede producir alteraciones en el metabolismo normal de las células y en la expresión de proteínas (Cui et al., 2017; Nath and Devi, 2016). Se ha observado que la arquitectura celular contribuye al buen funcionamiento de los tejidos vivos por lo que desde su descubrimiento, los esferoides multicelulares han sido utilizados para el estudio de una amplia gama de células, entre las cuales se encuentran diferentes tipos de células cancerosas (Wu et al., 2014), células madre mesenquimales y células madre pluripotentes (Lei and Schaffer, 2013).

El proceso de formación de los MCS consta de tres pasos importantes; (i) las células dispersas inicialmente se disponen cercanas para formar agregados sueltos debido a sus fibras de matriz extracelular de cadena larga, que les permiten unirse fuertemente a la integrina de la membrana celular. El contacto directo célula-célula, debido a la agregación inicial, da como resultado un aumento en la expresión de cadherina, (ii) la cadherina se acumula en la superficie de la membrana celular, y (iii) las células se compactan en agregados sólidos mediante interacciones entre las moléculas de cadherina, lo cual da como resultado MCS compactos (Lin et al., 2006). Los MCS tumorales se caracterizan por presentar dos componentes principales, uno corresponde a un área proliferativa de células neoplásicas y el otro al estroma de apoyo, el cual constituye la mitad de la masa de la mayoría de los tumores malignos y está formado por fibroblastos, células dendríticas, linfocitos, vasos sanguíneos, macrófagos, así como también otras células mieloides (Kimlin et al., 2013). Las células parenquimatosas determinan el crecimiento y la diferenciación de los esferoides

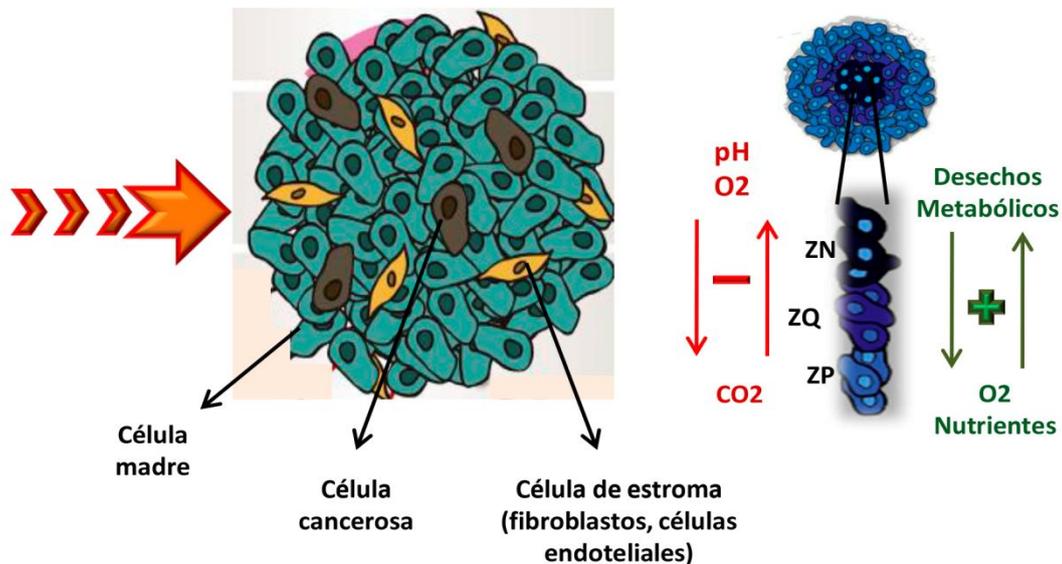
tumorales mientras que el estroma contribuye a la progresión tumoral, por lo tanto, el estroma tiene un papel crucial en el desarrollo y evolución de los MCS (Kim et al., 2004).

Se han desarrollado MCS con diferentes características estructurales, pero el tipo de esferoide desarrollado más comúnmente consta de tres capas diferenciadas; con células con proliferación asincrónica, células quiescentes y células necróticas. La región proliferativa, localizada en el borde externo del esferoide contiene células con núcleos intactos, abundantes microvellosidades y con un metabolismo celular activo. La capa adyacente o intermedia corresponde a la región quiescente, formada por células con un metabolismo muy bajo, núcleos contraídos y membranas hundidas. Las células de esta región se vuelven activas al exponerlas a nutrientes. La región interna o necrótica, está formada por células con núcleos y membranas desintegrados que han perdido sus actividades biológicas debido a la inanición sostenida y a la acumulación de desechos tóxicos (Alvarez-Pérez et al., 2005; Curcio et al., 2007) (**Figura IV**).

Basándonos en estos conocimientos previos, en este trabajo de tesis se investigó si las células endoteliales (SVEC) y las células que expresan el receptor viral acoplado a proteína G (vGPCR) tienen la capacidad de agregarse formando esferoides multicelulares. Por otra parte, se evaluó el efecto del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , con el fin de validar los resultados obtenidos con anterioridad en un cultivo celular bidimensional.



## ESFEROIDE MULTICELULAR



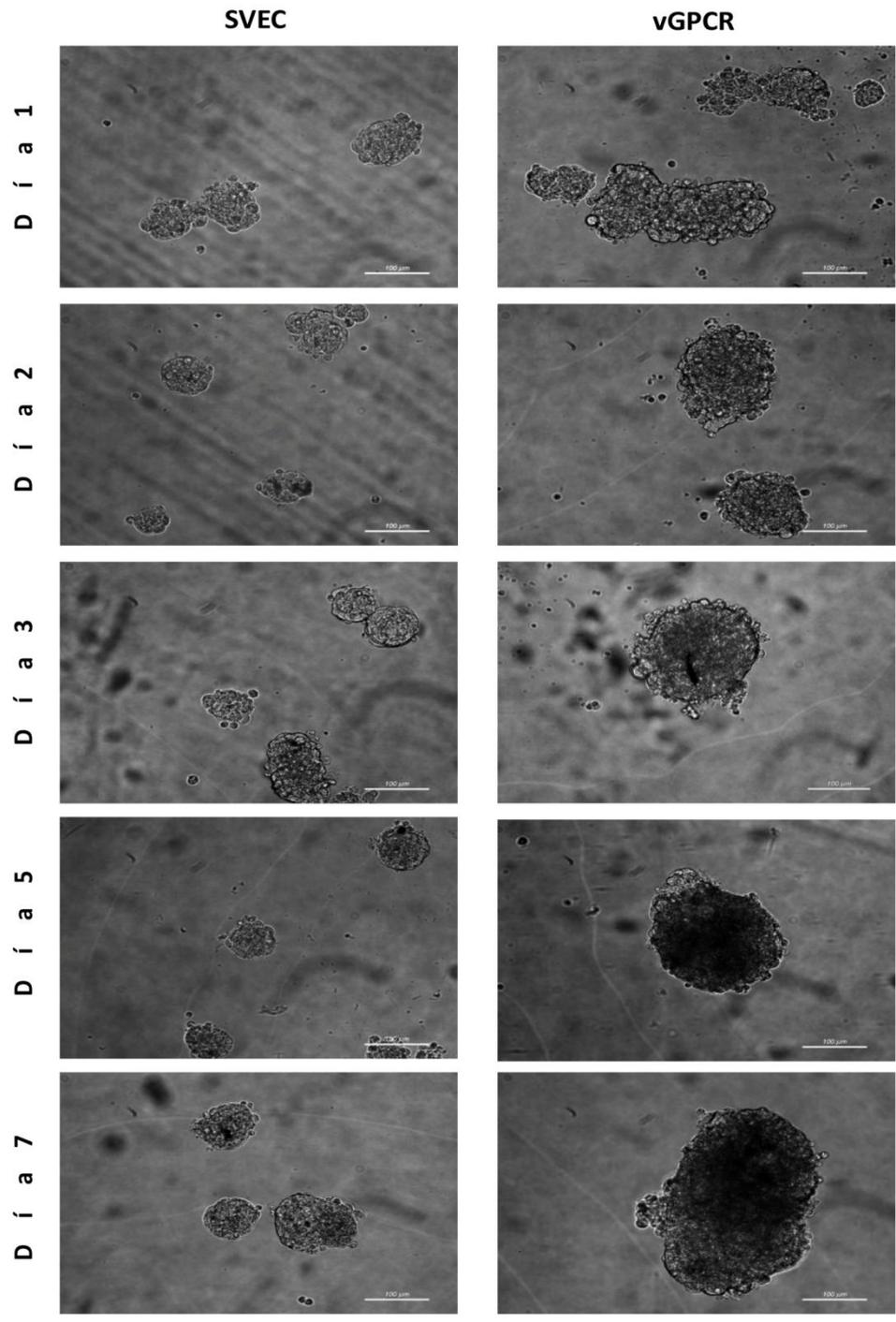
**Figura IV. Formación de esferoides multicelulares.** El proceso de formación de los MCS consta de tres pasos; (i) la integrina se une a la MEC, (ii) aumenta la expresión y acumulación de cadherina, (iii) aumentan las uniones cadherina-cadherina y los esferoides se compactan. Los MCS presentan heterogeneidad celular, representada por células cancerosas y estromales las cuales se encuentran en íntimo contacto entre sí. Las células cancerosas se disponen en tres zonas distinguibles por la morfología de sus células; zona proliferativa externa (ZP), zona quiescente media (ZQ) y zona necrótica interna (ZN). Hacia la zona externa de los esferoides hay mayores concentraciones de O<sub>2</sub> y nutrientes mientras que en regiones más internas prevalecen los desechos tóxicos metabólicos y CO<sub>2</sub>. Adaptado de Cui y col. (Cui et al., 2017).

## RESULTADOS

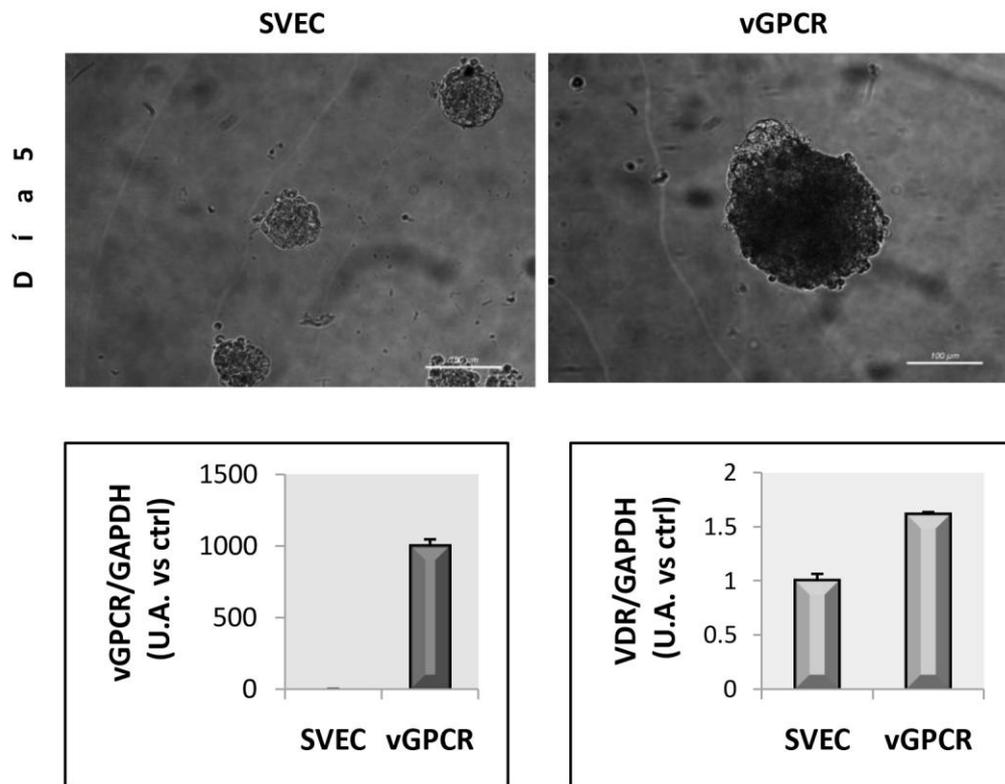
### ***Desarrollo de esferoides multicelulares a partir de células SVEC y vGPCR***

