



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia**

**TESIS DOCTORAL EN BIOQUÍMICA**

**Efectos antineoplásicos y  
antiinflamatorios de agonistas  
del receptor vitamina D en el  
Sarcoma de Kaposi**

Bioquímica Cinthya Mariela Tapia

Bahía Blanca

Argentina

2020

**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 por el grado académico de Doctor en Bioquímica, 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 2016 hasta el 22 de Octubre de 2020, bajo la dirección de la Dra. María Verónica González Pardo.

Bioquímica Cinthya Mariela, TAPIA

22 de Octubre de 2020

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 ella por los sí,  
A él por los no,  
A Claudio por todo.*

## AGRADECIMIENTOS

Una tesis doctoral no solo es un estudio escrito sobre una investigación de carácter original que permite acceder al grado de Doctor, sino que también es el primer empeño de relevancia cuya máxima finalidad es el aprendizaje. Por lo que quiero agradecer profundamente a todos los que me han acompañado en este camino. Estas palabras son para ustedes.

A la Universidad Nacional del Sur y al Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur (INBIOSUR) por proporcionarme el lugar de trabajo, los medios y el equipamiento necesario para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por concederme la beca de postgrado que permitió el desarrollo de esta Tesis.

A mi directora, la Dra. María Verónica González Pardo. Gracias por elegir dirigirme, por la confianza y el compromiso con este proyecto.

A las Dras. Ana Russo de Boland y Susana Morelli por abrirme las puertas del laboratorio de Química Biológica.

A las Dras. Gabriela Salvador y Romina Uranga y a todo su equipo de trabajo, por brindarme un espacio en su laboratorio para realizar parte del trabajo experimental, por su aporte en conocimiento y ayuda en los experimentos de GST-Pull Down y estrés oxidativo.

Al Dr. Fernando Zamarreño por su colaboración en el desarrollo del análisis computacional.

A la Dra. María Belén Rauschemberger, por su ayuda y sus consejos cada vez que lo necesité.

A todos los integrantes del Laboratorio de Química Biológica por su colaboración y sus palabras de aliento durante todos estos años.

A mis familiares, especialmente mis sobrinas y sobrinos cuasi hermanos por el cariño que me han brindado siempre.

A mis queridas amigas Jesi, Carla Crescitelli, Carla Castro Carbonell, Bety y Guille; que en la cercanía o en la distancia siempre están presentes.

A mis padres a los que todo les debo, que a pesar de no estar físicamente están en mi corazón y mi recuerdo a diario. Imagino cuan felices estarían.

Y muy especialmente a mi esposo Claudio, por su apoyo, paciencia y amor incondicional. Por vos todo.

## RESUMEN

El sarcoma de Kaposi es una patología tumoral angio-proliferativa cuyo agente etiológico asociado es el herpesvirus 8. El receptor viral acoplado a proteína G (vGPCR) es uno de los genes virales que induce la transformación oncogénica y la formación de lesiones angiogénicas asociadas al sarcoma de Kaposi a través de modificaciones paracrinas, por lo que su expresión es necesaria para el mantenimiento del tumor. El calcitriol o  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamina  $\text{D}_3$  ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) es la forma hormonal activa de la vitamina D, no sólo es vital para la homeostasis mineral, sino que presenta efectos antineoplásicos en varios tipos de tumores. Nuestro grupo de investigación ha aportado evidencia sobre los efectos anti-proliferativos del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en un modelo celular murino de sarcoma de Kaposi. En esta Tesis Doctoral se investigó si la actividad anti-angiogénica y antiinflamatoria del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y su rol en el estrés oxidativo contribuyen a su mecanismo de acción antitumoral en un modelo celular murino de sarcoma de Kaposi. Se obtuvo evidencia de que  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  regula los factores pro-angiogénicos, se observó una disminución de la expresión de HIF-1 $\alpha$  en forma dependiente del VDR, no así de VEGF, que aumentó independientemente de la disminución de HIF-1 $\alpha$  y EGR-1, posiblemente por regulación directa del promotor de VEGF por parte del VDR. A su vez, la expresión del mensajero del factor anti-oncogénico JunB aumentó, mientras que el mensajero del factor pro-oncogénico c-Fos sólo disminuyó durante cortos periodos de tiempo. Además, se demostró que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  regula negativamente la vía Wnt/ $\beta$ -catenina por tres mecanismos diferentes relacionados y consecuentes en el tiempo. En primer lugar, se observó un aumento del inhibidor extracelular Dkk-1 el cual disminuyó inicialmente los niveles de  $\beta$ -catenina; en segundo lugar, una asociación de las proteínas  $\beta$ -catenina/VDR con la consecuente disminución de la

actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina en genes clave durante la proliferación celular como c-myc, Mmp-9 y ciclina D1 y finalmente, un aumento de VE-cadherina implicando la relocalización de  $\beta$ -catenina para participar de las uniones intercelulares. En cuanto a los efectos antiinflamatorios del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , se demostró una modulación dual compuesta por la inhibición de la producción de PGE2 a través de la interacción entre las proteínas COX-2/VDR, la que disminuyó la actividad enzimática, y la supresión diferencial de los receptores EPs de PGE2. Finalmente, en cuanto al rol del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  frente al estrés oxidativo, se determinó que los niveles de ROS se encontraron aumentados estimulando así el desencadenamiento del proceso apoptótico por medio del aumento de la expresión de factores pro-apoptóticos como BIM y Caspasa 3-clivada. Los resultados en este trabajo de Tesis Doctoral contribuyen al conocimiento sobre el mecanismo de acción anti-angiogénico y antiinflamatorio, efecto frente al estrés oxidativo del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  con la participación del VDR en un modelo celular murino de sarcoma de Kaposi. A su vez, sustenta las bases para dar continuación a otros estudios usando modelos *in vivo* y para evaluar el uso de análogos de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  con menor efecto calcémico para el tratamiento de esta patología.

## SUMMARY

Kaposi's sarcoma is an angioproliferative tumor and herpesvirus 8 is the associated etiologic agent. The G protein-coupled viral receptor (vGPCR) is one of the viral genes that induces oncogenic transformation and the formation of angiogenic lesions associated with Kaposi's sarcoma through paracrine modifications, therefore its expression is necessary for tumor maintenance. Calcitriol or  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{-vitamin D}_3$  ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) is the active hormonal form of vitamin D, it is not only vital for mineral homeostasis, but it also has antineoplastic effects in various types of tumors. Our research group has provided evidence on the anti-proliferative effects of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in a murine cell model of Kaposi's sarcoma. This Doctoral Thesis investigated whether the anti-angiogenic and anti-inflammatory activity of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  and its role in oxidative stress contribute to the antitumor action mechanism in a murine cell model of Kaposi's sarcoma. Evidence was obtained that  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  regulates pro-angiogenic factors. A decrease in the expression of HIF-1 $\alpha$  was observed on a VDR dependent manner, but not on VEGF, which increased independently of the decrease in HIF-1 $\alpha$  and EGR-1, possibly through direct regulation of the VEGF promoter by VDR. At the same time, the expression of the messenger of the anti-oncogenic factor JunB increased, while the messenger of the pro-oncogenic factor c-Fos only decreased for short periods of time. Furthermore, it was shown that  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  negatively regulates the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway by three different related and consequent mechanisms over time. First, an increase in the extracellular inhibitor Dkk-1 was observed, which initially decreased the levels of  $\beta$ -catenin; second, an association of  $\beta$ -catenin/VDR proteins with the consequent decrease in the transcriptional activity of  $\beta$ -catenin upon key genes during cell proliferation such as c-myc, Mmp-9 and cyclin D1; and finally, an increase in VE-cadherin involving the

relocation of  $\beta$ -catenin to participate in the intercellular junctions. Regarding to the anti-inflammatory effects of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , a dual modulation was demonstrated, composed of PGE2 production inhibition through the interaction between the COX-2/VDR proteins, which decreased the enzymatic activity; and the differential suppression of EP receptors by PGE2. Finally, regarding the role of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  against oxidative stress, it was determined that ROS levels were found increased, thus stimulating the apoptotic process by increasing the expression of pro-apoptotic factors such as BIM and Caspase-3 cleavage. The results of this Doctoral Thesis work contribute to the knowledge of the anti-angiogenic and anti-inflammatory mechanisms, the effect against oxidative stress of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  with VDR participation in a murine cell model of Kaposi's sarcoma. It supports the basis for continuing other studies using *in vivo* models and evaluating the use of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  analogues with less calcemic effect for the treatment of this pathology.

**Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.**

**INDICE**

<b>INTRODUCCION</b> .....	15
<b>VITAMINA D</b> .....	16
Estructura .....	16
Fuentes.....	17
Síntesis y Metabolismo .....	18
Mecanismo de acción .....	20
Receptor de Vitamina D .....	20
Acción genómica .....	22
Acción no genómica.....	23
Función Biológica .....	25
Efectos no clásicos .....	26
Análogos.....	28
<b>ONCOVIRUS</b> .....	29
Sarcoma de Kaposi .....	31
Oncogénesis del sarcoma de Kaposi .....	34
<b>HIPOTESIS</b> .....	39
<b>OBJETIVOS</b> .....	39
Objetivos generales .....	40
Objetivos específicos .....	40
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	42
<b>1- Reactivos</b> .....	43
<b>2- Modelos experimentales</b> .....	44
Líneas celulares.....	44
Cepa bacteriana .....	45

<b>METODOS</b> .....	46
<b>1- Cultivo celular</b> .....	46
Condiciones para el cultivo celular en monocapa .....	47
Cultivo de esferoides multicelulares .....	47
<b>2- Tratamientos</b> .....	48
1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ y TX 527 .....	48
Inhibidores Farmacológicos .....	49
<b>3- RT-PCR Cuantitativa</b> .....	49
Extracción del ARN total .....	49
Transcripción reversa .....	50
Análisis de expresión de genes .....	50
<b>4- Procesamiento y Cuantificación de proteínas</b> .....	52
<b>5- Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)</b> .....	53
<b>6- Western blot</b> .....	53
Electrotransferencia .....	53
Bloqueo de sitios inespecíficos .....	54
Detección de proteínas .....	54
Remoción de los anticuerpos .....	54
<b>7- Inmunocitoquímica</b> .....	55
<b>8- Microscopía de fluorescencia confocal</b> .....	55
<b>9- Fraccionamiento subcelular</b> .....	56
<b>10-Co-Inmunoprecipitación</b> .....	56
<b>11-Ensayos de proliferación</b> .....	57
Conteo celular.....	57
MTS.....	57
<b>12-Ensayo de actividad COX-2</b> .....	58