El cultivo celular en 3D se puede realizar sembrando a las células sobre matrices artificiales, que actúan como un soporte sólido para las células, y están compuestas por hidrogeles, fibras o perlas que se pueden producir con diferentes porosidades y características mecánicas para imitar a la matriz extracelular de tumores *in vivo* (Costa et al., 2016). Xu y colaboradores propusieron el uso de estructuras poliméricas para el desarrollo de esferoides multicelulares de cáncer de próstata humano (LNCaP) en una matriz de ácido hialurónico (Xu et al., 2012). Se han desarrollado matrices de alginatos, colágeno y agarosa para el desarrollo de esferoides de carcinoma de ovario (A2780), linfoblastos (EL4) y de células epiteliales (1308.1) (Shin et al., 2016). En base a estos antecedentes se investigó si las células endoteliales (SVEC) y transformadas por vGPCR tienen la capacidad de formar esferoides multicelulares al cultivarlas sobre una superficie sólida recubierta por un polímero no adherente. Para ello, se utilizaron placas de 96 pocillos (LIPIDURE-coatplate) con una superficie de baja adherencia, recubiertos por un polímero biocompatible que contiene fosfocolina (localizado en las membranas celulares). Las células SVEC y vGPCR se sembraron y cultivaron en DMEM suplementado con 10 y 5% de suero fetal bovino, respectivamente, y el desarrollo de esferoides se siguió en el tiempo. En la **Figura IV-1**, se muestran micrografías representativas de la formación de esferoides a partir de las 24 horas desde la siembra de las células SVEC y vGPCR (día 1) hasta el día 7, obtenidas a partir de un microscopio de luz invertida. Se observó que ambas líneas celulares se agregaron formando MCS pero el comportamiento de cada línea celular fue diferente. En el caso de las células SVEC, se vio una agregación celular más acelerada, observándose pequeños esferoides a partir de las 24 horas de cultivo (día 1), estos a pesar de agregarse rápidamente, no aumentaron considerablemente su tamaño, 50  $\mu\text{m}$  aproximadamente en los días subsiguientes. Mientras que las células vGPCR mostraron una agregación celular más lenta al comienzo, observándose esferoides de mayor tamaño a partir de las 48 horas

de cultivo (día 2) en comparación con las SVEC. Finalmente, al séptimo día de crecimiento, se observó que los esferoides generados a partir de las células vGPCR tomaron un tamaño considerable, más de 300  $\mu\text{m}$ . Se eligió el día cinco de crecimiento para realizar los posteriores estudios, día en el cual los esferoides mostraron un tamaño aproximado de 200  $\mu\text{m}$  y presentaron menos heterogeneidad de tamaño entre ellos. La expresión estable del vGPCR es necesaria para el desarrollo de la malignidad celular (Martin and Gutkind, 2008). Resultados previos del grupo evidenciaron que en cultivos en monocapa de células vGPCR se observó un aumento en la expresión del VDR con respecto a las células SVEC (Gonzalez-Pardo et al., 2010). Con el fin de validar los resultados obtenidos en cultivos en monocapa en el modelo de cultivo en 3D, se analizó la expresión del mensajero del gen vGPCR y VDR por qRT-PCR en esferoides formados a partir de las células SVEC y vGPCR al quinto de crecimiento (**Figura IV-2**). Al igual que en el cultivo celular en monocapa, los niveles de expresión del vGPCR fueron muy elevados en los esferoides obtenidos de la línea celular vGPCR con respecto a las células SVEC, las cuales no expresan el receptor. La expresión del VDR se encontró significativamente aumentada con respecto a las SVEC como previamente había sido reportado en nuestro grupo.



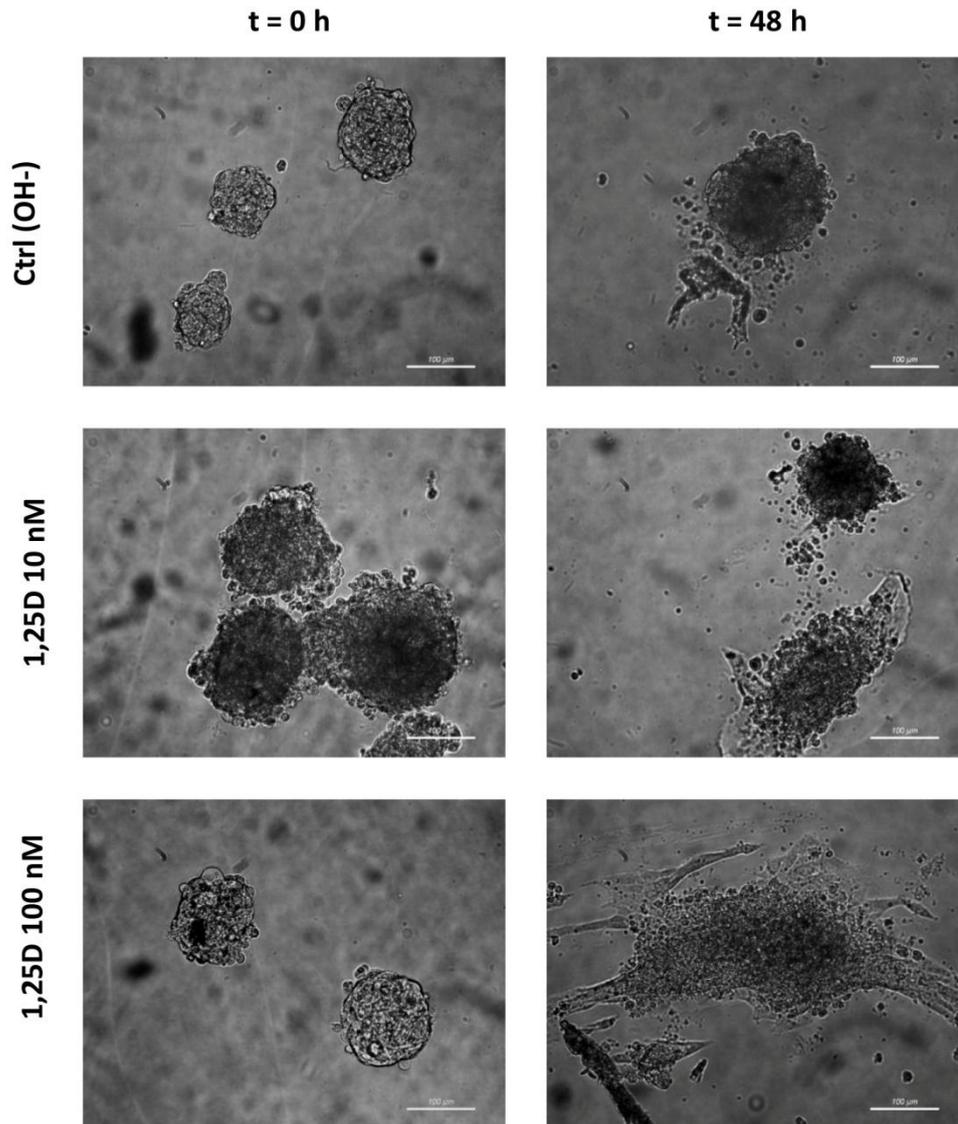
**Figura IV-1. Desarrollo de esferoides multicelulares en células SVEC y vGPCR.** Las células SVEC o vGPCR, en una densidad de 2,500 células por pocillo, se cultivaron en DMEM 10 y 5% de SFB respectivamente. Se tomaron micrografías en un microscopio invertido de campo claro a los días 1, 2, 3, 5 y 7 de crecimiento. Se muestran micrografías representativas de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Barra = 100  $\mu$ m, Magnificación: 200x.



**Figura IV-2. Expresión de vGPCR y VDR en MCS de células SVEC y vGPCR.** Las células SVEC y vGPCR se sembraron como en la Fig.IV-1 y se emplearon esferoides formados al quinto día. Luego, los esferoides se colectaron y se extrajo el ARN total para analizar los niveles de expresión de vGPCR y VDR a partir del ADNc por qRT-PCR. Para normalizar los niveles de expresión se empleó GAPDH. Los gráficos de barra muestran la cuantificación de vGPCR y VDR en unidades arbitrarias (U.A.).

### ***El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ promueve cambios morfológicos en esferoides de células vGPCR***

Se investigó el efecto del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sobre el crecimiento de MCS a partir de células vGPCR. Para ello, los esferoides, en el quinto día de crecimiento, se trataron con concentraciones crecientes de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (0,1-100 nM) o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas. Se registraron micrografías y se evaluó la morfología de los esferoides por microscopia de campo claro al comienzo y finalización del tratamiento (**Figura IV-3**). Al inicio del tratamiento, tiempo cero, los esferoides controles se observaron compactos con un tamaño promedio en todas las condiciones, los cuales no variaron cualitativamente al tiempo de finalización del experimento (48 h). El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , a una concentración de 10 nM, desencadenó un cambio en la estructura de los esferoides, las células adoptaron una disposición más laxa y algunos esferoides se disgregaron, mientras que a concentración mayor, 100 nM, la arquitectura de los esferoides en la mayoría de los casos se observó dañada y las células comenzaron a separarse adoptando una distribución en monocapa, disposición que se asemeja a la etapa de formación de esferoide.



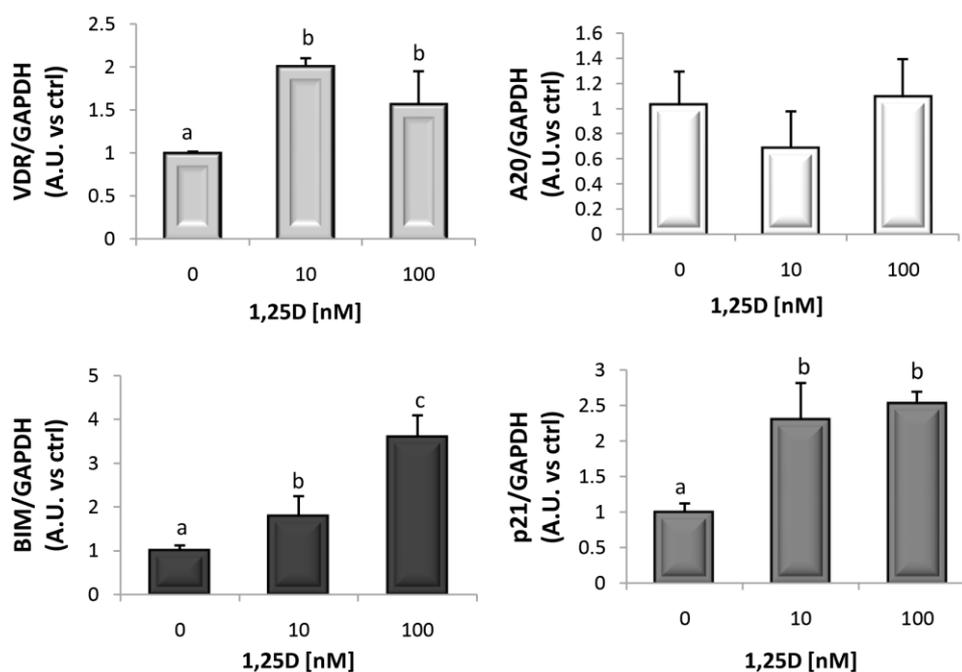
**Figura IV-3. El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induce cambios en la morfología de esferoides multicelulares obtenidos de células vGPCR.** Las células vGPCR se sembraron como en la Fig.IV-1, transcurridos cinco días de crecimiento, los esferoides se trataron con concentraciones crecientes de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D, 10-100 nM) o vehículo (ctrl, 0,01% de etanol) durante 48 horas. Se tomaron micrografías en un microscopio invertido de campo claro al inicio y final del tratamiento. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes. Barra = 100  $\mu\text{m}$ , Magnificación: 200x.