<b>13-Cuantificación de VEGF en lisado de células vGPCR.....</b>	<b>59</b>
<b>14-Análisis computacional de la interacción proteína-proteína.....</b>	<b>59</b>
<b>15-Ensayo GST-Pull-down .....</b>	<b>61</b>
<b>16-Determinación de los niveles oxidantes .....</b>	<b>62</b>
<b>17-Análisis estadístico .....</b>	<b>63</b>
<b>CAPITULO I: Regulación de la expresión de moléculas pro-angiogénicas por 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math>.....</b>	<b>64</b>
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>65</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>74</b>
<i>Los componentes del factor de transcripción AP-1, JunB y c-Fos son regulados por 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math>.....</i>	<i>74</i>
<i>El ARNm de HIF-1<math>\alpha</math> y VEGF se encuentra sobreexpresado basalmente en células endoteliales que expresan constitutivamente el vGPCR .....</i>	<i>76</i>
<i>El 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> disminuye la expresión de HIF-1<math>\alpha</math> en células endoteliales vGPCR .....</i>	<i>78</i>
<i>La disminución de HIF-1<math>\alpha</math> inducida por 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> depende del VDR .....</i>	<i>82</i>
<i>El 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> aumenta la expresión del VEGF en células endoteliales vGPCR y en esferoides multicelulares derivados de ellas .....</i>	<i>84</i>
<i>Disminución de la expresión de EGR-1 por 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math>.....</i>	<i>87</i>
<b>DISCUSION.....</b>	<b>89</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>94</b>
<b>CAPITULO II: Modulación de la vía wnt/<math>\beta</math>-catenina por 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math>.....</b>	<b>96</b>
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>97</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>103</b>
<i>El 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> o TX 527 aumentan la expresión de <math>\beta</math>-catenina .....</i>	<i>103</i>
<i>El aumento en los niveles de <math>\beta</math>-catenina inducidos por 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> o TX 527 dependen de la expresión del VDR.....</i>	<i>107</i>
<i><math>\beta</math>-catenina se acumula en el núcleo y en la membrana luego del tratamiento con 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math>.....</i>	<i>109</i>

<i>El 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> aumenta VE-cadherina en la membrana plasmática .....</i>	113
<i>El 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> induce la asociación de <math>\beta</math>-catenina con el VDR.....</i>	115
<i>Dkk-1 aumenta su expresión tempranamente por 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math>.....</i>	116
<i>El 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> regula negativamente la transcripción de genes dependientes de <math>\beta</math>-catenina .....</i>	120
<b>DISCUSION.....</b>	122
<b>CONCLUSION.....</b>	126
<b>CAPITULO III: Efecto del 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> en la regulación de COX-2 y los receptores de prostaglandinas .....</b>	127
<b>INTRODUCCION.....</b>	128
<b>RESULTADOS .....</b>	137
<i>Celecoxib reduce el número y la viabilidad de las células vGPCR.....</i>	137
<i>La expresión de COX-2 aumenta en presencia de 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> y es dependiente de la expresión del VDR .....</i>	138
<i>El 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> disminuye la actividad de COX-2 .....</i>	145
<i>Estudio de la posible interacción física entre COX-2 y el VDR.....</i>	148
<i>El 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> regula la expresión de los receptores de prostanoïdes.....</i>	152
<b>DISCUSION.....</b>	154
<b>CONCLUSION.....</b>	158
<b>CAPITULO IV: Efecto del 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> en el estrés oxidativo: regulación y contribución al efecto antineoplásico .....</b>	159
<b>INTRODUCCION.....</b>	160
<b>RESULTADOS .....</b>	165
<i>La generación de ROS por 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> aumenta en forma dependiente del VDR .....</i>	165
<i>El 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> induce la apoptosis mediante la producción de ROS .....</i>	169
<b>DISCUSION.....</b>	171
<b>CONCLUSION.....</b>	173

<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>174</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>177</b>
<b>PUBLICACIONES DE LA TESIS .....</b>	<b>197</b>

# INTRODUCCIÓN

**E**n el siglo XVII, comenzó la búsqueda por un tratamiento para el raquitismo, patología que se encontraba en alza en el Reino Unido. A comienzos del siglo XX, se dedujo la existencia de vitaminas en diferentes alimentos debido a las consecuencias clínicas por una ingesta insuficiente y a experimentos en animales. Varios grupos de investigación probaron la importancia del aceite de hígado de bacalao y la luz solar para tratar esta condición (Cheadle, 1888; Chick et al., 1922). McCollum y colaboradores (1918) mediante la alimentación de ratas con dietas ricas en cereales pero deficientes en vitamina A y calcio, advirtieron cambios esqueléticos y clínicos propios de pacientes pediátricos con raquitismo. Mas tarde, estudiaron el aceite de hígado de bacalao que se utilizaba para el tratamiento de la enfermedad en ratas raquílicas y lograron revertir el cuadro. De esta forma, McCollum propuso una nueva vitamina presente en el aceite de hígado de bacalao (McCollum et al., 1922), que luego se conocería como vitamina D. Desde 1930, la leche y otros alimentos en Europa y Estados Unidos, comenzaron a ser reforzados con vitamina D y se promovió la exposición a los rayos UV, medidas clave para disminuir la incidencia de raquitismo en la población urbana (Bivins, 2014).

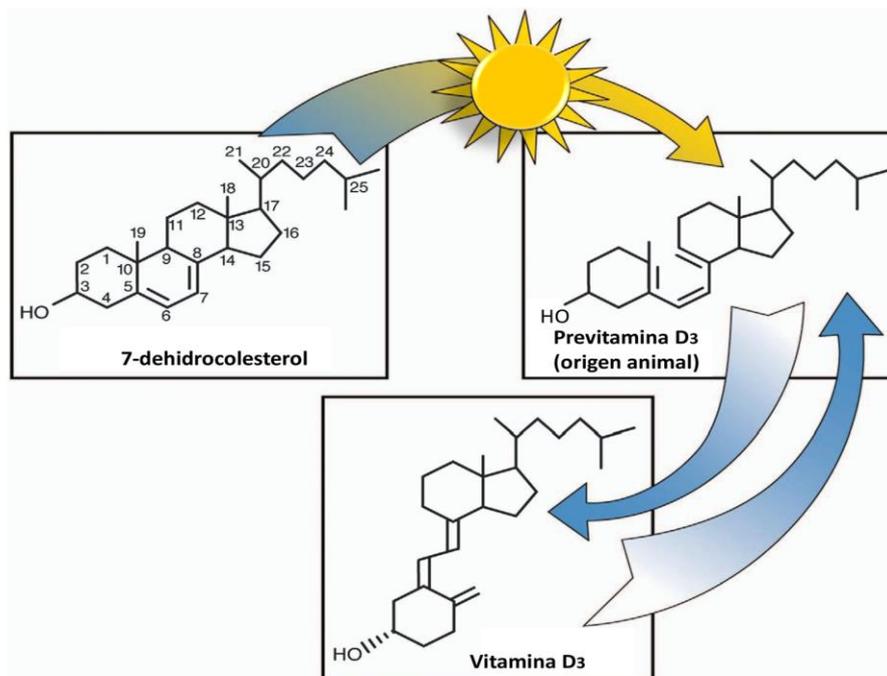
### **Estructura**

La vitamina D es un compuesto liposoluble secosteroide, derivado a partir del ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano similar a las hormonas esteroideas clásicas, pero con una ruptura en el enlace carbono-carbono 9,10 del anillo B. Se caracteriza por tener flexibilidad conformacional debido a la rotación de sus cadenas carbonadas (Dixon and Mason, 2008; Norman, 2008). Su fórmula fundamental es  $C_{27}H_{44}O$ , presenta tres dobles ligaduras y una cadena lateral que diferencia los miembros de la familia de vitaminas D entre sí. Los integrantes más importantes son

la previtamina D<sub>3</sub> o colecalciferol (**Figura 1**) y la previtamina D<sub>2</sub> o ergocalciferol, ambos producidos por exposición a radiación UV (DeLuca, 2014; Gilaberte et al., 2011). El ergocalciferol o D<sub>2</sub> es de origen vegetal y estructuralmente difiere de la D<sub>3</sub> porque su cadena lateral presenta un CH<sub>3</sub> y una doble ligadura adicionales (Gilaberte et al., 2011; Mallet, 2010). A su vez, afecta su asociación a la proteína ligadora de vitamina D (DBP) y por ende su metabolismo (Bikle, 2012).

## **Fuentes**

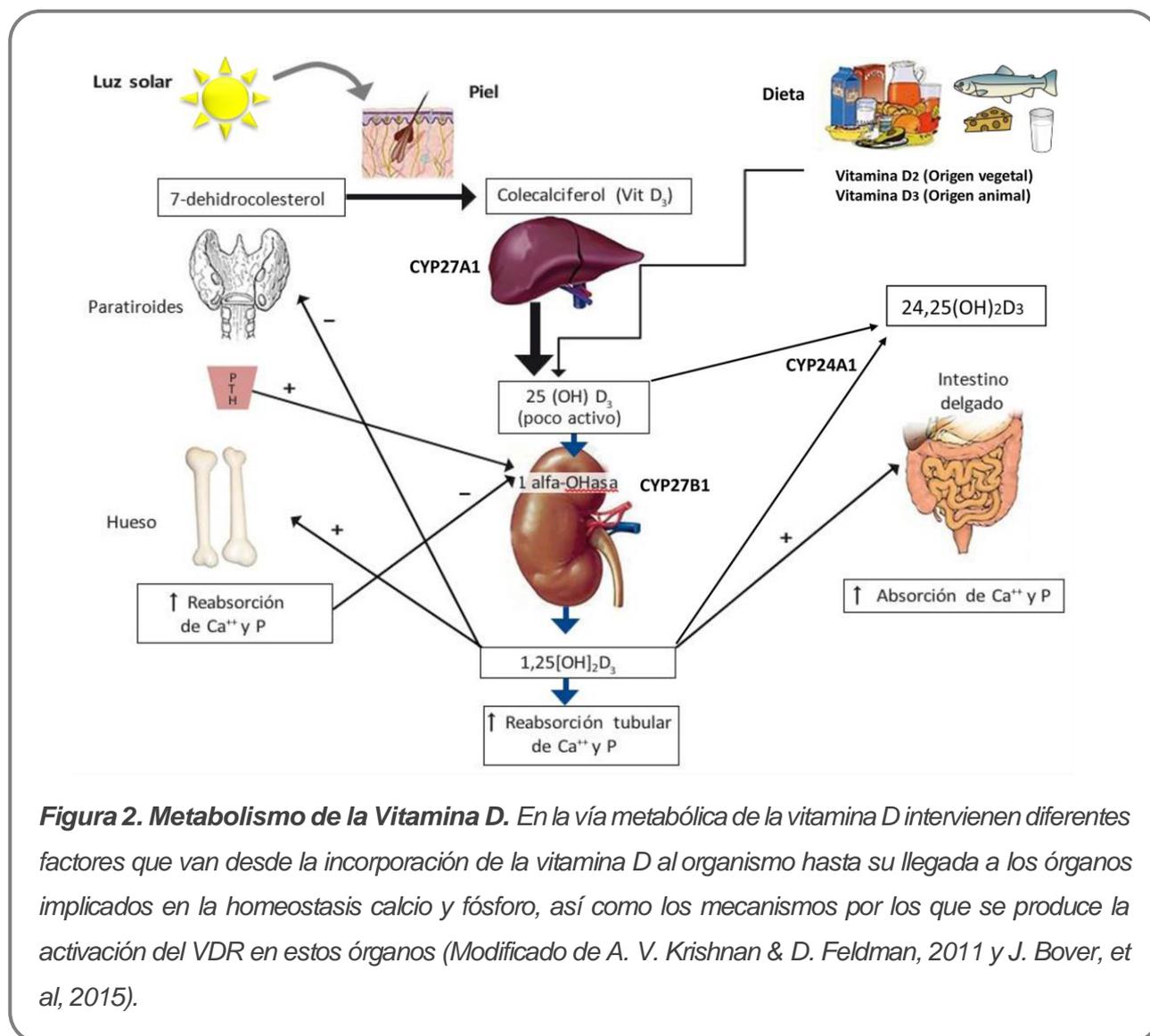
De las tres fuentes que se conocen de vitamina D, la síntesis en la piel mediante la exposición a luz solar es la más importante, en menor medida proviene de la dieta (D<sub>2</sub> o ergocalciferol de origen vegetal y D<sub>3</sub> o colecalciferol de origen animal) y los suplementos vitamínicos. No obstante, como la vitamina D tiene la capacidad de ser producida en cantidades suficientes con una exposición adecuada a la luz solar, no es técnicamente una vitamina. Para esto debería ser un factor dietético esencial, cuando en realidad es una prohormona generada fotoquímicamente en la piel a partir del 7-dehidrocolesterol (Dusso et al., 2005; Norman, 2008). Si bien tiene un doble origen, exógeno y endógeno, si actúa como una vitamina en personas que por condiciones socioeconómicas o geográficas viven con baja exposición a la luz solar (Mallet, 2010). Diversos factores pueden interferir con la cantidad de radiación UV que llega a la piel como el uso de protectores solares, el grado de pigmentación cutánea o factores geográficos, como el momento del día, las condiciones climáticas como neblina, la estación, la latitud y la contaminación del aire (Engelsen, 2010; Holick, 2007; Mostafa and Hegazy, 2015).



**Figura 1. Modificación fotoquímica de la Vitamina D<sub>3</sub>.** La conversión de 7-dehidrocolesterol a previtamina D<sub>3</sub> por acción de la luz UV (282 – 310 nm). Isomerización en equilibrio dependiente de la temperatura corporal entre Previtamina D<sub>3</sub> y Vitamina D<sub>3</sub> (Modificado de DeLuca, 2014).

## Síntesis y Metabolismo

El sistema de enlaces dobles conjugados del 7-dehidrocolesterol en la epidermis, permite la absorción de luz en el rango UV. Esto inicia la conversión fotoquímica mediante la ruptura del anillo B, dando lugar a la previtamina D<sub>3</sub> (Norman, 2008) que se convierte rápidamente en vitamina D<sub>3</sub> mediante un proceso que depende de la temperatura (Bover et al., 2015; Holick, 2011; Krishnan and Feldman, 2011) (**Figura 2**). También provienen de la ingesta dietética las vitaminas D<sub>2</sub> o D<sub>3</sub>, pero en menor proporción (Bikle, 2012). Luego una serie de hidroxilaciones se van a transformar en la forma biológicamente activa. Para esto la proteína de unión a la vitamina D (DBP) se encarga del transporte por circulación al hígado donde la enzima 25-hidroxilasa microsomal (25-OHase, codificada por el gen CYP27A1) realiza la primera hidroxilación de la cadena lateral formando el 25-hidrocolecalciferol (25OH-



D<sub>3</sub>). Este es la principal forma circulante de vitamina D<sub>3</sub> y la que determina el estado de vitamina D de una persona por medio del test bioquímico en suero (Holick, 2011). El 25OH-D<sub>3</sub> es transportado nuevamente por la DBP a los riñones donde en las células de los túbulos proximales efectúa la segunda hidroxilación mediante la enzima 1 $\alpha$ -hidroxilasa mitocondrial (1 $\alpha$ -OHasa, codificada por el gen CYP27B1). El resultado final es la forma biológicamente activa 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> o calcitriol, el control de su concentración en circulación es el punto de regulación más importante. En caso de acumulación de 25OH-D<sub>3</sub> o de 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, un mecanismo de retroalimentación

negativa inhibe la actividad enzimática de ambas hidroxilasas. A su vez, la enzima multicatalítica 25D-24-hidroxilasa (24-OHasa o CYP24A1) utiliza como sustrato 25OH-D<sub>3</sub> o 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> para la formación del producto 24,25-hidroxitamina D (24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) que facilita la excreción biliar (Wintermeyer et al., 2016). Un aumento en los niveles de 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> inducen la síntesis de 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, por el contrario, el incremento de calcio, fosfatos y 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> la reprimen. La expresión de CYP27B1 se encuentra regulada por calcio, fosfatos, la hormona paratiroidea (PTH) y el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23). Cuando los niveles de calcio son bajos, la glándula paratiroidea secreta PTH que estimula a CYP27B1. Por otro lado, cuando los niveles de fosfatos se encuentran elevados los osteoblastos y los osteocitos producen FGF23 que inhibe directamente a CYP27B1 y a su vez la secreción de PTH (Dusso et al., 2005). Por lo que PTH induce la expresión génica de CYP27B1, mientras que el 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> la disminuye (Deeb et al., 2007).

### **Mecanismo de acción**

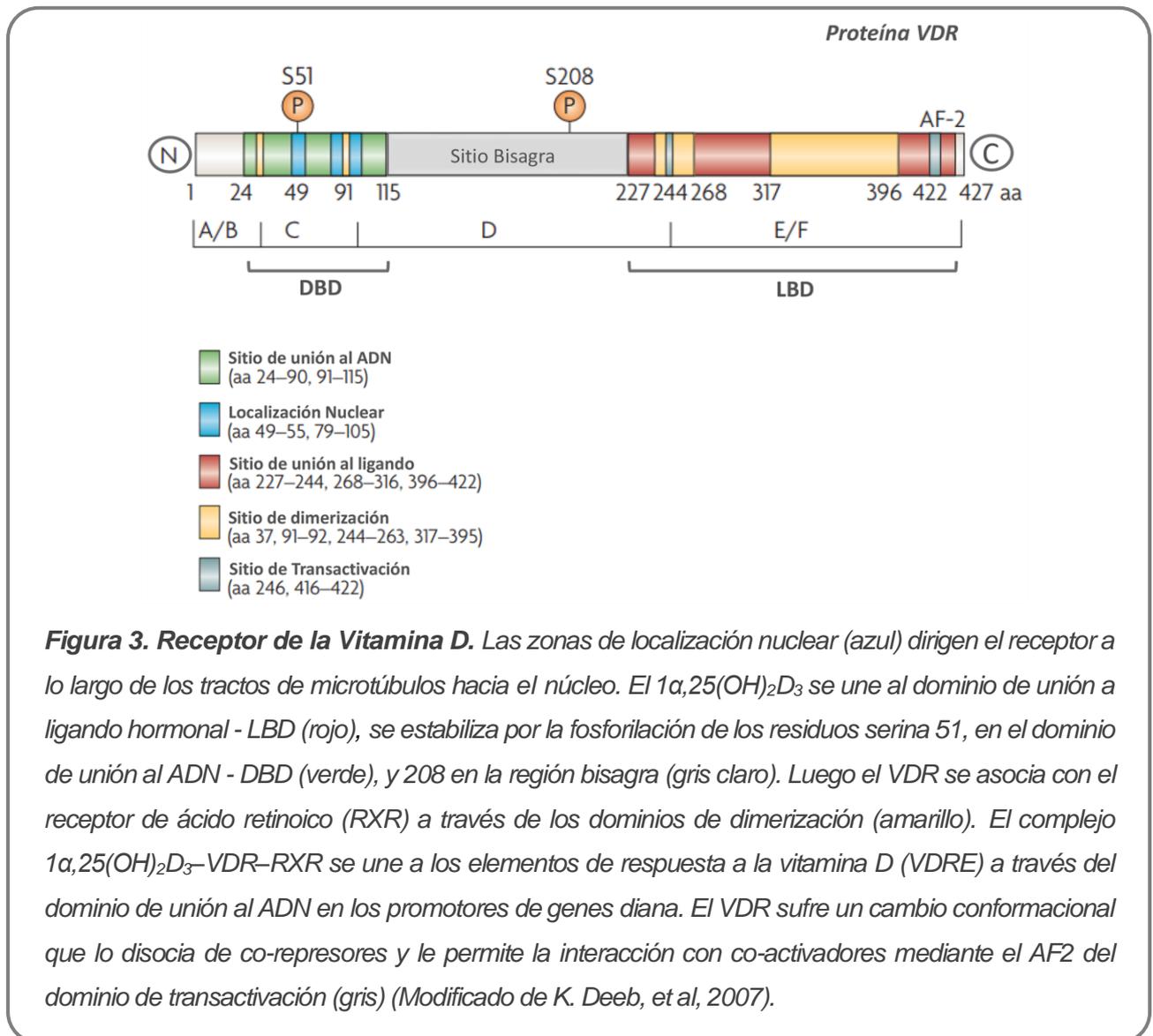
Luego de la síntesis de los metabolitos hidroxilados, tanto el 25OH-D<sub>3</sub> como el 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, son transportados por la DBP en circulación sanguínea. Una vez que encuentran la célula blanco o diana, se libran de la DBP y difunden libremente por la bicapa lipídica. Dentro de la célula, el 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> se asocia al receptor de la vitamina D con alta afinidad y especificidad. Este puede actuar como un factor de transcripción activado por ligando a nivel genómico y por medio de respuestas rápidas a nivel no genómico, las cuales no requieren la síntesis de proteínas (Feldman et al., 2014).