## ***El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce apoptosis en esferoides obtenidos de células vGPCR***

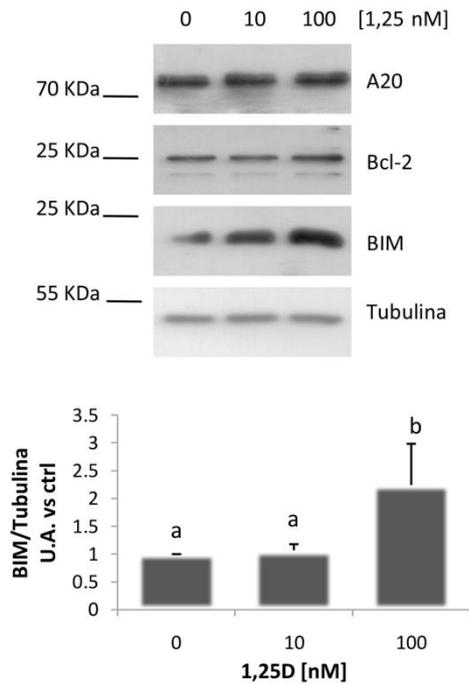
En resultados previos observamos que, el tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en células vGPCR cultivadas en monocapa, induce arresto en el ciclo celular con la consecuente inducción de la apoptosis (González-Pardo et al., 2014). Además, en este trabajo de tesis se determinó que la apoptosis es desencadenada por un desbalance entre las proteínas anti- y pro-apoptóticas, con disminución de A20 y aumento de BIM (Capítulo I). En primer lugar, se evaluó la efectividad del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en inducir la expresión de su propio receptor (VDR) en estudios dosis respuesta, y en segundo lugar, se analizó la expresión de A20, BIM y la proteína inhibitoria del ciclo celular p21 en esferoides obtenidos de células vGPCR. Para ello, los esferoides fueron tratados con concentraciones crecientes de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (10-100 nM) o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas. Se extrajo el ARN total y se retro transcribió a ADNc para luego evaluar los niveles de expresión génica del VDR, A20, BIM y p21 por qRT-PCR (**Figura IV-4**). Los esferoides tratados con concentraciones crecientes de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  mostraron un aumento significativo en la expresión de VDR, BIM y p21, sin embargo, aunque a 10 nM se observa una disminución de A20, esta no fue significativa. Los resultados obtenidos concuerdan con lo observado en células vGPCR cultivadas en monocapa; salvo por A20, el cual se mostró altamente expresado en estado basal en células vGPCR y disminuyó significativamente por el tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . En experimentos en paralelo, se evaluaron los niveles de proteínas involucradas en el desarrollo de eventos apoptóticos observados en células vGPCR cultivadas en monocapa. Los niveles de expresión proteica de A20, Bcl-2 y BIM se analizaron por Western blot (**Figura IV-5**). Los resultados obtenidos muestran un aumento en los niveles proteicos de BIM al tratar a las células con 100 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . En cultivos en monocapa, el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  indujo un aumento de BIM a 10 nM. Los resultados obtenidos en esferoides cultivados en un modelo tridimensional sugieren la utilización de una concentración mayor de agonista para lograr el efecto.

Como se mencionó previamente en capítulos anteriores, las vías de señalización involucradas en la proliferación, ERK1/2, y supervivencia PI3k/Akt, se encuentran activas en células transformadas por la infección con KSHV (Zhu et al., 2011). En el

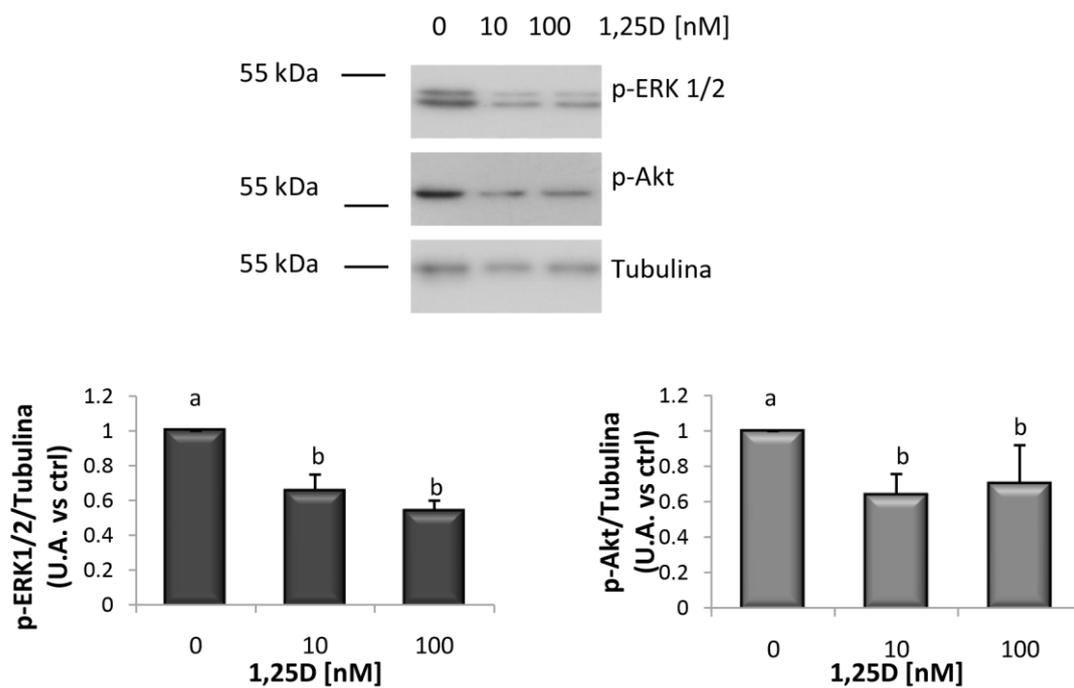
capítulo II y III, se demostró que Akt y ERK1/2 se encuentran fosforiladas y activas en células que expresan el receptor vGPCR cultivadas en monocapa y que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  disminuye la fosforilación de ambas quinasas con la consecuente disminución de la proliferación. Por tal motivo, a continuación se evaluó si el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  modula el estado de fosforilación de ERK1/2 y Akt en los esferoides de células vGPCR como parte de su mecanismo de acción antineoplásico. Para ello, los esferoides se trataron con concentraciones crecientes de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  durante 48 horas como se mencionó anteriormente (**Figura IV-6**). Luego, el estado de fosforilación de ambas quinasas, ERK1/2 y Akt, se analizó por Western blot. Los resultados obtenidos muestran que la fosforilación de ERK1/2 y Akt disminuyó al aumentar la concentración de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .



**Figura IV-4. El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  desencadena eventos apoptóticos en esferoides a través de la inducción de BIM, p21 y VDR.** Las células vGPCR se sembraron como en la Fig.IV-1, transcurridos cinco días de crecimiento, los esferoides obtenidos se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D, 10-100 nM) o vehículo durante 48 horas. Se extrajo el ARN total para evaluar los niveles de expresión de VDR, A20, BIM y p21 por qRT-PCR y se empleó GAPDH para normalizar los valores de expresión. La cuantificación correspondiente a tres experimentos independientes se representa en gráficos de barra. Las diferencias entre las condiciones se analizaron por ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni. Las diferentes letras indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$  para A20 y un  $p < 0,01$  para p21, BIM y VDR.



**Figura IV-5. El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induce cambios en la expresión de proteínas involucradas en la inducción de la apoptosis.** Los esferoides obtenidos se cultivaron y trataron como en la Fig. IV-4. A partir de las proteínas totales se evaluaron los niveles proteicos de BIM, A20 y Bcl-2 por Western blot y se utilizó Tubulina como control de siembra. La cuantificación de los resultados obtenidos a partir de cuatro experimentos independientes se muestra representada en un gráfico de barras en donde las diferencias entre condiciones fueron evaluadas por un análisis ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni. Las diferentes letras indican distinta significancia ( $p < 0,05$ ).



**Figura IV-6.** El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibe la fosforilación de Akt y ERK1/2 en esferoides obtenidos a partir de células vGPCR. Los esferoides obtenidos se cultivaron y trataron como en la en la Fig. IV-4. Se evaluó el estado de fosforilación de ERK1/2 y Akt y por Western blot y se utilizó Tubulina como control de siembra. Se muestra un blot representativo de cuatro experimentos independientes y su respectiva cuantificación. Las diferencias entre condiciones se analizaron por ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni. Las diferentes letras indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

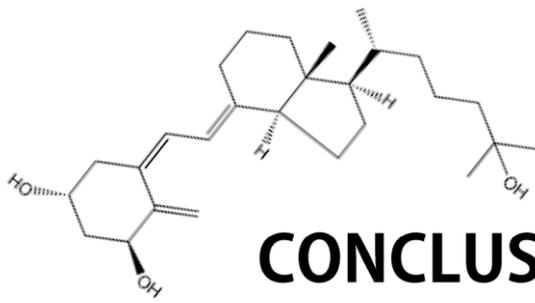
## DISCUSIÓN

Durante muchos años se han utilizado cultivos *in vitro* bidimensionales, células en monocapa, como una herramienta para la investigación de diferentes parámetros biológicos y su potencial acción terapéutica en diferentes enfermedades (Costa et al., 2016). La facilidad de manejo de este tipo de cultivo, la rentabilidad, buena reproducibilidad y capacidad de crecimiento de una gran cantidad de células diferentes, hace que los cultivos en 2D sean los más utilizados para ensayos pre-clínicos *in vitro* utilizados para el desarrollo de fármacos (Breslin and O'Driscoll, 2013). Sin embargo, dado que las células crecen sobre una superficie sólida, no se reproduce la morfología y las características bioquímicas que las células poseen en el tejido original. Esto resulta un problema a la hora de extrapolar resultados desde un sistema *in vitro* a un modelo *in vivo*, ya que el contexto en el que se encuentran las células es muy diferente. En los últimos años, ha tomado relevancia el desarrollo de cultivos celulares *in vitro* tridimensionales, esferoides multicelulares, en los cuales se pueden estudiar eventos celulares con más reproducibilidad en el sistema vivo (Andrei, 2006; Edelman and Keefer, 2005). Hasta el presente, se han desarrollado diferentes técnicas que permiten la producción de agregados celulares en 3D constituidos por células cancerosas u otros tipos celulares (Carvalho et al., 2016; Costa et al., 2014; Timmins & Nielsen, 2007; Wu et al., 2008). En este trabajo de tesis, se desarrolló un método simple de obtención de esferoides multicelulares, a partir de células endoteliales que expresan el vGPCR crecidas en una superficie de baja adherencia. Los resultados proporcionan evidencia convincente de que la expresión del vGPCR es vital para la agregación de células y la formación de los esferoides, ya que células endoteliales sin expresión de dicho receptor (SVEC) mostraron agrupamientos celulares de crecimiento rápido pero sin aumento de tamaño con el transcurso del tiempo. Cheng y colaboradores desarrollaron un modelo celular tridimensional, como parte del estudio de la transición endotelio mesenquimal en células endoteliales linfáticas infectadas con el virus KSHV como modelo de sarcoma de Kaposi. Observaron que dicha transformación fue iniciada por las proteínas virales, vFLIP y vGPCR, a través de la activación de la vía Notch y participación de la metaloproteínasa de matriz tipo I (MT1-

MMP) (Cheng et al., 2011). Este reporte aporta evidencia que respalda la importancia del vGPCR en el desarrollo de esferoides multicelulares en células endoteliales transformadas. La expresión basal alta de VDR observada previamente en cultivos en monocapa de células vGPCR (Gonzalez-Pardo et al., 2010) se verificó en los MCS originados a partir de estas células demostrando un comportamiento similar del VDR en este modelo 3D. El tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  desensambló la morfología de los MCS que expresan el vGPCR y aumentó la expresión del gen VDR, BIM y p21. A su vez, el aumento en la expresión génica de BIM fue acompañado por un incremento en sus niveles proteicos. A20, por su parte, no mostró variaciones significativas en su expresión génica y proteica luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , al igual que la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Asimismo, los MCS mostraron una disminución en el estado de fosforilación de Akt y ERK1/2, efecto que contribuye a los efectos anti-proliferativos del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en forma similar a lo observado en células vGPCR crecidas en monocapa.

## **CONCLUSIÓN**

En conjunto, se desarrolló un método simple para obtener esferoides a partir de las células endoteliales que expresan el vGPCR. Los esferoides obtenidos respondieron al tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  respaldando resultados previos obtenidos en cultivos en monocapa en este trabajo de tesis. En particular, el tratamiento de esferoides de células vGPCR con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  provocó un efecto antineoplásico por inhibición de la vías ERK1/2 y Akt acompañado de la inducción de vías apoptóticas.



## CONCLUSIONES GENERALES

---

---

## CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis contribuyen al conocimiento del mecanismo de acción antiproliferativo del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y su análogo menos calcemiante TX 527 en un modelo celular de sarcoma de Kaposi. A su vez, sustenta las bases para dar continuación a otros estudios en modelos *in vivo* y evaluar su potencial aplicación, sólo o en combinación con Bortezomib, en el tratamiento de esta patología **(Conclusión gráfica)**.