### **Receptor de Vitamina D**

El receptor de vitamina D (VDR) media las acciones biológicas de la vitamina D. Es miembro de la superfamilia de receptores nucleares que dado que actúa como

factor de transcripción dependiendo de la unión al ligando y su secuencia aminoacídica tiene homología significativa con los receptores para el ácido retinoico, la hormona tiroidea, las hormonas sexuales y los esteroides suprarrenales. El gen del VDR se encuentra evolutivamente conservado en peces, aves y mamíferos. El gen del VDR humano se localiza en el cromosoma 12 y el VDR de ratón en el cromosoma 15, en ambos casos contiene ocho exones codificantes. En el gen del VDR humano hay al menos dos promotores y seis exones no codificantes, por el contrario, en el gen del VDR de ratón hay solo dos exones no codificantes (Christakos et al., 2015; Nezbedova and Brtko, 2004). La proteína VDR (423 aminoácidos para VDR de ratón o 427 aminoácidos para VDR humano) contiene varios dominios funcionales como el resto de los integrantes de la superfamilia de receptores nucleares (**Figura 3**). Entre ellos se encuentran el dominio A/B de activación transcripcional; el dominio C encargado de la unión al ADN en el extremo NH<sub>2</sub>-terminal altamente conservado *DNA Binding Domain - DBD*; el dominio D o región en bisagra para la flexibilidad rotacional; y el dominio E/F responsable de la heterodimerización u homodimerización, de la unión al ligando por el dominio variable en el extremo COOH-terminal (*Ligand Binding Domain – LBD*) y de la transactivación dependiente del ligando (*Activation Function Domain - AF2*). El DBD es una región de dedos de zinc rica en cisteína, y el LBD comprende al menos 12 hélices- $\alpha$  y 3 láminas- $\beta$  (Christakos et al., 2015; Dusso et al., 2005; Nezbedova and Brtko, 2004). El VDR es una fosfoproteína, dado que la unión del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  al VDR induce la fosforilación en residuos serina que estabiliza del receptor (Deeb et al., 2007; Nezbedova and Brtko, 2004). En cuanto a la localización del VDR, dentro de la célula se encuentra en el citosol y en el núcleo (González Pardo et al., 2008); con respecto a los tejidos la gran mayoría lo expresa en mamíferos (Carlberg and Seuter, 2007; Nezbedova and Brtko, 2004). El VDR es la única proteína

que puede unirse a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en concentraciones nanomolares (Maestro et al., 2016).



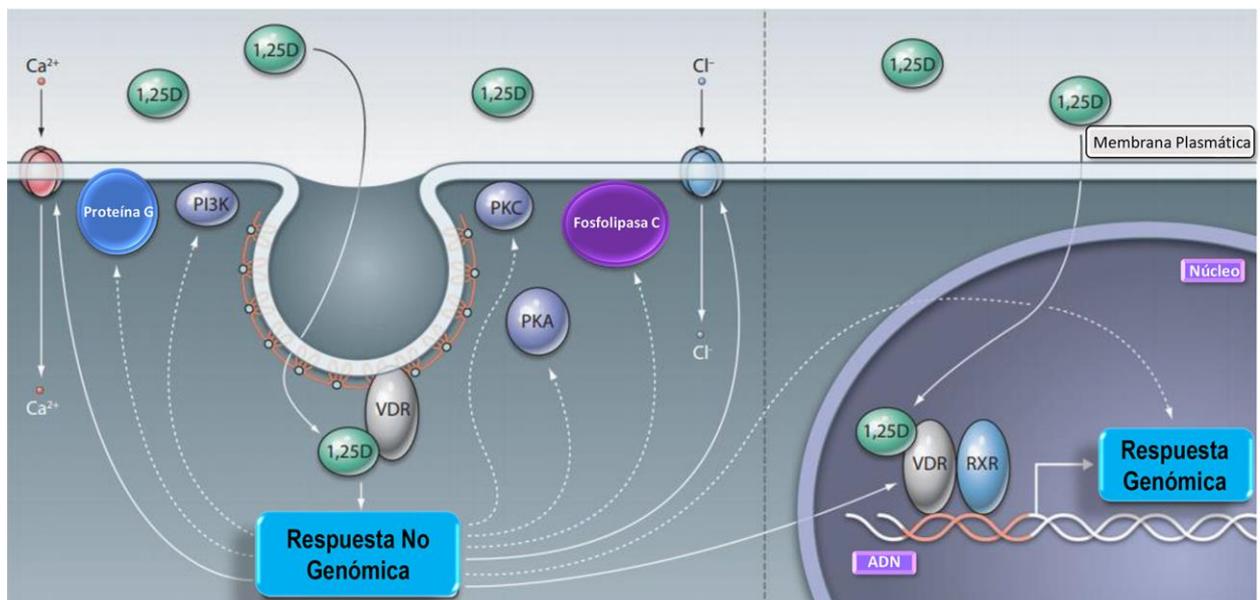
### Acción genómica

Como el resto de los integrantes de la superfamilia de receptores nucleares, una vez que el VDR se asocia al ligando, en este caso el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , se dirige al genoma para actuar como factor de transcripción (Bikle, 2010; Carlberg and Seuter, 2007). Así, el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  entra por difusión simple a la célula, se asocia al VDR e induce su fosforilación (**Figura 4**) (Mizwicki and Norman, 2009). Sin embargo, la

afinidad del VDR monomérico para unirse al ADN no es suficiente para formar un complejo estable, por lo que el receptor fosforilado unido al ligando sufre un cambio conformacional que le permite asociarse al receptor del ácido 9-cisretinoico (RXR), aunque existen ciertas excepciones donde puede no estar presente (Meyer et al., 2012). El complejo  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR-RXR se une a secuencias específicas denominadas elementos de respuesta de Vitamina D (*Vitamin D response elements* - VDREs) ubicados en los promotores de los genes diana (Deeb et al., 2007; Nezbedova and Brtko, 2004). Mecanismo que, requiere el reclutamiento adicional de proteínas coactivadoras o co-represoras desencadenando eventos de activación o inhibición de la transcripción génica (Carlberg and Seuter, 2007). Así el VDR junto al RXR actúan como un heterodímero obligado (Christakos et al., 2015) capaz de controlar la transcripción de genes que codifican proteínas encargadas de las funciones genómicas tradicionales de la vitamina D, como la señalización de la absorción intestinal de calcio y fosfato para efectuar la homeostasis esquelética y de calcio (Hausler et al., 2011). Son al menos once los genes que codifican los efectores de la homeostasis ósea y mineral generando así la posibilidad de un envejecimiento saludable (Bikle, 2010; Hausler et al., 2011). Existen reportes de la acción del complejo VDR- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en el núcleo de células intestinales, donde favorece la expresión del mensajero de genes que codifican proteínas esenciales para la absorción intestinal de calcio como lo son las calbindinas, involucradas en el transporte y regulación del calcio intracelular (Russo de Boland, 2005).

### **Acción no genómica**

Las respuestas de acción rápida son independientes de la síntesis proteica y frecuentemente demoran segundos, minutos hasta una hora, mientras que las respuestas de acción genómica previamente mencionadas, pueden tardar varias



**Figura 4. Respuestas genómica y no genómica del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** En la vía genómica, la ocupación del VDR nuclear por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  conduce a la heterodimerización con RXR y a una regulación hacia arriba o hacia abajo de la transcripción de genes sujetos a regulación hormonal. En la vía no genómica, el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  también puede unirse al VDR asociado con caveolas de la membrana plasmática para generar respuestas rápidas, activando sistemas de segundo mensajero como la apertura de canales de cloruro dependiente de voltaje o canales de calcio. Algunas de estas cascadas también pueden conducir a cambios en la expresión génica, ya sea a través de los efectos sobre la función del VDR en el núcleo o independientemente de él (Modificado de M.T. Mizwicki & A. W. Norman, 2009).

horas a días para manifestarse completamente (Hausler et al., 2011). El efecto no genómico mejor descrito sucede en células intestinales, donde el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  estimula la entrada de calcio a través de canales ubicados en la membrana basolateral, su apertura y cierre son controlados por el potencial de membrana (canales sensibles a voltaje) y regulados por fosforilación de las proteínas que conforman el poro o canal (Hii and Ferrante, 2016; Russo de Boland, 2005). El calcitriol es capaz de promover activación de moléculas de señalización, la generación de segundos mensajeros y la activación de proteínas quinasas como PKA y PKC, Src, MAPKs y la proteína quinasa dependiente de Ca-calmodulina II (Fleet,

2004; Norman, 2006; Tan et al., 2007). En aves y mamíferos, puede activar en segundos o minutos, la vía AC/AMPc/PKA (Russo de Boland, 2005). Las respuestas rápidas han sido estudiadas para diferentes esteroides y pueden encontrarse inducidas por la unión de la hormona a una proteína asociada a la membrana (Levin, 2008), lo que involucra un receptor clásico como el VDR, pero asociado a las caveolas de la bicapa lipídica, o un receptor no clásico de esteroides específico para respuestas rápidas denominado MARRS (*Membrane Associated Rapid Response Steroid binding protein*) (Deeb et al., 2007). Los efectos generados por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  iniciados en la membrana o en el núcleo pueden conectarse provocando el entrecruzamiento de diferentes vías de señalización (Hausler et al., 2011). En varias ocasiones el receptor nuclear VDR es capaz de translocar a la membrana plasmática para mediar respuestas rápidas junto a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , como 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).

### **Función Biológica**

La Vitamina D se conoce principalmente por sus efectos clásicos en la regulación de la homeostasis de calcio y fosforo y, en el mantenimiento de la integridad ósea (Deeb et al., 2007). Las interacciones entre sus órganos blanco como riñón, hueso, glándula paratiroides e intestino mantienen los niveles extracelulares de calcio dentro de límites normales, proceso que es vital para la fisiología celular y la integridad esquelética (Dusso et al., 2005). Favoreciendo así la disminución del riesgo de fracturas óseas y la calcificación ectópica (Hausler et al., 2011).

En el intestino delgado la vitamina D es esencial para mejorar la eficiencia de la absorción de calcio y fosfato de la dieta. Estudios en ratones que carecen de VDR,  $1\alpha\text{-OHasa}$ , o ambos exponen evidencia de que la falta de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y su receptor

son claves para el desarrollo de raquitismo en los niños y la osteomalacia en adultos. Lo que hace a la vitamina D indispensable para el crecimiento y mantenimiento de un esqueleto mineralizado donde actúan en conjunto los osteoblastos y los osteoclastos (Dusso et al., 2005). En los osteoblastos, el complejo VDR- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aumenta la expresión del ligando RANKL (*Receptor Activator Nuclear Kappa Ligand - RANKL*), que se une a su receptor RANK (*Receptor Activator Nuclear Kappa - RANK*) en la superficie de las células progenitoras de osteoclastos en osteoclastos maduros o células de resorción ósea (Anderson et al., 2012). Además, reprime la expresión de OPG (osteoprotegerina), un receptor señuelo que se une a RANKL y previene la osteoclastogénesis mediada por RANK. Durante el proceso de calcificación de la matriz las costillas, el tórax o el cráneo pueden adquirir una deformidad típica de raquitismo en casos de deficiencia de vitamina D (Bikle, 2012). Por lo tanto, la osteogénesis y la osteoclastogénesis necesitan del complejo VDR- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  para un acoplamiento normal durante la remodelación ósea. En cuanto a la glándula paratiroidea, la deficiencia de vitamina D produce hiperplasia, aumento de la síntesis y secreción de PTH. Contrariamente, la administración de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibe la síntesis de PTH y la hiperplasia, actuando como un terapéutico efectivo para hiperparatiroidismo secundario de enfermedades renales crónicas. En los riñones,  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  controla estrictamente su propia homeostasis mediante la supresión de  $1\alpha\text{-(OH)asa}$  y la estimulación de  $24\text{-(OH)asa}$  (Dusso et al., 2005).

### **Efectos no clásicos**

Los efectos de la vitamina D no se encuentran limitados a las acciones calcitrópicas, existen diversos mecanismos subyacentes que resultan críticos en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades. El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  promueve la diferenciación de monocitos-macrófagos, células presentadoras de antígeno, células

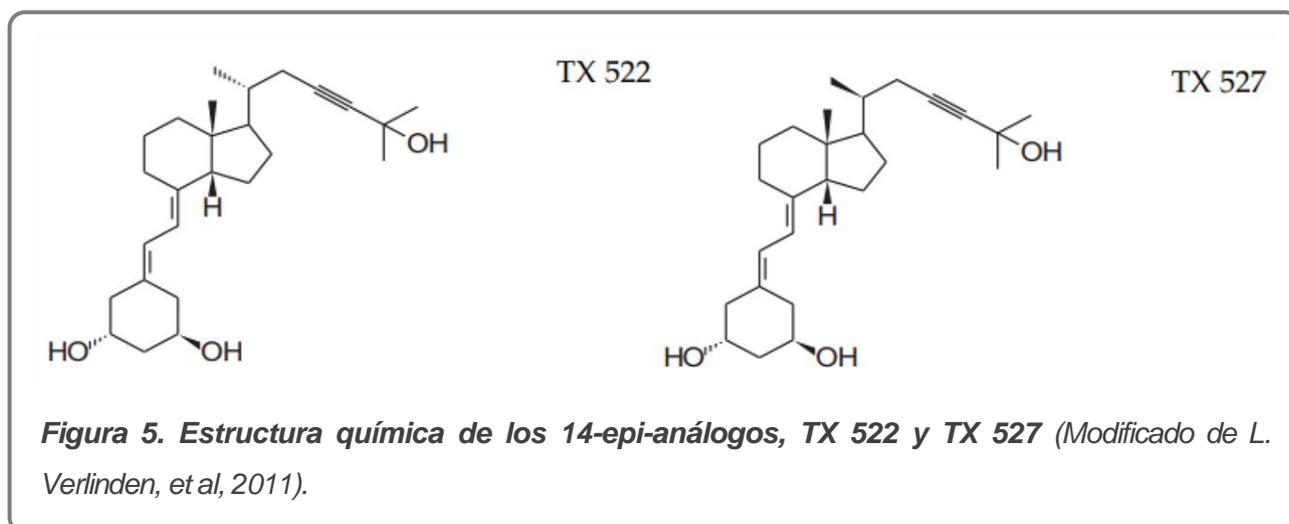
dendríticas y linfocitos mejorando el control de infecciones, enfermedades autoinmunes y la tolerancia en los trasplantes (Dusso et al., 2005). El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  participa en la modulación de la respuesta inmune innata, mejorando los efectos antimicrobianos de monocitos y macrófagos por aumento de su capacidad de fagocitosis, quimiotaxis y síntesis de péptidos antimicrobianos (Prietl et al., 2013). En la respuesta inmune adaptativa, tras la activación y proliferación de los linfocitos T y B, estos aumentan la expresión de manera significativa del VDR, permitiendo la regulación de hasta 500 genes sensibles a la vitamina D que influyen en la diferenciación y proliferación de estas células (Mallet, 2010; Prietl et al., 2013). En las células pancreáticas  $\beta$ , la deficiencia de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  genera una regulación anormal de la secreción de insulina independientemente de las alteraciones en los niveles de VDR. Efecto que puede corregirse mediante la administración de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  independientemente de los cambios en los niveles séricos de calcio o PTH (Dusso et al., 2005). En el corazón, el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  regula la hipertrofia de miocitos cardíacos y la síntesis y liberación del factor natriurético auricular (Christakos et al., 2015). En deficiencia de vitamina D puede manifestarse debilidad y atrofia del músculo esquelético, con anomalías en la relajación y la contracción muscular (Dusso et al., 2005). La capacidad del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  de ejercer efectos genómicos y no genómicos en varios tipos de tejidos podría deberse a que estos expresan el VDR (Rosen et al., 2012). Diferentes reportes indican un rol protagónico de la vitamina D en la regulación de procesos biológicos de una amplia variedad de tejidos normales y tumorales, lo que demuestra su importancia en el tratamiento del cáncer (Deeb et al., 2007). Los mecanismos por los cuales puede suprimir el desarrollo tumoral son diversos y específicos del tipo celular. Entre estos se encuentran la inhibición de la proliferación por bloqueo del ciclo celular, por interferencia con la señalización por

factores de crecimiento o por inhibición de la actividad transcripcional como en el caso de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina; la inducción de supresores tumorales, como p53 y p21 (Audo et al., 2003); la estimulación de la reparación del daño del ADN (Sidelnikov et al., 2010) y de la apoptosis; la prevención de la angiogénesis y la inhibición de la metástasis (Bikle, 2014; Krishnan and Feldman, 2011). Siendo las enfermedades infecciosas y la inflamación crónica representantes del 25% de los factores causantes de cáncer (Murata, 2018), la vitamina D provoca la atenuación de la inflamación mediante la inhibición de la expresión del factor NF- $\kappa$ B y de la enzima COX-2 (Krishnan and Feldman, 2011).

### **Análogos**

Diferentes estudios muestran consistentemente un beneficio probable para la suplementación con vitamina D en el cáncer, sin embargo, su utilización en la terapéutica se encuentra limitada por sus efectos hipercalcemiantes, aumentando la resorción ósea e hipercalciuria. Así la síntesis de análogos con menor actividad calcémica podría aumentar las posibilidades de éxito en el tratamiento del cáncer (Bikle, 2014; Eelen et al., 2007; González Pardo et al., 2012a). Se conocen más de 3.000 análogos sintéticos de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , con diferencias en estructura química y farmacocinética, la mayoría son agonistas y solo unos pocos antagonistas. Han sido desarrollados para mejorar el perfil biológico de la hormona natural en una aplicación terapéutica, disociando los efectos calcémicos no deseados de la acción antiproliferativa benéfica en células malignas (Bouillon et al., 2005; Eelen et al., 2007). Se han utilizado para enfermedades hiperproliferativas, como la psoriasis y diferentes tipos de cáncer, o en trastornos óseos, como la osteoporosis (Carlberg and Molnar, 2012). Entre los más reconocidos se encuentran los 14-epi-análogos, TX 522 (14-epi-19-nor-23-yne- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) y TX 527 (19-nor-14,20-bis-epi-23-yne- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ),

que carecen del grupo metileno del anillo A en el C-10 para evitar la conversión térmica en derivados de previtaminas (Verlinden et al., 2011) (**Figura 5**). Ambos compuestos se unen al VDR, provocan la heterodimerización con el RXR, interaccionan con los VDREs y son al menos 10 veces más potentes que  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  para inhibir la proliferación celular *in vitro*, con efectos calcémicos *in vivo* mucho más bajos. Particularmente, TX 527 tiene la capacidad de inhibir el cáncer de mama humano (Eelen et al., 2005; Verlinden et al., 2000) y la proliferación de células endoteliales transformadas por el vGPCR asociado al sarcoma de Kaposi, en ambos casos *in vitro* e *in vivo* (González Pardo et al., 2010).



## ONCOVIRUS

Los virus tumorales u oncovirus, son los virus necesarios para el desarrollo del cáncer, pero no suficientes dado que la incidencia de cáncer es mucho menor que la prevalencia del virus en poblaciones humanas. La carcinogénesis asociada a una infección viral es un proceso complejo con una latencia prolongada e infecciones persistentes, que puede ocurrir años o décadas después de la infección aguda (Butt and Miggin, 2012; Martin and Gutkind, 2009). Un oncovirus y su hospedador se encuentran en una batalla constante, definida entre la acción el sistema inmune del

hospedador durante una infección viral y la capacidad de evasión inmunológica del virus, adquirida mediante el proceso evolutivo, dado que depende de la persistencia para el desarrollo del fenotipo maligno. Al superar la capacidad del huésped para mantener la homeostasis, los cambios celulares que provoca conducen a la tumorigenesis (S. Patrick and Chang, 2010). Según Weinberg & Hanahan, existe un grupo de estrategias para el desarrollo del cáncer que permite discernir cual es la contribución de los genes virales, la respuesta del huésped a la infección y las mutaciones somáticas, que desencadenan el proceso oncogénico (Hanahan and Weinberg, 2011; Mesri and Cesarman, 2014) (**Figura 6**).

La cooperación entre inflamación crónica, inmunosupresión y mutágenos ambientales, es clave para la estrategia viral de replicación y evasión de la respuesta inmune mediante programas antiapoptóticos y proliferativos en la célula infectada (Martin and Gutkind, 2009). Dentro de los cambios originados por los oncovirus se encuentran la síntesis de proteínas virales, capaces de perturbar la señalización que regula el crecimiento celular y la supervivencia; y la adquisición de mutaciones por dos mecanismos. Por un lado, el hospedador reconoce el genoma viral y responde frente al daño del ADN, adquiriendo una inestabilidad genética que aumenta la tasa de mutación (Weitzman and Weitzman, 2014), por otro lado, respuestas inflamatorias crónicas frente a la infección viral persistente generan especies reactivas de oxígeno (ROS) (Mesri and Cesarman, 2014). Son al menos siete los virus humanos que contribuyen al 10-15% de los cánceres en todo el mundo. Entre ellos se encuentran los que poseen un genoma de ADN como el EBV (virus de Epstein-Barr EBV), el HPV (virus del papiloma humano), HBV (virus de la hepatitis B), el KSHV (virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi) y el MCV (poliomavirus de células de Merkel); o un



**Figura 6. Riesgo oncogénico de las estrategias de persistencia y replicación viral.** Para maximizar la replicación y la persistencia, los virus utilizan la maquinaria de señalización de la célula huésped que conduce a adquisición de características neoplásicas. Dentro de las principales estrategias se encuentran la creación de condiciones de replicación mediante la inducción del ciclo celular, la reprogramación metabólica y la inducción de la angiogénesis; asegurar una correcta replicación viral, mediante el reclutamiento o la inhibición de las respuestas frente al daño del ADN; la maximización de la producción viral evitando la respuesta inmune e inhibiendo la apoptosis hasta la maduración de los viriones; y finalmente la multiplicación de los episomas latentes por medio de la proliferación, la supervivencia y la inmortalización celular (Modificado de D. Hanahan & R. A. Weinberg, 2011 y de E. A. Mesri, et al, 2014).

genoma de ARN como el HCV (virus de la hepatitis C) o el HTLV-1 (virus linfotrópico T humano) (Butt and Miggin, 2012; Martin and Gutkind, 2009).