➤ El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y su análogo menos calcemiante TX 527 inducen un desbalance de proteínas pertenecientes a la familia de proteínas Bcl-2, evento que desencadena la apoptosis en células SVEC y vGPCR:

- El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 inducen expresión de BIM, atenúa la expresión génica y proteica de A20 en células SVEC y vGPCR, a través de un mecanismo que depende del VDR, e independiente ERK1/2, Akt, FOXO3a y FOXO1.

- El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 regulan la activación de BAD, en células vGPCR, regulando su fosforilación en el residuo serina 112.

- El tratamiento con ambos agonistas, en células vGPCR, atenúa la expresión génica y proteica de A20 por un mecanismo que depende del VDR.

➤ El Bortezomib induce la apoptosis regulando el balance de proteínas anti- y pro-apoptóticas similarmente a los agonistas del VDR. En células endoteliales (SVEC) el tratamiento con Bortezomib aumentó los niveles proteicos de caspasa-3 clivada y BIM, mientras que en células vGPCR también redujo los niveles proteicos de A20. Las proteínas Bcl-2 y Bax no mostraron variaciones con el tratamiento en ambas líneas celulares.

➤ El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 inducen la autofagia por inhibición del eje PI3K/Akt/mTOR:

- Ambos agonistas ejercen sus efectos anti-proliferativos a través de un mecanismo que depende de la inactivación de Akt, disminuyendo su estado de fosforilación y la translocación de su forma activa al núcleo por un mecanismo dependiente del VDR.

- El Bortezomib disminuye la activación de Akt de manera similar a los agonistas del VDR, sugiriendo la participación de la vía NF- $\kappa$ B en este evento.

- Ambos agonistas regulan la expresión génica y proteica de BECN1, regulador dual de la apoptosis y autofagia.

-El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 inhiben la fosforilación de mTOR y provocan un incremento en los niveles de LC3-II, en forma dependiente del VDR.

➤ El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 ejercen sus efectos antiproliferativos a través de la inactivación de las MAPKs, ERK1/2 y p38:

- El tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  disminuyó la translocación de la forma activa de estas quinasas al núcleo. A su vez, ambos agonistas incrementaron los niveles proteicos de las fosfatasa, MKP-3 y MKP-5, sugiriendo que dicho incremento regula la inactivación de las quinasas ERK1/2 y p38, respectivamente.

- La regulación de p38, MKP-3 y MKP-5 por el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527, es por un mecanismo dependiente del VDR, no así ERK1/2. La regulación de ERK1/2 podría estar mediada por eventos no genómicos o rápidos iniciados en la membrana plasmática.

➤ El Bortezomib, en forma comparable a los agonistas de VDR, disminuye el número de células vGPCR :

- El Bortezomib en células vGPCR indujo una disminución en la fosforilación de ERK1/2 y translocación de la forma activa de esta proteína al núcleo. Estos cambios fueron acompañados de un incremento en los niveles proteicos de MKP-3 a partir de las 16 horas de tratamiento, permitiendo inferir que la regulación en la activación de ERK1/2 a tiempos cortos tendría una regulación diferente.

- El Bortezomib, disminuye la fosforilación de FOXO1 y aumenta la translocación de su forma inactiva al núcleo. Por otra parte, provoca un aumento en los niveles de expresión génica de p21 y una disminución de VEGF, procesos regulados por ERK1/2.

➤ Las células endoteliales (SVEC) y transformadas por el receptor viral (vGPCR) desarrollaron esferoides multicelulares al cultivarlas en una superficie de baja

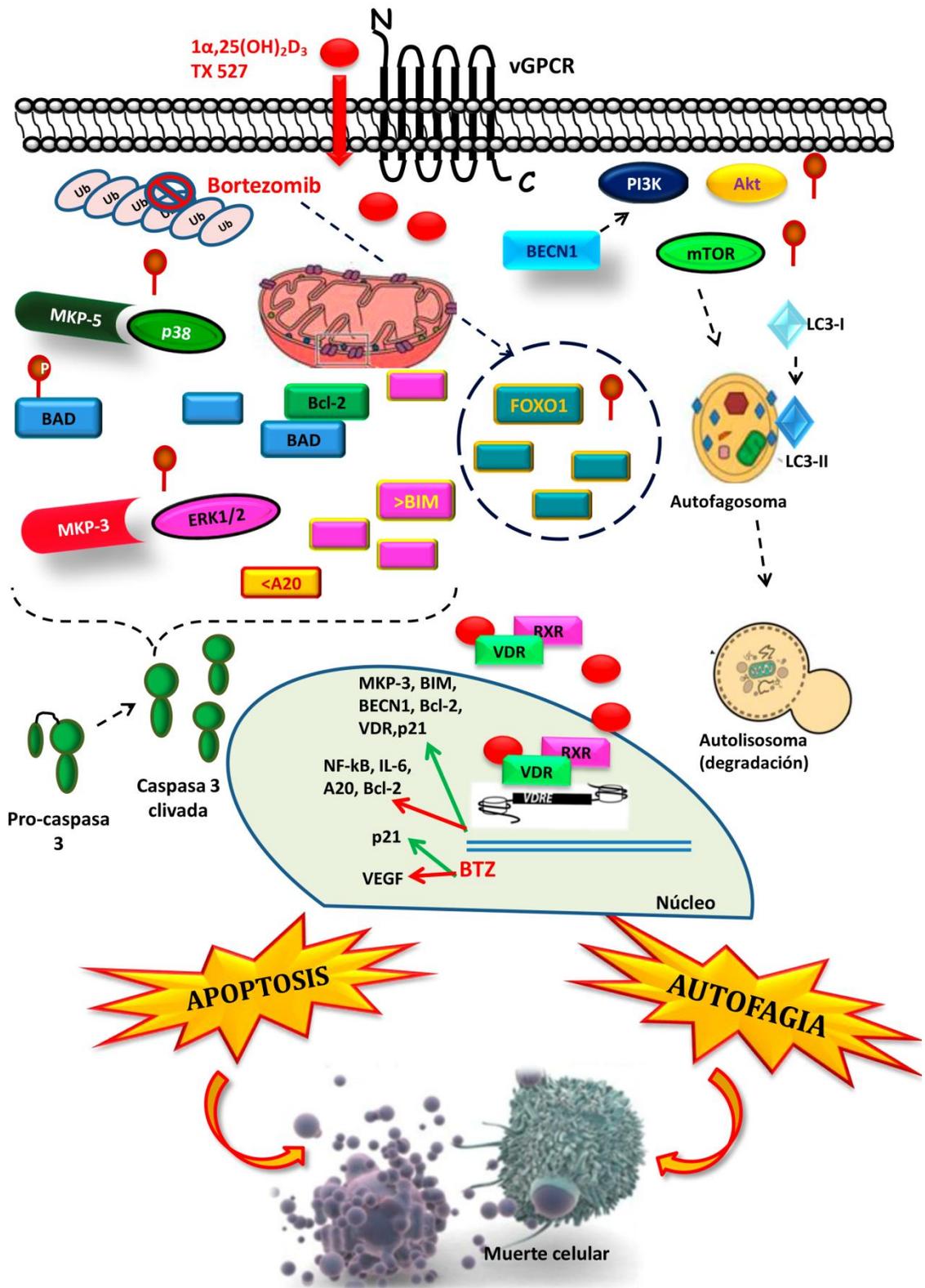
adherencia. Las líneas celulares mostraron diferente patrón de formación de los esferoides:

- Los esferoides obtenidos a partir de células vGPCR presentan mayor expresión génica de vGPCR y VDR, al igual que en los cultivos celulares en monocapa.

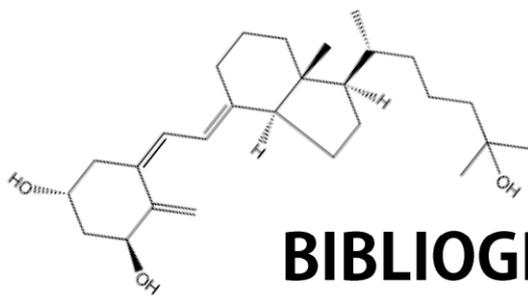
- El tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  indujo cambios morfológicos en los esferoides multicelulares obtenidos a partir de células vGPCR.

- El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  indujo apoptosis en esferoides obtenidos de células vGPCR, evidenciándose por un aumento en los niveles de expresión génica del VDR, BIM y p21, pero no de A20. Al analizar los perfiles proteicos, se observó un aumento de BIM, mientras que A20 y Bcl-2 no mostraron variaciones al aumentar la dosis del agonista.

- El tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  disminuyó la activación de las proteínas ERK1/2 y Akt, de manera similar al efecto observado en células vGPCR cultivadas en monocapa.



Conclusión gráfica: Mecanismo de acción de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527 en un modelo celular de sarcoma de Kaposi.



## BIBLIOGRAFÍA

---

---

## BIBLIOGRAFÍA

### A

- Abboud, E.R., Shelby, B.D., Angelova, M., Nelson, A.B., Ferris, M., McFerrin, H.E., Morris, C.A., Sullivan, D.E., 2013. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus g protein-coupled receptor enhances endothelial cell survival in part by upregulation of bcl-2. *Ochsner J.* 13, 66–75.
- Adams, J., Kauffman, M., 2004. Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest.* 22, 304–11. <https://doi.org/10.1081/CNV-120030218>
- Alvarez-Pérez, J., Ballesteros, P., Cerdán, S., 2005. Microscopic images of intraspheroidal pH by 1H magnetic resonance chemical shift imaging of pH sensitive indicators. *MAGMA* 18, 293–301. <https://doi.org/10.1007/s10334-005-0013-z>
- An, B.-S., Tavera-Mendoza, L.E., Dimitrov, V., Wang, X., Calderon, M.R., Wang, H.-J., White, J.H., 2010. Stimulation of Sirt1-Regulated FoxO Protein Function by the Ligand-Bound Vitamin D Receptor. *Mol. Cell. Biol.* 30, 4890–4900. <https://doi.org/10.1128/MCB.00180-10>
- Andrei, G., 2006. Three-dimensional culture models for human viral diseases and antiviral drug development. *Antiviral Res.* 71, 96–107. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.05.023>
- Angelova, M., Ferris, M., Swan, K.F., McFerrin, H.E., Pridjian, G., Morris, C.A., Sullivan, D.E., 2014. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G-protein coupled receptor activates the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Virology J.* 11, 218. <https://doi.org/10.1186/s12985-014-0218-8>
- Arzumanyan, A., Friedman, T., Ng, I.O.L., Clayton, M.M., Lian, Z., Feitelson, M.A., 2011. Does the Hepatitis B Antigen HBx Promote the Appearance of Liver Cancer Stem Cells? *Cancer Res.* 71, 3701–3708. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3951>
- Audo, I., Darjatmoko, S.R., Schlamp, C.L., Lokken, J.M., Lindstrom, M.J., Albert, D.M., Nickells, R.W., 2003. Vitamin D analogues increase p53, p21, and apoptosis in a xenograft model of human retinoblastoma. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 4192–4199. <https://doi.org/10.1167/iovs.02-1198>

### B

- Bialik, S., Zalckvar, E., Ber, Y., Rubinstein, A.D., Kimchi, A., 2010. Systems biology analysis of programmed cell death. *Trends Biochem. Sci.* 35, 556–64.