### **Sarcoma de Kaposi**

En 1872, el dermatólogo vienés Moritz Kaposi, describió neoplasias multicéntricas, cutáneas y extracutáneas que afectaban mayormente a personas de edad avanzada con un cuadro clínico prolongado. Actualmente a esta patología maligna se la denomina con el epónimo sarcoma de Kaposi (SK) (Francés and Lebbé,

2009), cuya incidencia aumentó desde la aparición de la pandemia del sida a finales del siglo pasado. En 1994, un grupo de la Universidad de Columbia, EE. UU., descubrió mediante el análisis de diferencia representacional (técnica basada en PCR), las secuencias de ADN de un nuevo  $\gamma$ -herpesvirus o herpesvirus humano 8 (HHV-8) presente en lesiones de KS, pero no en piel no afectada u otros tejidos enfermos del mismo paciente, lo que explica el término KSHV (herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi) (Chang et al., 1994; Mesri et al., 2010). El genoma completo del KSHV ha sido secuenciado (Russo et al., 1996) y estudios sobre marcos de lectura abiertos individuales (ORF) llevaron al descubrimiento de nuevos mecanismos para la oncogénesis viral (Mesri and Cesarman, 2014). El KSHV se caracteriza por la proliferación de células fusiformes infectadas de origen endotelial, vascular y linfático, acompañadas de angiogénesis intensa con extravasación de eritrocitos e infiltración inflamatoria. El KSHV puede infectar células como el linaje endotelial, monocitos y células B. Asimismo codifica homólogos virales oncogénicos de proteínas pertenecientes al huésped para impulsar la supervivencia celular, la proliferación, la evasión de la respuesta inmune y la angiogénesis (Mesri and Cesarman, 2014). Existen cuatro formas epidemiológicas (Callo, 1998). La **forma clásica** se caracteriza por tumores de piel relativamente indolentes predominantemente en hombres de edad avanzada en varios países mediterráneos (Italia, Grecia) o del norte de África. La **forma endémica africana**, se encuentra en personas VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) negativas en países de África oriental y central, es una enfermedad más extensa con afectación visceral, que también puede ocurrir en niños. La **forma epidémica** o asociada al SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) es más agresiva y afecta principalmente a hombres homosexuales y bisexuales infectados con VIH en países occidentales (en quienes la prevalencia de KSHV es

mayor que en la población general) y en África subsahariana, donde afecta a personas infectadas con KSHV y VIH o no infectadas independientemente de su orientación sexual. La **forma iatrogénica** ocurre en receptores de trasplantes inmunosuprimidos (Schulz and Cesarman, 2015). La existencia de estas diferentes formas clínicas demuestra la importancia de los cofactores que promueven el desarrollo de SK en individuos infectados por KSHV. Un mayor riesgo de SK en pacientes con SIDA y en receptores de trasplante, sugiere que una respuesta inmune insuficiente al KSHV predispone al desarrollo tumoral (Grulich et al., 2007; Schulz and Cesarman, 2015). El KSHV causa a su vez dos patologías linfoproliferativas de células B el linfoma PEL (*Primary Effusion Lymphoma - PEL*) y la variante de células plasmáticas de la enfermedad de Castleman (*Multicentric Castleman's Disease - MCD*) (Schulz and Cesarman, 2015).

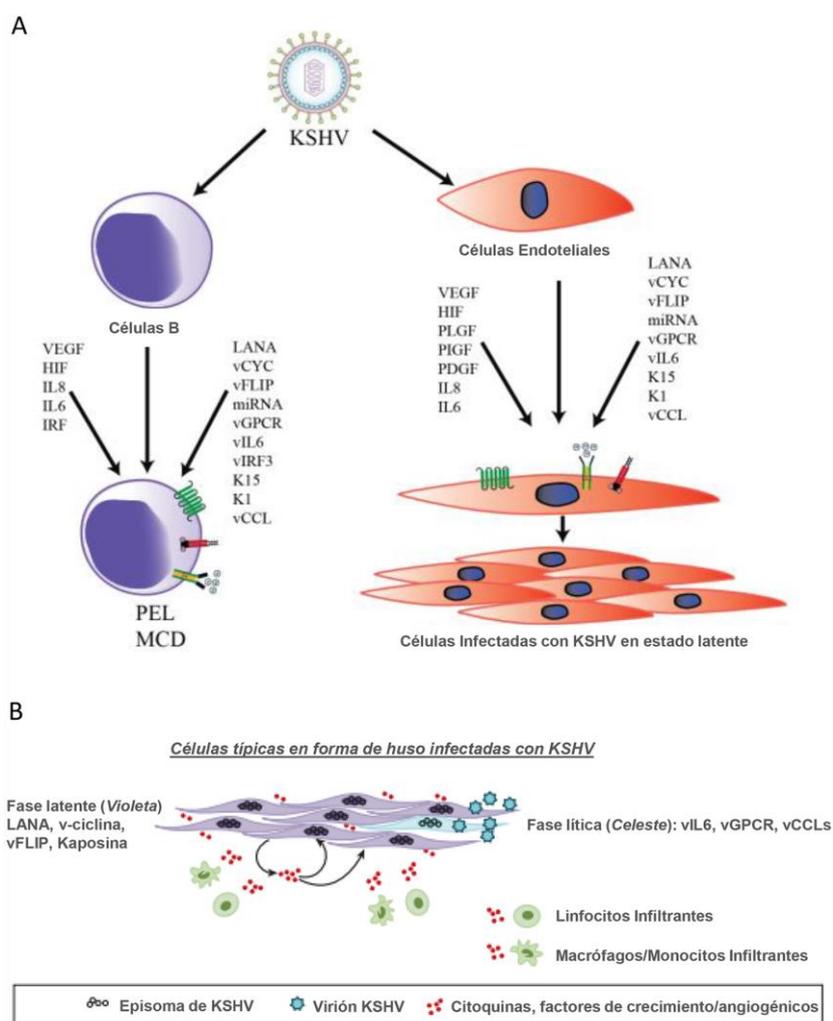
Una lesión proliferativa benigna puede diferenciarse de una neoplasia porque esta última se origina en una sola célula formando un tumor clonal, mientras que una lesión benigna sería necesariamente policlonal (Gill et al., 1998). El SK es un tumor inusual, a diferencia de otros tipos de cáncer, posiblemente no sea el resultado de un acontecimiento puntual de transformación celular que resulta en el crecimiento autónomo tumoral, sino que se produce por combinación de un virus con propiedades angiogénicas y de eventos inflamatorios locales o sistémicos (Schulz and Cesarman, 2015). Es decir, lesiones múltiples del SK en un mismo individuo son principalmente de orígenes celulares independientes o policlonales, y pueden evolucionar posteriormente en circunstancias como la inmunosupresión a un proceso monoclonal (Judde et al., 2000; Schulz and Cesarman, 2015). El origen policlonal acompañado de alteraciones oncogénicas celulares, infiltración de células inflamatorias, y liberación de mediadores inflamatorios y angiogénicos por células infectadas con

KSHV, presenta un proceso oncogénico que es impulsado por inflamación o neoplasia paracrina. Por lo que el KS es verdaderamente neoplásico en etapas tardías o avanzadas de la enfermedad (Cancian et al., 2013; Mesri et al., 2010; Purushothaman et al., 2016) (**Figura 7**).

### **Oncogénesis del Sarcoma de Kaposi**

La infección por KSHV de células endoteliales y hematopoyéticas circulantes produce ciertas modificaciones en la morfología, metabolismo, tasa de crecimiento, esperanza de vida y expresión génica, lo que se manifiesta como SK (Mesri et al., 2010). Así, las lesiones de SK son histológicamente complejas y altamente vascularizadas, se desarrollan en tejido conectivo típicamente debajo de la piel, formando manchas elevadas purpuras muy características debido a la alta vascularización. Contienen células proliferativas se cree de origen endotelial en forma de huso con células mononucleares infiltrantes y abundantes espacios neovasculares (Martin and Gutkind, 2009). Varias de las proteínas codificadas por el KSHV tienen propiedades transformantes y oncogénicas.

Al igual que otros herpesvirus, el KSHV experimenta etapas de replicación latentes o líticas. Durante la fase latente, un sistema inmune silencioso permite que el virus se replique junto con el huésped expresando un número restringido de genes necesarios para el mantenimiento episomal. Pero en la infección lítica, el KSHV expresa el programa de replicación completo para producir nuevos viriones (Cavallin et al., 2014). Los genes que se expresan en ambas fases contribuyen al fenotipo maligno de SK (Mesri et al., 2010). Por otro lado, el KSHV es capaz de inducir mutaciones irreversibles en las células hospedadoras que favorecen la sarcomagénesis luego de la pérdida episomal (Naipauer et al., 2020). Proteínas de fase latente, como LANA que inactiva p53 y pRb o v-ciclina que induce la entrada al



**Figura 7. Transformación celular y progresión del SK.** La infección por KSHV en células endoteliales y linfocitos B, activa múltiples factores autocrinos y paracrinos pertenecientes al virus y a la célula hospedadora, capaces de promover la dediferenciación celular (Modificado de P. Purushothaman, et al, 2016) (A). Las células fusiformes infectadas con KSHV secretan citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento/angiogénicos que estimulan la activación y proliferación, y reclutan células inflamatorias al sitio de infección exacerbando el proceso inflamatorio reactivo inicial. Este puede evolucionar a un crecimiento neoplásico por inmunosupresión. En la fase temprana hay una proliferación policlonal, mientras que en una etapa más avanzada la expansión no solo es mono/oligoclonal sino que el virus, se encuentra principalmente en un estado latente y solo una fracción experimenta replicación lítica (Modificado de L. Cancian, et al, 2013) (B).