<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.008>

Bikle, D.D., 2014. Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chem. Biol.* 21, 319–329. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.12.016>

Bikle, D.D., 2010. Vitamin D: newly discovered actions require reconsideration of physiologic requirements. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 375–84. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.01.003>

Blackburn, C., Gigstad, K.M., Hales, P., Garcia, K., Jones, M., Bruzzese, F.J., Barrett, C., Liu, J.X., Soucy, T.A., Sappal, D.S., Bump, N., Olhava, E.J., Fleming, P., Dick, L.R., Tsu, C., Sintchak, M.D., Blank, J.L., 2010. Characterization of a new series of non-covalent proteasome inhibitors with exquisite potency and selectivity for the 20S  $\beta$ 5-subunit. *Biochem. J.* 430, 461–476. <https://doi.org/10.1042/BJ20100383>

Boutros, T., Chevet, E., Metrakos, P., 2008. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 60, 261–310. <https://doi.org/10.1124/pr.107.00106>

Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., Ghissassi, F. El, Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., Cogliano, V., 2009. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 10, 321–322. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70096-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70096-8)

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Breslin, S., O'Driscoll, L., 2013. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov. Today* 18, 240–9. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.003>

Buschke, S., Stark, H.-J., Cerezo, A., Prätzel-Wunder, S., Boehnke, K., Kollar, J., Langbein, L., Heldin, C.-H., Boukamp, P., 2011. A decisive function of transforming growth factor- $\beta$ /Smad signaling in tissue morphogenesis and differentiation of human HaCaT keratinocytes. *Mol. Biol. Cell* 22, 782–794. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-11-0879>

## C

Capiati, D.A., Rossi, A.M., Picotto, G., Benassati, S., Boland, R.L., 2004. Inhibition of serum-stimulated mitogen activated protein kinase by 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ -vitamin D $_3$  in MCF-7 breast cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 93, 384–397. <https://doi.org/10.1002/jcb.20165>

Cargnello, M., Roux, P.P., 2011. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 50–

83. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10>
- Carlberg, C., Seuter, S., 2007. The Vitamin D Receptor. *Dermatol. Clin.* 25, 515–523. <https://doi.org/10.1016/j.det.2007.06.004>
- Carvalho, M.P., Costa, E.C., Miguel, S.P., Correia, I.J., 2016. Tumor spheroid assembly on hyaluronic acid-based structures: A review. *Carbohydr. Polym.* 150, 139–48. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.005>
- Catrysse, L., Vereecke, L., Beyaert, R., van Loo, G., 2014. A20 in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol.* 35, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.10.005>
- Caunt, C.J., Keyse, S.M., 2013. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs). *FEBS J.* 280, 489–504. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08716.x>
- Cavallin, L.E., Goldschmidt-Clermont, P., Mesri, E.A., 2014. Molecular and Cellular Mechanisms of KSHV Oncogenesis of Kaposi's Sarcoma Associated with HIV/AIDS. *PLoS Pathog.* 10, e1004154. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004154>
- Cavallin, L.E., Ma, Q., Naipauer, J., Gupta, S., Kurian, M., Locatelli, P., Romanelli, P., Nadji, M., Goldschmidt-Clermont, P.J., Mesri, E.A., 2018. KSHV-induced ligand mediated activation of PDGF receptor- $\alpha$  drives Kaposi's sarcomagenesis. *PLoS Pathog.* 14, 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007175>
- Chen, K.-F., Yeh, P.-Y., Yeh, K.-H., Lu, Y.-S., Huang, S.-Y., Cheng, A.-L., 2008. Down-regulation of Phospho-Akt Is a Major Molecular Determinant of Bortezomib-Induced Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Cancer Res.* 68, 6698–6707. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0257>
- Chen, N., Karantza-Wadsworth, V., 2009. Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 1516–23. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.12.013>
- Chen, Y., Zhang, J., Ge, X., Du, J., Deb, D.K., Li, Y.C., 2013. Vitamin D receptor inhibits nuclear factor  $\kappa$ b activation by interacting with I $\kappa$ B kinase  $\beta$  protein. *J. Biol. Chem.* 288, 19450–19458. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.467670>
- Cheng, F., Pekkonen, P., Laurinavicius, S., Sugiyama, N., Henderson, S., Günther, T., Rantanen, V., Kaivanto, E., Aavikko, M., Sarek, G., Hautaniemi, S., Biberfeld, P., Aaltonen, L., Grundhoff, A., Boshoff, C., Alitalo, K., Lehti, K., Ojala, P.M., 2011. KSHV-Initiated Notch Activation Leads to Membrane-Type-1 Matrix Metalloproteinase-Dependent Lymphatic Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *Cell Host Microbe* 10, 577–590. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.011>
- Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., Verlinden, L., Carmeliet, G., 2016. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol. Rev.* 96, 365–408. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2015>
- Chun, R.F., Liu, P.T., Modlin, R.L., Adams, J.S., Hewison, M., 2014. Impact of vitamin D on immune function: Lessons learned from genome-wide analysis. *Front. Physiol.*

5 APR, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00151>

- Cohen-Lahav, M., Shany, S., Tobvin, D., Chaimovitz, C., Douvdevani, A., 2006. Vitamin D decreases NF $\kappa$ B activity by increasing I $\kappa$ B $\alpha$  levels. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21, 889–897. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfi254>
- Compagno, M., Lim, W.K., Grunn, A., Nandula, S. V., Brahmachary, M., Shen, Q., Bertoni, F., Ponzoni, M., Scandurra, M., Califano, A., Bhagat, G., Chadburn, A., Dalla-Favera, R., Pasqualucci, L., 2009. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 459, 717–21. <https://doi.org/10.1038/nature07968>
- Cory, S., Huang, D.C.S., Adams, J.M., 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590–8607. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207102>
- Cossa, G., Gatti, L., Cassinelli, G., Lanzi, C., Zaffaroni, N., Perego, P., 2013. Modulation of sensitivity to antitumor agents by targeting the MAPK survival pathway. *Curr. Pharm. Des.* 19, 883–94. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10>
- Costa, E.C., Gaspar, V.M., Coutinho, P., Correia, I.J., 2014. Optimization of liquid overlay technique to formulate heterogenic 3D co-cultures models. *Biotechnol. Bioeng.* 111, 1672–85. <https://doi.org/10.1002/bit.25210>
- Costa, E.C., Moreira, A.F., de Melo-Diogo, D., Gaspar, V.M., Carvalho, M.P., Correia, I.J., 2016. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol. Adv.* 34, 1427–1441. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.002>
- Costas, M.A., Rubio, M.F., 2017. Autofagia, una estrategia de supervivencia celular. *Med. (Buenos Aires)* 77, 314–320.
- Cui, X., Hartanto, Y., Zhang, H., 2017. Advances in multicellular spheroids formation. *J. R. Soc. Interface* 14, 20160877. <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0877>
- Curcio, E., Salerno, S., Barbieri, G., De Bartolo, L., Drioli, E., Bader, A., 2007. Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system. *Biomaterials* 28, 5487–97. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.08.033>
- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., Adams, J.M., 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 49–63. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>

## D

- De Castro Kroner, J., Sommer, A., Fabri, M., 2015. Vitamin D every day to keep the infection away? *Nutrients* 7, 4170–4188. <https://doi.org/10.3390/nu7064170>
- De Luca, A., Maiello, M.R., D'Alessio, A., Pergameno, M., Normanno, N., 2012. The

RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin. Ther. Targets* 16 Suppl 2, S17-27. <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.639361>

de Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., Plummer, M., 2012. Chronic disease management in ageing populations. *Lancet* 379, 1851. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70137-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70137-7)

Deeb, K.K., Trump, D.L., Johnson, C.S., 2007. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* 7, 684–700. <https://doi.org/10.1038/nrc2196>

Delbridge, A.R.D., Strasser, A., 2015. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ.* 22, 1071–1080. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.50>

DeLuca, H.F., 2014. History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *Bonekey Rep.* 3, 1–8. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2013.213>

Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., Kolch, W., 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279–90. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210421>

Díaz, L., Díaz-Muñoz, M., García-Gaytán, A., Méndez, I., 2015. Mechanistic Effects of Calcitriol in Cancer Biology. *Nutrients* 7, 5020–5050. <https://doi.org/10.3390/nu7065020>

Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.-W.W., Koenderman, L., Coffey, P.J., 2000. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr. Biol.* 10, 1201–4. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00728-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00728-4)

Dorsam, R.T., Gutkind, J.S., 2007. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 79–94. <https://doi.org/10.1038/nrc2069>

Duprez, L., Wirawan, E., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., 2009. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect.* 11, 1050–62. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.08.013>

## E

Edelman, D.B., Keefer, E.W., 2005. A cultural renaissance: in vitro cell biology embraces three-dimensional context. *Exp. Neurol.* 192, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.10.005>

Eelen, G., 2005. Superagonistic Action of 14-epi-Analogs of 1,25-Dihydroxyvitamin D Explained by Vitamin D Receptor-Coactivator Interaction. *Mol. Pharmacol.* 67, 1566–1573. <https://doi.org/10.1124/mol.104.008730>

Egan, J.B., Thompson, P.A., Vitanov, M. V., Bartik, L., Jacobs, E.T., Haussler, M.R.,

Gerner, E.W., Jurutka, P.W., 2010. Vitamin D receptor ligands, adenomatous polyposis coli, and the vitamin D receptor FokI polymorphism collectively modulate beta-catenin activity in colon cancer cells. *Mol. Carcinog.* 49, 337–52. <https://doi.org/10.1002/mc.20603>

Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

## F

Fabri, M., Modlin, R.L., 2009. A vitamin for autophagy. *Cell Host Microbe* 6, 201–3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.08.008>

Feldman, D., Krishnan, A. V., Swami, S., Giovannucci, E., Feldman, B.J., 2014. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat. Rev. Cancer* 14, 342–357. <https://doi.org/10.1038/nrc3691>

Feng, B., He, Q., Xu, H., 2014. FOXO1-dependent up-regulation of MAP kinase phosphatase 3 (MKP-3) mediates glucocorticoid-induced hepatic lipid accumulation in mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 393, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.06.001>

Fesik, S.W., 2005. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat. Rev. Cancer* 5, 876–885. <https://doi.org/10.1038/nrc1736>

Fields, J., Dumaop, W., Eleuteri, S., Elueteri, S., Campos, S., Serger, E., Trejo, M., Kosberg, K., Adame, A., Spencer, B., Rockenstein, E., He, J.J., Masliah, E., 2015. HIV-1 Tat alters neuronal autophagy by modulating autophagosome fusion to the lysosome: implications for HIV-associated neurocognitive disorders. *J. Neurosci.* 35, 1921–38. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3207-14.2015>

Fleet, J.C., 2004. Rapid, Membrane-Initiated Actions of 1,25 Dihydroxyvitamin D: What Are They and What Do They Mean? *J. Nutr.* 134, 3215–3218. <https://doi.org/10.1093/jn/134.12.3215>

Fleet, J.C., DeSmet, M., Johnson, R., Li, Y., 2012. Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *Biochem. J.* 441, 61–76. <https://doi.org/10.1042/BJ20110744>

Fraga, D., Meulia, T., Fenster, S., 2014. Real-Time PCR, *Current Protocols Essential Laboratory Techniques.* <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et1003s08>

Francès, C., Marcelin, A.G., Legendre, C., Chevret, S., Dussaix, E., Lejeune, J., Euvrard, S., Bigorie, A., Schulz, T.F., Agbalika, F., Lebbé, C., 2009. The Impact of Preexisting or Acquired Kaposi Sarcoma Herpesvirus Infection in Kidney Transplant Recipients on Morbidity and Survival. *Am. J. Transplant.* 9, 2580–2586. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02816.x>

Fu, L., Cheng, Y., Liu, B., 2013. Beclin-1: Autophagic regulator and therapeutic target in

cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 921–924.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.007>

## G

Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Vitale, I., Rigoni, A., Vacchelli, E., Michaud, M., Zischka, H., Castedo, M., Kroemer, G., 2010. Mitochondrial gateways to cancer. *Mol. Aspects Med.* 31, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.08.002>

Galluzzi, L., Pietrocola, F., Bravo-San Pedro, J.M., Amaravadi, R.K., Baehrecke, E.H., Cecconi, F., Codogno, P., Debnath, J., Gewirtz, D.A., Karantza, V., Kimmelman, A., Kumar, S., Levine, B., Maiuri, M.C., Martin, S.J., Penninger, J., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Simon, H.-U., Simonsen, A., Thorburn, A.M., Velasco, G., Ryan, K.M., Kroemer, G., 2015. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.* 34, 856–80. <https://doi.org/10.15252/embj.201490784>

García, S.P., 2009. Mecanismos de calcificación vascular asociados a la uremia y al tratamiento con calcitriol. Universitat de Lleida.