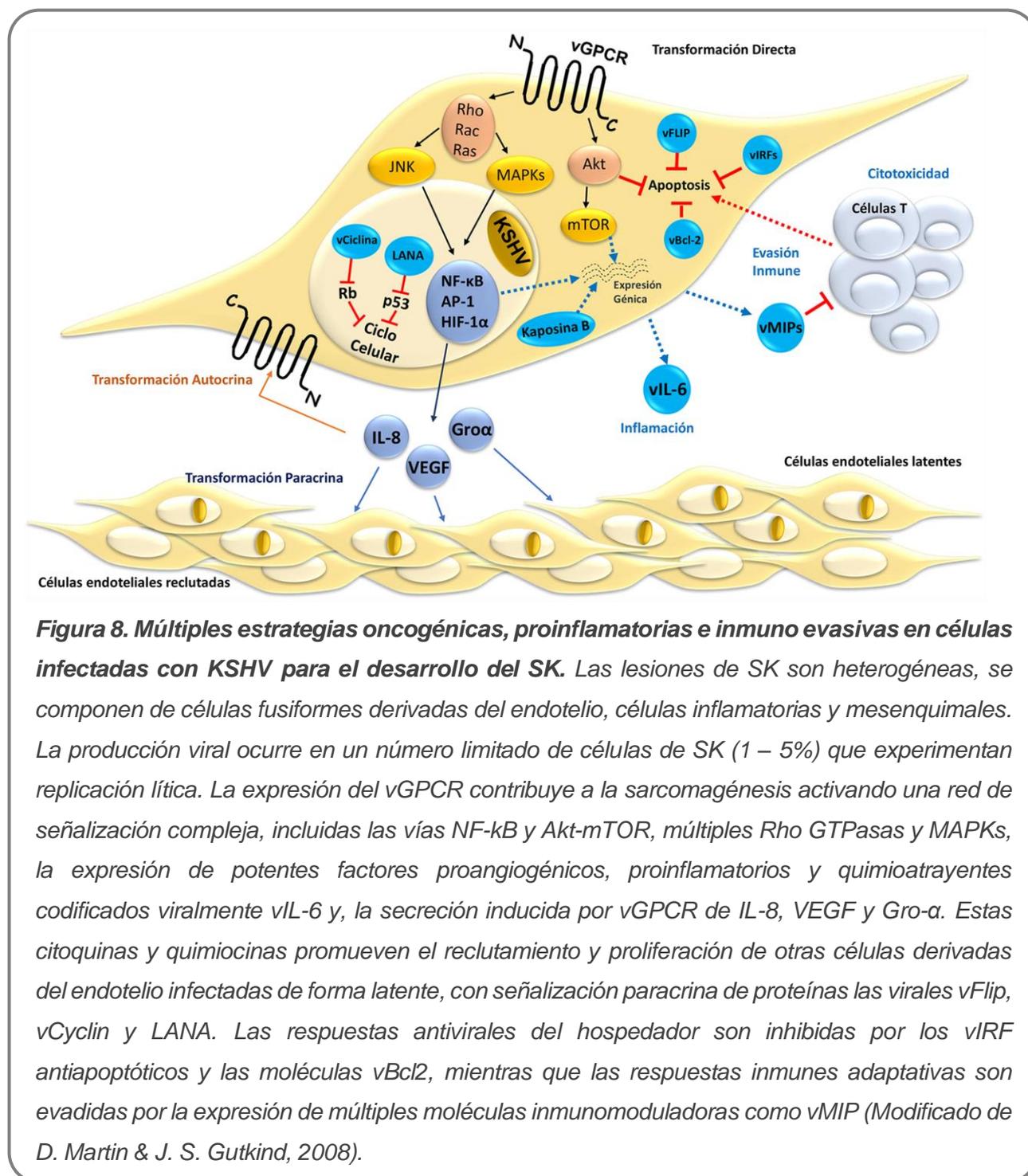
ciclo celular, mejoran la supervivencia y la proliferación de células infectadas. Pero necesitan ser potenciadas por factores de crecimiento del huésped y del virus, y

también por citocinas suministradas por las células infectadas. Genes líticos como vGPCR, K1, K15, vIL-6 y vCCL, presentes en las lesiones del SK, inducen factores paracrinos y angiogénicos esenciales para la progresión tumoral como VEGF, ANGPT2, GRO $\alpha$ , IL-6 y PDGF (Cavallin et al., 2018; Mesri et al., 2010; Wen and Damania, 2010). Dentro de las proteínas líticas, solo el vGPCR ha demostrado ser un potente oncogén angiogénico capaz de inducir lesiones angioproliferativas tipo SK en varios modelos de ratones transgénicos (Montaner et al., 2006, 2003). El vGPCR, es un receptor acoplado a la proteína G (GPCR) y codificado por el ORF74 homólogo al receptor de Gro $\alpha$  (CXCR1) e IL-8 (CXCR2). Se encuentra constitutivamente activo por una mutación en el segundo loop intracitoplasmático, altamente conservado en los GPCRs y es más promiscuo que sus homólogos celulares (Martin and Gutkind, 2009). El vGPCR activa la secreción de VEGF, IL-6 and PDGF que junto con la citoquina vIL-6 son factores de crecimiento autocrinos que pueden inducir la proliferación latente de modo paracrino (Mesri and Cesarman, 2014; Montaner et al., 2006). Dentro de los receptores tirosina quinasa, la activación de PDGFRA es predominante como conductor oncogénico en células infectadas con KSHV (Cavallin et al., 2018; Naipauer et al., 2019b, 2019a). La transformación angiogénica y paracrina del vGPCR a nivel molecular implica la activación de múltiples quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y pequeñas GTPasas de la familia Rho, cuyas actividades desembocan en el núcleo con el fin de controlar factores de transcripción como HIF-1 $\alpha$ , AP-1 y NF-kB promoviendo la expresión y secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-8/CXCL8 y MIP-1/CCL3 (**Figura 8**). La vía supresora tumoral Hippo media la actividad oncogénica del KSHV mediante la inhibición de las oncoproteínas YAZ/TAZ, su activación es promovida por vGPCR pero su detrimento es capaz de bloquear los efectos proliferativos del receptor (G. Liu et al., 2014). Las

células tumorales dependen de la secreción persistente y de la supervivencia de las células que expresan vGPCR (Martin and Gutkind, 2009; Montaner et al., 2006).

El SK es capaz de responder a varias hormonas esteroideas diferentes. En el año 2000, Masood y colaboradores reportaron que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibe el crecimiento de células de SK humano y reduce la producción de factores de crecimiento autocrinos como IL-6 e IL-8 de una manera dependiente de la dosis. A su vez, confirmaron la actividad antitumoral de un análogo de VDR en xenoinjerto tumoral de SK y en pacientes con SK luego de la aplicación tópica (Masood et al., 2000). Por lo que  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y sus análogos pueden ser candidatos como quimioterapéuticos. Asimismo, existe evidencia que demuestra la expresión del vGPCR solo en una minoría de las células que componen la masa tumoral, y aun así la inhibición farmacológica del receptor *in vivo* aumenta la apoptosis en células que expresan genes latentes, manifestándose una regresión del tumor (Montaner et al., 2006). Así, el vGPCR desempeña un papel clave en la progresión del sarcoma de Kaposi, por lo que el desarrollo de terapias moleculares dirigidas específicamente al receptor podría formar parte del tratamiento. El efecto terapéutico potencial del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ha sido explorado en nuestro laboratorio. Se demostró que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o el análogo TX 527 disminuyen la proliferación de células vGPCR tanto *in vitro* como *in vivo* por medio de un mecanismo que depende de la expresión del VDR (González Pardo et al., 2010). Hasta el momento se ha reportado que el efecto proliferativo se debe al potencial antiinflamatorio por la regulación negativa de la vía NF- $\kappa$ B (González Pardo et al., 2013, 2012b) y, por la inducción de la apoptosis en forma similar a la inhibición farmacológica de la vía NF- $\kappa$ B por el inhibidor del proteasoma Bortezomib (González Pardo et al., 2014; Suares et al., 2015). Asimismo, el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527

desencadenan la autofagia por inactivación del eje PI3K/Akt/mTOR (Suarez et al., 2019a).



# HIPOTESIS Y OBJETIVOS

## Hipótesis

Se postula que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibe la proliferación y desencadena la apoptosis en el modelo celular de sarcoma de Kaposi a través de un mecanismo anti-angiogénico y antiinflamatorio. Dentro de este mecanismo, el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  modula negativamente los factores pro-angiogénicos HIF-1 $\alpha$ , VEGF, la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. A su vez, la inhibición de la de COX-2 y de los receptores de prostaglandinas por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  suprime la acción de PGE2. Asimismo, un aumento en el estrés oxidativo contribuye a la inducción de la apoptosis en las células vGPCR. Los efectos desencadenados por el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  son dependientes del VDR.

## Objetivo general

Investigar el mecanismo molecular de acción de agonistas del VDR, como el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , en la regulación de la angiogénesis, inflamación y estrés oxidativo en células endoteliales transformadas por el vGPCR, modelo celular murino de sarcoma de Kaposi.

## Objetivos específicos

- ✓ Estudiar si el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ejerce sus efectos anti-neoplásicos a través de un mecanismo molecular anti-angiogénico regulando la expresión de VEGF, HIF-1 $\alpha$  y componentes del complejo AP-1.
- ✓ Explorar si la vía canónica Wnt/ $\beta$ -catenina que se encuentra activa por el vGPCR, es modulada por el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .
- ✓ Evaluar si el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  regula la expresión y actividad de COX-2 y receptores de prostaglandinas como parte del mecanismo de acción antiinflamatorio.
- ✓ Investigar el nivel de estrés oxidativo y los efectos del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en su regulación y contribución al efecto antineoplásico.

- ✓ Valorar la participación del VDR en la regulación de las vías reguladas por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .
- ✓ Validar el efecto del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en un modelo de cultivo tridimensional, a partir de las células que expresan el vGPCR que represente más la arquitectura del tumor *in vivo*.