Giffin, L., Damania, B., 2014. KSHV, in: *Advances in Virus Research*. Elsevier Inc., pp. 111–159. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800098-4.00002-7>

Gilaberte, Y., Aguilera, J., Carrascosa, J.M., Figueroa, F.L., Romaní De Gabriel, J., Nagore, E., 2011. La vitamina D: evidencias y controversias. *Actas Dermosifilogr.* 102, 572–588. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2011.03.015>

Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C., 2001. An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods* 25, 386–401. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1261>

Golovko, O., Nazarova, N., Tuohimaa, P., 2005. A20 gene expression is regulated by TNF, Vitamin D and androgen in prostate cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 94, 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2005.01.019>

Gonzalez-Pardo, V., D’Elia, N., Verstuyf, A., Boland, R., Russo de Boland, A., 2012. NFκB pathway is down-regulated by 1α,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> in endothelial cells transformed by Kaposi sarcoma-associated herpes virus G protein coupled receptor. *Steroids* 77, 1025–32. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.05.006>

Gonzalez-Pardo, V., Martin, D., Gutkind, J.S., Verstuyf, A., Bouillon, R., de Boland, A.R., Boland, R.L., 2010. 1α,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and Its TX527 Analog Inhibit the Growth of Endothelial Cells Transformed by Kaposi Sarcoma-Associated Herpes Virus G Protein-Coupled Receptor in Vitro and in Vivo. *Endocrinology* 151, 23–31. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0650>

González-Pardo, V., Soares, A., Verstuyf, A., De Clercq, P., Boland, R., de Boland, A.R., 2014. Cell cycle arrest and apoptosis induced by 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and TX 527 in Kaposi sarcoma is VDR dependent. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 144 Pt A, 197–

200. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.11.014>

González-Pardo, V., Verstuyf, A., Boland, R., Russo de Boland, A., 2013. Vitamin D analogue TX 527 down-regulates the NF- $\kappa$ B pathway and controls the proliferation of endothelial cells transformed by Kaposi sarcoma herpesvirus. *Br. J. Pharmacol.* 169, 1635–45. <https://doi.org/10.1111/bph.12219>

## H

Hafeez, S., Urooj, M., Saleem, S., Gillani, Z., Shaheen, S., Qazi, M.H., Naseer, M.I., Iqbal, Z., Ansari, S.A., Haque, A., Asif, M., Mir, M.A., Ali, A., Pushparaj, P.N., Jamal, M.S., Rasool, M., 2016. BAD, a Proapoptotic Protein, Escapes ERK/RSK Phosphorylation in Deguelin and siRNA-Treated HeLa Cells. *PLoS One* 11, e0145780. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145780>

Hager, G., Kornfehl, J., Knerer, B., Weigel, G., Formanek, M., 2004. Molecular analysis of p21 promoter activity isolated from squamous carcinoma cell lines of the head and neck under the influence of 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> and its analogs. *Acta Otolaryngol.* 124, 90–96. <https://doi.org/10.1080/00016480310015353>

Han, J., Kim, S., Yang, J.-H., Nam, S.J., Lee, J.E., 2012. TPA-induced p21 expression augments G2/M arrest through a p53-independent mechanism in human breast cancer cells. *Oncol. Rep.* 27, 517–22. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1511>

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Haussler, M.R., Jurutka, P.W., Mizwicki, M., Norman, A.W., 2011. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>: Genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25, 543–559. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2011.05.010>

Haussler, M.R., Whitfield, G.K., Kaneko, I., Haussler, C.A., Hsieh, D., Hsieh, J.-C., Jurutka, P.W., 2013. Molecular Mechanisms of Vitamin D Action. *Calcif. Tissue Int.* 92, 77–98. <https://doi.org/10.1007/s00223-012-9619-0>

He, C., Klionsky, D.J., 2009. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 43, 67–93. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102808-114910>

He, C., Levine, B., 2010. The Beclin 1 interactome. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.01.001>

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986–994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>

Hij, C., Ferrante, A., 2016. The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients* 8, 135. <https://doi.org/10.3390/nu8030135>

- Ho, P.-Y., Hsu, S.-P., Liang, Y.-C., Kuo, M.-L., Ho, Y.-S., Lee, W.-S., 2008. Inhibition of the ERK phosphorylation plays a role in terbinafine-induced p21 up-regulation and DNA synthesis inhibition in human vascular endothelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 229, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.12.028>
- Holick, M., 2007. “Vitamin D deficiency.” *N. Engl. J. Med.* 357, 266–281.
- Holick, M.F., 2012. Vitamin D: Extraskelatal Health. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 38, 141–160. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2012.03.013>
- Hömmö, T., Pesu, M., Moilanen, E., Korhonen, R., 2015. Regulation of Inflammatory Cytokine Production by MKP-5 in Macrophages. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96–104. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12380>
- Hongmei, Z., 2012. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review, in: *Apoptosis and Medicine*. InTech, pp. 3–22. <https://doi.org/10.5772/50129>
- Honma, K., Tsuzuki, S., Nakagawa, M., Tagawa, H., Nakamura, S., Morishima, Y., Seto, M., 2009. TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 114, 2467–2475. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-194852>
- Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Mathiasen, I.S., Elling, F., Jäätelä, M., 2005. Vitamin D analog EB1089 triggers dramatic lysosomal changes and Beclin 1-mediated autophagic cell death. *Cell Death Differ.* 12, 1297–1309. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401651>
- Høyer-Hansen, M., Jäätelä, M., 2008. Autophagy: An emerging target for cancer therapy. *Autophagy* 4, 574–580. <https://doi.org/10.4161/auto.5921>
- Høyer-Hansen, M., Nordbrandt, S.P.S., Jäätelä, M., 2010. Autophagy as a basis for the health-promoting effects of vitamin D. *Trends Mol. Med.* 16, 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.04.005>
- Huang, C.-Y., Tan, T.-H., 2012. DUSPs, to MAP kinases and beyond. *Cell Biosci.* 2, 24. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-24>
- Huang, H., Regan, K.M., Wang, F., Wang, D., Smith, D.I., van Deursen, J.M.A., Tindall, D.J., 2005. Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1649–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406789102>
- Hymowitz, S.G., Wertz, I.E., 2010. A20: from ubiquitin editing to tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* 10, 332–41. <https://doi.org/10.1038/nrc2775>

## I

- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012. *Biological agents*. Volume 100 B. A review of human carcinogens. IARC Monogr.

Eval. Carcinog. risks to humans 100, 1–441. [https://doi.org/ISBN 978 92 832 1319 2](https://doi.org/ISBN%20978%2092%20832%2013192)

Indran, I.R., Tufo, G., Pervaiz, S., Brenner, C., 2011. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 735–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2011.03.010>

Inoki, K., Kim, J., Guan, K.-L., 2012. AMPK and mTOR in Cellular Energy Homeostasis and Drug Targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52, 381–400. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134537>

Into, T., Inomata, M., Takayama, E., Takigawa, T., 2012. Autophagy in regulation of Toll-like receptor signaling. *Cell. Signal.* 24, 1150–62. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.020>

Iwaihara, Y., Ishikura, S., Doi, K., Tsunoda, T., Fujimoto, T., Okamura, T., Shirasawa, S., 2015. Marked reduction in FoxO1 protein by its enhanced proteasomal degradation in zfat-deficient peripheral T-Cells. *Anticancer Res.* 35, 4419–4424.

## J

Jang, H., Lee, G.Y., Selby, C.P., Lee, G., Jeon, Y.G., Lee, J.H., Cheng, K.K.Y., Titchenell, P., Birnbaum, M.J., Xu, A., Sancar, A., Kim, J.B., 2016. SREBP1c-CRY1 signalling represses hepatic glucose production by promoting FOXO1 degradation during refeeding. *Nat. Commun.* 7, 12180. <https://doi.org/10.1038/ncomms12180>

Jiao, P., Feng, B., Xu, H., 2012. Mapping MKP-3/FOXO1 interaction and evaluating the effect on gluconeogenesis. *PLoS One* 7, e41168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041168>

Jin, S., Zhuo, Y., Guo, W., Field, J., 2005. p21-activated Kinase 1 (Pak1)-dependent Phosphorylation of Raf-1 Regulates Its Mitochondrial Localization, Phosphorylation of BAD, and Bcl-2 Association. *J. Biol. Chem.* 280, 24698–24705. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413374200>

## K

Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T., Tang, D., 2011. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* 18, 571–580. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.191>

Kato, M., Sanada, M., Kato, I., Sato, Y., Takita, J., Takeuchi, K., Niwa, A., Chen, Y., Nakazaki, K., Nomoto, J., Asakura, Y., Muto, S., Tamura, A., Iio, M., Akatsuka, Y., Hayashi, Y., Mori, H., Igarashi, T., Kurokawa, M., Chiba, S., Mori, S., Ishikawa, Y., Okamoto, K., Tobinai, K., Nakagama, H., Nakahata, T., Yoshino, T., Kobayashi, Y., Ogawa, S., 2009. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* 459,

712–6. <https://doi.org/10.1038/nature07969>

- Khoh-Reiter, S., Sokolowski, S.A., Jessen, B., Evans, M., Dalvie, D., Lu, S., 2015. Contribution of membrane trafficking perturbation to retinal toxicity. *Toxicol. Sci.* 145, 383–395. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv059>
- Kidger, A.M., Keyse, S.M., 2016. The regulation of oncogenic Ras/ERK signalling by dual-specificity mitogen activated protein kinase phosphatases (MKPs). *Semin. Cell Dev. Biol.* 50, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.01.009>
- Kim, J. Bin, Stein, R., O'Hare, M.J., 2004. Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer-- a review. *Breast Cancer Res. Treat.* 85, 281–91. <https://doi.org/10.1023/B:BREA.0000025418.88785.2b>
- Kimlin, L.C., Casagrande, G., Virador, V.M., 2013. In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: an update. *Mol. Carcinog.* 52, 167–82. <https://doi.org/10.1002/mc.21844>
- Kinkade, C.W., Castillo-Martin, M., Puzio-Kuter, A., Yan, J., Foster, T.H., Gao, H., Sun, Y., Ouyang, X., Gerald, W.L., Cordon-Cardo, C., Abate-Shen, C., 2008. Targeting AKT/mTOR and ERK MAPK signaling inhibits hormone-refractory prostate cancer in a preclinical mouse model. *J. Clin. Invest.* 118, 3051–64. <https://doi.org/10.1172/JCI34764>
- Kizildag, S., Ates, H., Kizildag, S., 2010. Treatment of K562 cells with 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces distinct alterations in the expression of apoptosis-related genes BCL2, BAX, BCLXL, and p21. *Ann. Hematol.* 89, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00277-009-0766-y>
- Kloet, D.E.A., Polderman, P.E., Eijkelenboom, A., Smits, L.M., van Triest, M.H., van den Berg, M.C.W., Groot Koerkamp, M.J., van Leenen, D., Lijnzaad, P., Holstege, F.C., Burgering, B.M.T., 2015. FOXO target gene CTDSP2 regulates cell cycle progression through Ras and p21(Cip1/Waf1). *Biochem. J.* 469, 289–98. <https://doi.org/10.1042/BJ20140831>
- Kluck, R., 2010. Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease. *Cell Health Cytoskelet.* 2, 9. <https://doi.org/10.2147/CHC.S6228>
- Krishna, M., Narang, H., 2008. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3525–3544. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8170-7>
- Krishnan, A. V., Feldman, D., 2011. Mechanisms of the Anti-Cancer and Anti-Inflammatory Actions of Vitamin D. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51, 311–336. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010510-100611>
- Krishnan, A. V., Trump, D.L., Johnson, C.S., Feldman, D., 2012. The Role of Vitamin D in Cancer Prevention and Treatment. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 38, 161–178. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2012.03.014>
- Kroemer, G., Levine, B., 2008. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat.*

## L

- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lang, R., Hammer, M., Mages, J., 2006. DUSP Meet Immunology: Dual Specificity MAPK Phosphatases in Control of the Inflammatory Response. *J. Immunol.* 177, 7497–7504. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.7497>
- Lange, C.M., Gouttenoire, J., Duong, F.H.T., Morikawa, K., Heim, M.H., Moradpour, D., 2014. Vitamin D Receptor and Jak-STAT Signaling Crosstalk Results in Calcitriol-Mediated Increase of Hepatocellular Response to IFN- $\gamma$ . *J. Immunol.* 192, 6037–6044. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302296>
- Laplane, M., Sabatini, D.M., 2012. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* 149, 274–293. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
- Lee, E.G., 2000. Failure to Regulate TNF-Induced NF-kappa B and Cell Death Responses in A20-Deficient Mice. *Science* (80-. ). 289, 2350–2354. <https://doi.org/10.1126/science.289.5488.2350>
- Lei, Y., Schaffer, D. V., 2013. A fully defined and scalable 3D culture system for human pluripotent stem cell expansion and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E5039–E5048. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309408110>
- Ley, R., Ewings, K.E., Hadfield, K., Cook, S.J., 2005. Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell Death Differ.* 12, 1008–14. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401688>
- Leyssens, C., Verlinden, L., Verstuyf, A., 2014. The future of vitamin D analogs. *Front. Physiol.* 5, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00122>
- Li, L., Hailey, D.W., Soetandyo, N., Li, W., Lippincott-Schwartz, J., Shu, H., Ye, Y., 2008. Localization of A20 to a lysosome-associated compartment and its role in NF $\kappa$ B signaling. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1783, 1140–1149. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.029>
- Li, X., Hu, X., Wang, J., Xu, W., Yi, C., Ma, R., Jiang, H., 2018. Inhibition of autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR pathway contributes to the protection of hesperidin against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Int. J. Mol. Med.* 1917–1924. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3794>
- Lin, R.-Z., Chou, L.-F., Chien, C.-C.M., Chang, H.-Y., 2006. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and beta1-integrin. *Cell Tissue Res.* 324, 411–22. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0148-2>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using

Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

LoPiccolo, J., Blumenthal, G.M., Bernstein, W.B., Dennis, P.A., 2008. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist. Updat.* 11, 32–50. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2007.11.003>

Low, H.B., Zhang, Y., 2016. Regulatory Roles of MAPK Phosphatases in Cancer. *Immune Netw.* 16, 85. <https://doi.org/10.4110/in.2016.16.2.85>

## M

Malynn, B.A., Ma, A., 2009. A20 takes on tumors: tumor suppression by an ubiquitin-editing enzyme. *J. Exp. Med.* 206, 977–80. <https://doi.org/10.1084/jem.20090765>

Marinissen, M.J., Chiariello, M., Pallante, M., Gutkind, J.S., 1999. A network of mitogen-activated protein kinases links G protein-coupled receptors to the c-jun promoter: a role for c-Jun NH2-terminal kinase, p38s, and extracellular signal-regulated kinase 5. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4289–301. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.12.006>

Marquez, R.T., Xu, L., 2012. *Pediatria vol. 02 - Crescimento e desenvolvimento, adolescência e puberdade, distúrbios do crescimento e desenvolvimento.pdf*, 2, 214–221.

Martin, D., Galisteo, R., Molinolo, A.A., Wetzker, R., Hirsch, E., Gutkind, J.S., 2011. Report PI3K g Mediates Kaposi ' s Sarcoma-Associated Herpesvirus vGPCR-Induced Sarcomagenesis. *Cancer Cell* 19, 805–813. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.05.005>

Martin, D., Gutkind, J.S., 2008. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene* 27, S31–S42. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.351>

Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K.-J., Coppes, R.P., Engedal, N., Mari, M., Reggiori, F., 2018. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* 14, 1435–1455. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474314>

Meng, X.-G., Yue, S.-W., 2014. Dexamethasone disrupts cytoskeleton organization and migration of T47D Human breast cancer cells by modulating the AKT/mTOR/RhoA pathway. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15, 10245–50. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.23.10245>

Mesri, E.A., Cesarman, E., Boshoff, C., 2010. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. *Nat. Rev. Cancer* 10, 707–19. <https://doi.org/10.1038/nrc2888>

Mesri, E.A., Feitelson, M.A., Munger, K., 2014. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe* 15, 266–82.

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.011>

- Mohr, S.B., 2009. A Brief History of Vitamin D and Cancer Prevention. *Ann. Epidemiol.* 19, 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2008.10.003>
- Montaner, S., 2007. Akt/TSC/mTOR Activation by the KSHV G Protein-Coupled Receptor: Emerging Insights into the Molecular Oncogenesis and Treatment of Kaposi's Sarcoma. *Cell Cycle* 6, 438–443. <https://doi.org/10.4161/cc.6.4.3843>
- Montaner, S., Sodhi, A., Molinolo, A., Bugge, T.H., Sawai, E.T., He, Y., Li, Y., Ray, P.E., Gutkind, J.S.S., 2003. Endothelial infection with KSHV genes in vivo reveals that vGPCR initiates Kaposi's sarcomagenesis and can promote the tumorigenic potential of viral latent genes. *Cancer Cell* 3, 23–36. <https://doi.org/10.1111/bph.12219>
- Montaner, S., Sodhi, A., Ramsdell, A.K., Martin, D., Hu, J., Sawai, E.T., Gutkind, J.S., 2006. The Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus G Protein-Coupled Receptor as a Therapeutic Target for the Treatment of Kaposi's Sarcoma. *Cancer Res.* 66, 168–174. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1026>
- Moore, P.S., Chang, Y., 2010. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology 10.
- Mora, J.R., Iwata, M., von Andrian, U.H., 2008. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 685–698. <https://doi.org/10.1038/nri2378>
- Moreno, J., Krishnan, A. V., Swami, S., Nonn, L., Peehl, D.M., Feldman, D., 2005. Regulation of prostaglandin metabolism by calcitriol attenuates growth stimulation in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 65, 7917–7925. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1435>
- Mori Sequeiros García, M., Gómez, N. V, Gorostizaga, A., Acquier, A., González-Calvar, S.I., Mendez, C.F., Paz, C., 2013. MAP kinase phosphatase-3 (MKP-3) is transcriptionally and post-translationally up-regulated by hCG and modulates cAMP-induced p21 expression in MA-10 Leydig cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 371, 174–81. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.12.006>
- Mostafa, W.Z., Hegazy, R.A., 2015. Vitamin D and the skin: Focus on a complex relationship: A review. *J. Adv. Res.* 6, 793–804. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2014.01.011>

## N

- Nath, S., Devi, G.R., 2016. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol. Ther.* 163, 94–108.

<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.013>

- Nazio, F., Strappazzon, F., Antonioli, M., Bielli, P., Cianfanelli, V., Bordi, M., Gretzmeier, C., Dengjel, J., Piacentini, M., Fimia, G.M., Cecconi, F., 2013. mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat. Cell Biol.* 15, 406–16. <https://doi.org/10.1038/ncb2708>
- Nguyen, H.Q., Magaret, A.S., Kitahata, M.M., Van Rompaey, S.E., Wald, A., Casper, C., 2008. Persistent Kaposi sarcoma in the era of highly active antiretroviral therapy: characterizing the predictors of clinical response. *AIDS* 22, 937–945. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3282ff6275>
- Nonn, L., Peng, L., Feldman, D., Peehl, D.M., 2006. Inhibition of p38 by vitamin D reduces interleukin-6 production in normal prostate cells via mitogen-activated protein kinase phosphatase 5: Implications for prostate cancer prevention by vitamin D. *Cancer Res.* 66, 4516–4524. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3796>
- Norman, A.W., 2012. The history of the discovery of vitamin d and its daughter steroid hormone. *Ann. Nutr. Metab.* 61, 199–206. <https://doi.org/10.1159/000343104>
- Norman, A.W., 2008. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 491S–499S. <https://doi.org/88/2/491S> [pii]
- Norman, A.W., 2006. Minireview: Vitamin D receptor: New assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 147, 5542–5548. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0946>

## O

- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F.-T., Zhou, T.-T., Liu, B., Bao, J.-K., 2012. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* 45, 487–498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x>

## P

- Pan, H., Xie, J., Ye, F., Gao, S.-J., 2006. Modulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection and replication by MEK/ERK, JNK, and p38 multiple mitogen-activated protein kinase pathways during primary infection. *J. Virol.* 80, 5371–82. <https://doi.org/10.1128/JVI.02299-05>
- Pan, L., Matloob, A.F., Du, J., Pan, H., Dong, Z., Zhao, J., Feng, Y., Zhong, Y., Huang, B., Lu, J., 2010. Vitamin D stimulates apoptosis in gastric cancer cells in synergy with

- trichostatin A /sodium butyrate-induced and 5-aza-2'-deoxycytidine-induced PTEN upregulation. *FEBS J.* 277, 989–999. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07542.x>
- Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., Johansen, T., 2007. p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *J. Biol. Chem.* 282, 24131–24145. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702824200>
- Park, W.H., Seol, J.G., Kim, E.S., Hyun, J.M., Jung, C.W., Lee, C.C., Binderup, L., Koeffler, H.P., Kim, B.K., Yiul, Y., Cancer, L., 2000. Induction of apoptosis by vitamin D 3 analogue EB1089 in NCI-H929 myeloma cells via activation of caspase 3 and p38 MAP kinase 576–583.
- Patel, B.S., Co, W.S., Donat, C., Wang, M., Che, W., Prabhala, P., Schuster, F., Schulz, V., Martin, J.L., Ammit, A.J., 2015. Repression of breast cancer cell growth by proteasome inhibitors in vitro : impact of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1. *Cancer Biol. Ther.* 16, 780–789. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1026465>
- Patterson, K.I., Brummer, T., O'Brien, P.M., Daly, R.J., 2009. Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem. J.* 418, 475–89. <https://doi.org/10.1042/BJ20082234>
- Peehl, D.M., Shinghal, R., Nonn, L., Seto, E., Krishnan, A. V., Brooks, J.D., Feldman, D., 2004. Molecular activity of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in primary cultures of human prostatic epithelial cells revealed by cDNA microarray analysis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 92, 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.07.003>
- Peng, D.-J., Zhou, J.-Y., Wu, G.S., 2010. Post-translational regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-2 (MKP-2) by ERK. *Cell Cycle* 9, 4650–5. <https://doi.org/10.4161/cc.9.23.13957>
- Perl, A., 2016. Activation of mTOR (mechanistic target of rapamycin) in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 169–82. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.172>
- Polster, B.M., Basañez, G., Etxebarria, A., Hardwick, J.M., Nicholls, D.G., 2005. Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* 280, 6447–54. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413269200>
- Porta, C., Paglino, C., Mosca, A., 2014. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front. Oncol.* 4, 64. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00064>
- Puthalakath, H., Strasser, A., 2002. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ.* 9, 505–12. <https://doi.org/10.1038/sj/cdd/4400998>

## R

- Rabinowitz, J.D., White, E., 2010. Autophagy and Metabolism. *Science* (80-. ). 330, 1344–1348. <https://doi.org/10.1126/science.1193497>
- Reed, J.C., 2008. ASH 50th anniversary review Bcl-2 – family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* 111, 3322–3330. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-078162>.
- Rong, Y.-P., Aromolaran, A.S., Bultynck, G., Zhong, F., Li, X., McColl, K., Matsuyama, S., Herlitze, S., Roderick, H.L., Bootman, M.D., Mignery, G.A., Parys, J.B., De Smedt, H., Distelhorst, C.W., 2008. Targeting Bcl-2-IP3 receptor interaction to reverse Bcl-2's inhibition of apoptotic calcium signals. *Mol. Cell* 31, 255–65. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.06.014>
- Rosenfeldt, M.T., Ryan, K.M., 2011. The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis* 32, 955–963. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr031>
- Roskoski, R., 2012. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacol. Res.* 66, 105–143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>
- Roy, S.K., Srivastava, R.K., Shankar, S., 2010. Inhibition of PI3K / AKT and MAPK / ERK pathways causes activation of FOXO transcription factor , leading to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer. *Access* 1–13.

## S

- Schulz, T.F., Cesarman, E., 2015. Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus: mechanisms of oncogenesis. *Curr. Opin. Virol.* 14, 116–28. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.08.016>
- Schwartz, G.G., Skinner, H.G., 2007. Vitamin D status and cancer: new insights. *Curr. Opin. Intern. Med.* 6, 125–130. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328011aa60>
- Schwartz, Z., Ehland, H., Sylvia, V.L., Larsson, D., Hardin, R.R., Bingham, V., Lopez, D., Dean, D.D., Boyan, B.D., 2002. Dihydroxyvitamin D 3 Modulate Growth Plate Chondrocyte Physiology via Protein Kinase C-Dependent Phosphorylation of Extracellular Signal-Regulated. *Endocrinology* 143, 2775–2786.
- Sharma-walia, N., Krishnan, H.H., Naranatt, P.P., Zeng, L., Smith, M.S., Chandran, B., 2005. ERK1 / 2 and MEK1 / 2 Induced by Kaposi ' s Sarcoma-Associated Herpesvirus ( Human Herpesvirus 8 ) Early during Infection of Target Cells Are Essential for Expression of Viral Genes and for Establishment of Infection. *Society* 79, 10308–10329. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.16.10308>
- She, Q.-B., Ma, W.-Y., Zhong, S., Dong, Z., 2002. Activation of JNK1, RSK2, and MSK1 Is Involved in Serine 112 Phosphorylation of Bad by Ultraviolet B Radiation. *J. Biol. Chem.* 277, 24039–24048. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109907200>

- Shembade, N., Harhaj, E.W., 2012. Regulation of NF- $\kappa$ B signaling by the A20 deubiquitinase. *Cell. Mol. Immunol.* 9, 123–130. <https://doi.org/10.1038/cmi.2011.59>
- Sheridan, C., Brumatti, G., Martin, S.J., 2008. Oncogenic B-RafV600E inhibits apoptosis and promotes ERK-dependent inactivation of Bad and Bim. *J. Biol. Chem.* 283, 22128–22135. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800271200>
- Shin, S., Ikram, M., Subhan, F., Kang, H.Y., Lim, Y., Lee, R., Jin, S., Jeong, Y.H., Kwak, J.-Y., Na, Y.-J., Yoon, S., 2016. Alginate–marine collagen–agarose composite hydrogels as matrices for biomimetic 3D cell spheroid formation. *RSC Adv.* 6, 46952–46965. <https://doi.org/10.1039/C6RA01937D>
- Sidelnikov, E., Bostick, R.M., Flanders, W.D., Long, Q., Fedirko, V., Shaukat, A., Daniel, C.R., Rutherford, R.E., 2010. Effects of Calcium and Vitamin D on MLH1 and MSH2 Expression in Rectal Mucosa of Sporadic Colorectal Adenoma Patients. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 19, 1022–1032. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0526>
- Sodhi, A., Chaisuparat, R., Hu, J., Ramsdell, A.K., Manning, B.D., Sausville, E.A., Sawai, E.T., Molinolo, A., Gutkind, J.S., Montaner, S., 2006. The TSC2/mTOR pathway drives endothelial cell transformation induced by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor. *Cancer Cell* 10, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.05.026>
- Sodhi, A., Montaner, S., Patel, V., Gómez-Román, J.J., Li, Y., Sausville, E.A., Sawai, E.T., Gutkind, J.S., 2004. Akt plays a central role in sarcomagenesis induced by Kaposi's sarcoma herpesvirus-encoded G protein-coupled receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4821–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400835101>
- Sprick, M.R., Walczak, H., 2004. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1644, 125–32. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.11.002>
- Sui, X., Chen, R., Wang, Z., Huang, Z., Kong, N., Zhang, M., Han, W., Lou, F., Yang, J., Zhang, Q., Wang, X., He, C., Pan, H., 2013. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis.* 4, e838. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.350>
- Sullivan, R.J., Pantanowitz, L., Dezube, B.J., 2009. Targeted Therapy for Kaposi Sarcoma. *BioDrugs* 23, 69–75. <https://doi.org/10.2165/00063030-200923020-00001>
- Swami, S., Raghavachari, N., Muller, U.R., Bao, Y.P., Feldman, D., 2003. Vitamin D growth inhibition of breast cancer cells: gene expression patterns assessed by cDNA microarray. *Breast Cancer Res. Treat.* 80, 49–62. <https://doi.org/10.1023/A:1024487118457>

## T

- Tan, J., Dwivedi, P.P., Anderson, P., Nutchey, B.K., O'Loughlin, P., Morris, H.A., May, B.K., Ferrante, A., Hii, C.S., 2007. Antineoplastic agents target the 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase messenger RNA for degradation: Implications in anticancer activity. *Mol. Cancer Ther.* 6, 3131–3138. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0427>
- Tan, M.L., Ooi, J.P., Ismail, N., Moad, A.I.H., Muhammad, T.S.T., 2009. Programmed cell death pathways and current antitumor targets. *Pharm. Res.* 26, 1547–60. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9895-1>
- Tavera-Mendoza, L., Wang, T.-T., Lallemand, B., Zhang, R., Nagai, Y., Bourdeau, V., Ramirez-Calderon, M., Desbarats, J., Mader, S., White, J.H., 2006. Convergence of vitamin D and retinoic acid signalling at a common hormone response element. *EMBO Rep.* 7, 180–185. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400594>
- Tavera-Mendoza, L.E., Westerling, T., Libby, E., Marusyk, A., Cato, L., Cassani, R., Cameron, L.A., Ficarro, S.B., Marto, J.A., Klawitter, J., Brown, M., 2017. Vitamin D receptor regulates autophagy in the normal mammary gland and in luminal breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, E2186–E2194. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615015114>
- Thorburn, A., 2008. Apoptosis and autophagy: Regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis* 13, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0154-9>
- Timmins, N.E., Nielsen, L.K., 2007. Generation of multicellular tumor spheroids by the hanging-drop method. *Methods Mol. Med.* 140, 141–51. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-443-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-443-8_8)
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
- Trump, D.L., Deeb, K.K., Johnson, C.S., 2010. Vitamin D: Considerations in the Continued Development as an Agent for Cancer Prevention and Therapy. *Cancer J.* 16, 1–9. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e3181c51ee6>
- Turer, E.E., Tavares, R.M., Mortier, E., Hitotsumatsu, O., Advincula, R., Lee, B., Shifrin, N., Malynn, B.A., Ma, A., 2008. Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20. *J. Exp. Med.* 205, 451–464. <https://doi.org/10.1084/jem.20071108>

## V

- Vara, J.Á.F., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., González-Barón, M.,

2004. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat. Rev.* 30, 193–204. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2003.07.007>

Vendrell, J.A., Ghayad, S., Ben-Larbi, S., Dumontet, C., Mechti, N., Cohen, P.A., 2007. A20/TNFAIP3, a new estrogen-regulated gene that confers tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Oncogene* 26, 4656–4667. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210269>

Verlinden, L., Eelen, G., Bouillon, R., Vandewalle, M., De Clercq, P., Verstuyf, A., 2011. Analogs of Calcitriol, in: *Vitamin D*. Elsevier, pp. 1461–1487. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381978-9.10076-9>

Volkman, N., Marassi, F.M., Newmeyer, D.D., Hanein, D., 2014. The rheostat in the membrane: BCL-2 family proteins and apoptosis. *Cell Death Differ.* 21, 206–215. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.153>

## W

Wang, J., Lian, H., Zhao, Y., Kauss, M.A., Spindel, S., 2008. Vitamin D3 Induces Autophagy of Human Myeloid Leukemia Cells \* 283, 25596–25605. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801716200>

Wang, S., 2009. Epidemiology of vitamin D in health and disease. *Nutr. Res. Rev.* 22, 188. <https://doi.org/10.1017/S0954422409990151>

Wei, R., Christakos, S., 2015. Mechanisms Underlying the Regulation of Innate and Adaptive Immunity by Vitamin D. *Nutrients* 7, 8251–8260. <https://doi.org/10.3390/nu7105392>

Weitzman, M.D., Weitzman, J.B., 2014. What's the Damage? The Impact of Pathogens on Pathways that Maintain Host Genome Integrity. *Cell Host Microbe* 15, 283–294. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.010>

Westerberg, C.M., Hägglund, H., Nilsson, G., 2012. Proteasome inhibition upregulates Bim and induces caspase-3-dependent apoptosis in human mast cells expressing the Kit D816V mutation. *Cell Death Dis.* 3, e417. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.157>

Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P.E., Kluck, R.M., 2011. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1813, 521–531. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.019>

White, E., 2015. The role for autophagy in cancer. *J. Clin. Invest.* 125, 42–46. <https://doi.org/10.1172/JCI73941>

Wlodkowic, D., Telford, W., Skommer, J., Darzynkiewicz, Z., 2011. Apoptosis and Beyond: Cytometry in Studies of Programmed Cell Death, in: *Methods in Cell Biology*. Elsevier Inc., pp. 55–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385493-3.00004-8>

Wong, R.S.Y., 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30, 87. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>

Wu, L.Y., Di Carlo, D., Lee, L.P., 2008. Microfluidic self-assembly of tumor spheroids for anticancer drug discovery. *Biomed. Microdevices* 10, 197–202. <https://doi.org/10.1007/s10544-007-9125-8>

Wu, Y., Zhao, Z., Guan, Y., Zhang, Y., 2014. Galactosylated reversible hydrogels as scaffold for HepG2 spheroid generation. *Acta Biomater.* 10, 1965–74. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.044>

Wu, Z., Jiao, P., Huang, X., Feng, B., Feng, Y., Yang, S., Hwang, P., Du, J., Nie, Y., Xiao, G., Xu, H., 2010. MAPK phosphatase – 3 promotes hepatic gluconeogenesis through dephosphorylation of forkhead box O1 in mice 120, 3901–3911. <https://doi.org/10.1172/JCI43250DS1>

## X

Xu, X., Gurski, L.A., Zhang, C., Harrington, D.A., Farach-Carson, M.C., Jia, X., 2012. Recreating the tumor microenvironment in a bilayer, hyaluronic acid hydrogel construct for the growth of prostate cancer spheroids. *Biomaterials* 33, 9049–60. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.061>

## Y

Yan, H., Wang, X., Niu, J., Wang, Y., Wang, P., Liu, Q., 2014. Anti-cancer effect and the underlying mechanisms of gypenosides on human colorectal cancer SW-480 cells. *PLoS One* 9, e95609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095609>

Yang, S., Sharrocks, A.D., Whitmarsh, A.J., 2013. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene* 513, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.10.033>

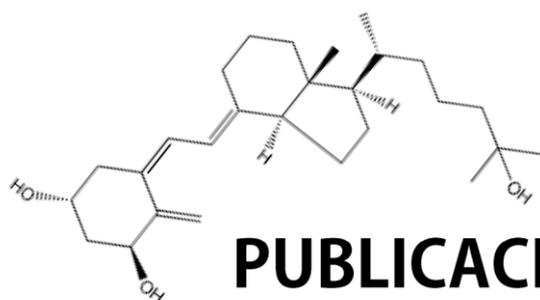
Yip, K.W., Reed, J.C., 2008. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 27, 6398–6406. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.307>

Youle, R.J., Strasser, A., 2008. The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 47–59. <https://doi.org/10.1038/nrm2308>

## Z

Zanello, L.P., Norman, A.W., 2004. Rapid modulation of osteoblast ion channel responses by 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D3 requires the presence of a functional vitamin

- D nuclear receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 1589–1594. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305802101>
- Zella, L.A., Kim, S., Shevde, N.K., Pike, J.W., 2007. Enhancers located in the vitamin D receptor gene mediate transcriptional autoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 103, 435–439. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.12.019>
- Zhao, X.-C., Cao, X.-C., Liu, F., Quan, M.-F., Ren, K.-Q., Cao, J.-G., 2013. Regulation of the FOXO3a/Bim signaling pathway by 5,7-dihydroxy-8-nitrochrysin in MDA-MB-453 breast cancer cells. *Oncol. Lett.* 5, 929–934. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.1077>
- Zhu, X., Zhou, F., Qin, D., Zeng, Y., Lv, Z., Yao, S., Lu, C., 2011. Human immunodeficiency virus type 1 induces lytic cycle replication of Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus: role of Ras/c-Raf/MEK1/2, PI3K/AKT, and NF-κB signaling pathways. *J. Mol. Biol.* 410, 1035–51. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.03.055>
- Zuluaga Espinosa, N.A., Alfaro Velásquez, J.M., Balthazar González, V., Jiménez Blanco, K.E., Campuzano Maya, G., 2011. Vitamina D: nuevos paradigmas. *Med. Lab.* 17, 211–246.
- zur Hausen, H., 2009. The search for infectious causes of human cancers: Where and why. *Virology* 392, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.06.001>



## **PUBLICACIONES DE LA TESIS**

---

---

## PUBLICACIONES DE LA TESIS

- **SUARES A**, RUSSO DE BOLAND A, VERSTUYF A, BOLAND R Y GONZÁLEZ PARDO V, 2015. The proapoptotic protein Bim is up regulated by  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$  and its receptor agonist in endothelial cells and transformed by viral GPCR associated to Kaposi sarcoma. *Steroids*. Vol. 102, pp 85-91. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2015.08.005>.
- **SUARES A**, MORI SEQUEIROS GM, 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*. Vol. 32, pp 124-132. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.01.025>.
- **SUARES A**, TAPIA C Y GONZÁLEZ PARDO V, 2018. Antineoplastic effect of  $1\alpha,25(OH)_2D_3$  in spheroids from endothelial cells transformed by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein coupled receptor. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. In press. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.10.004>.