# MATERIALES Y MÉTODOS

# 1- MATERIALES

## Reactivos

PRODUCTO	MARCA/PROVEEDOR (Nro. de catálogo)
$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (#D1530)
TX 527 [19-nor-14,20-bisepi-23-yne $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ]	Sintetizado por M. Vandewalle y P. De Clercq, Universidad de Ghent, Ghent, Bélgica, proporcionado por Thérámex, Mónaco
Act-D (Actinomycin-D)	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA (A9415)
Celecoxib	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
NAC (N-acetil-L-cisteína)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (A7250)
Sulfato de estreptomicina Penicilina G sódica Nistatina	Droguería Saporiti S.A.C.I.F.I.A, Buenos Aires, AR
SFB (Suero Fetal Bovino)	Natocor, Argentina (# SFBE)
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma Aldrich (#A9647), St. Louis, MO, USA
G418	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Puromicina	Invivogen, San Diego, CA, USA
DMEM (alto contenido en glucosa y rojo fenol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (#D7777)
Lipidure Coatplates	AMSBIO, Orlando, USA
High pure RNA	Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA (cat# 11828665001)
High Capacity cDNA reverse Transcription kit	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA
Power SYBR Green PCR Master Mix	
Primers vGPCR	Eurogentec, Serain, Bélgica
Primers (c-Fos, JunB, VEGF, HIF-1 $\alpha$ , EGR-1, Dkk-1, c- myc, Mmp-9, Ciclina D1, $\beta$ -catenina, COX-2, EP1, EP2, EP3, EP4, VDR y GAPDH)	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Membranas Immobilion P (PVDF: polivinil-difluoruro)	
Films Kodak X-OMAT	General Electric (UK) (28906836)

Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	General Electric, Oklahoma, USA
TO-PRO	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Anticuerpo Policlonal de conejo conjugado a Cy2	Jackson Immuno Research lab., West Grove, PA, USA (#111,225,144)
Anticuerpo Monoclonal de rata anti-VDR	Affinity Bioreagents, Golden, CO, USA
Proteína A/G agarosa	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa anti-especie: Conejo, Ratón y Rata	
Anticuerpo Monoclonal de ratón anti-COX-2 anti-Dkk-1 anti-tubulina anti-VE-cadherina	
Anticuerpo Policlonal de ratón anti-VDR	
Anticuerpos anti- $\alpha$ MEK, anti-Lamin B and anti- $\alpha$ Q11	
Anticuerpo Monoclonal de ratón anti- $\beta$ -catenina anti-HIF-1 $\alpha$	
Anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa anti-conejo	
COX-2 Activity Assay kit	Cayman Chemical Company, Michigan, USA (Cayman N° 760151)
CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Madison, USA
Perlas glutatión-Sefarosa	Aquiridas por colaboración con el Dr. John white, McGill University, Montreal, Quebec, CA.
Isopropilo $\beta$ -D-tiogalactopiranosido	Merck (I6758)
Lisozyma	ThermoFisher, Rockford, IL, USA (89833)
H2-DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)	Molecular Probes™, Invitrogen, Thermo Scientific, USA (D399)

## 2- MODELOS EXPERIMENTALES

### Líneas celulares

**SVEC:** Línea celular murina de células endoteliales inmortalizada por la expresión del antígeno T grande del SV40 o *simian virus 40* (SVEC), con el vector (pCEFL) vacío (González Pardo et al., 2013, 2010; Montaner et al., 2003) **Figura 2.1.**

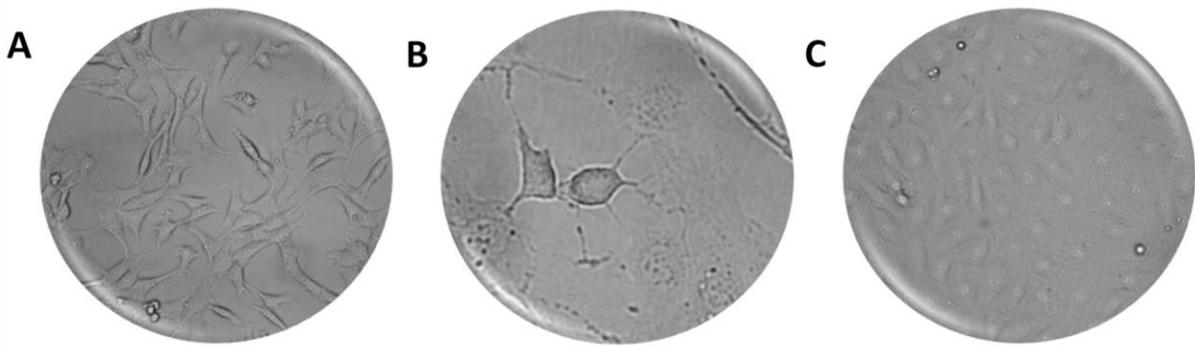
**vGPCR:** Línea celular SVEC transformada por la expresión del receptor viral acoplado a proteína G (vGPCR), mediante la transfección del vector pCEFL-vGPCR que codifica para el receptor viral *full-length*. La sobreexpresión estable del vGPCR desencadena la proliferación de células endoteliales e induce la angiogénesis en ratones inmunosuprimidos o “*nude mice*”, generando lesiones angio-proliferativas similares a las que ocurren en el sarcoma de Kaposi humano (Martin and Gutkind, 2009; Montaner et al., 2003), lo que constituye un modelo experimental murino del sarcoma de Kaposi, **Figura 2.1**.

Ambos tipos celulares se adquirieron por colaboración con el Dr. J. Silvio Gutkind (UCSD, California, USA).

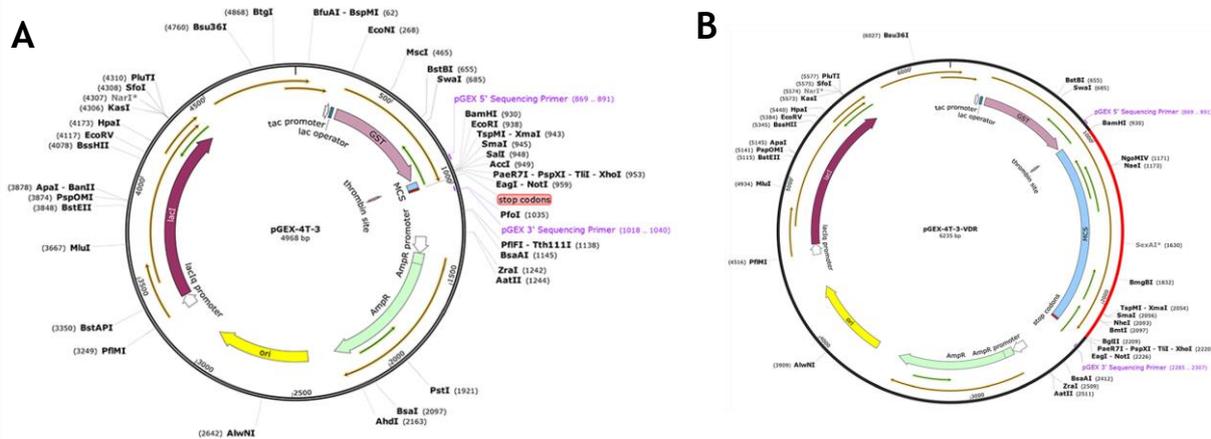
**vGPCR-shctrl y vGPCR-shVDR:** En la línea vGPCR-shVDR previamente generada (González Pardo et al., 2010; Soares et al., 2019b) el VDR fue silenciado a partir de la traducción de partículas lentivirales conteniendo un segmento de ARN de interferencia dirigido contra el VDR de ratón (shVDR), o bien con un segmento de ARN control (shctrl). Ambas líneas celulares se utilizaron para estudiar la participación del VDR.

## **Cepa bacteriana**

**BL21(DE3):** La cepa bacteriana BL21(DE3) *E. coli* (C2527, New England, BioLabs) transformada con los constructos o vectores plasmídicos PGEX4T3-GST o PGEX4T3-GST-VDR (**Figura 2.2**) fue utilizada para la obtención de las proteínas GST o GST-VDR respectivamente para ensayos *GST-Pull-down*. El sistema de inducción por IPTG (Isopropilo-beta-D-tiogalactósido) permite la expresión de las proteínas de fusión GST o GST-VDR. Estas cepas bacterianas se adquirieron por trabajos en colaboración con el Dr. John H. White (McGill University, Montreal, Quebec, Canadá).



**Figura 2.1. Modelo Experimental en Micrografías.** Línea celular endotelial murina (*Simian virus 40*-, *large T-antigen-immortalized* –*SVEC*) (A). Línea celular endotelial murina que expresa el receptor viral acoplado a proteína G (*vGPCR*) de forma estable. Presenta una morfología estrellada característica (B), que se pierde al alcanzar la confluencia en la placa de cultivo adoptando una forma redondeada y combada (C).



**Figura 2.2. Mapa de los vectores plasmídicos.** Vectores bacterianos que expresan las proteínas de fusión GST (*PGEX4T3-GST*) (A) o GST-VDR (*PGEX4T3-GST-VDR*) (B).

### 3- METODOS

#### 1- Cultivo celular

Las líneas celulares se cultivaron en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con rojo fenol, en presencia de 0,5% de antibiótico (0,5 g% de Estreptomicina; 0,2 g% Penicilina) y 0,5% de antimicótico (0,2 g% Nistatina) en un

incubador metabólico a 37°C bajo una atmósfera húmeda de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se suplementó con suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (30 min, 56°C). Para células SVEC se utilizó un 10% de SFB y para vGPCR un 5% de SFB. La disminución en el porcentaje de suero adicionado al medio fue una condición restrictiva de crecimiento para inducir una mayor expresión del receptor viral en las células vGPCR. Para mantener la expresión constitutiva del vGPCR en la línea se empleó el antibiótico de selección G418 (500 µg/ml). Para las líneas vGPCR que cuentan con expresión suprimida del VDR (-shVDR) o su control (-shctrl), además se empleó puromicina (2 µg/ml). El monitoreo de la expresión del vGPCR se realizó periódicamente por qRT-PCR y la expresión del VDR por Western blot.

### **Condiciones para el cultivo celular en monocapa**

Los cultivos se mantuvieron en medio fresco, se subcultivaron cada 48-72 horas y se descartaron luego del pasaje 10 minimizando así su agotamiento. Las células subconfluentes se sincronizaron mediante deprivación de suero 24 horas previas al tratamiento. Todos los experimentos se realizaron de manera independiente en diferentes pasajes y se permitió el crecimiento celular hasta un 70-80% de confluencia (120.000 células/cm<sup>2</sup>) para los mismos.

### **Cultivo de esferoides multicelulares**

El desarrollo de esferoides a partir de células vGPCR se realizó en base a nuestro reporte previo (Suarez et al., 2019b) por dos métodos en función de la técnica posterior a emplear:

**Para analizar la expresión de ARNm por qRT-PCR:** Se sembraron 2.500 células por pocillo en placas de 96 (Lipidure Coatplates, AMSBIO, Orlando, USA), 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 testear niveles proteicos por Western blot:** Se sembraron 12.000 células por pocillo en placas de 24 sobre agar y luego se agregó el medio de cultivo correspondiente. Previamente se acondicionaron placas con una base de agar en medio de cultivo DMEM (Suarez et al., 2019b). 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.

## 2- Tratamientos

### 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ o TX 527

Los agonistas del VDR, 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  o TX 527, se prepararon a partir de la droga sólida solubilizados en etanol. Las soluciones se protegieron de la luz, gasearon con N $_2$  luego de su uso para evitar la oxidación de los compuestos y conservaron a -20 °C en viales de vidrio color caramelo. La concentración de la solución madre (aproximadamente 10 $^{-3}$  M) se realizó por la técnica analítica de espectrofotometría UV-Visible, dado que el sistema triénico conjugado del 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  o su análogo, le confiere la característica de absorción de luz UV. Mediante el patrón de absorción en el rango de luz UV de la hormona preparada en un espectrofotómetro (Beckman DU530) se determinó su concentración. El cociente entre la absorbancia a  $\lambda$ : 265 nm (pico máximo) y el Coeficiente de Extinción Molar ( $\epsilon$ ) de la vitamina D (19.000 M $^{-1}$  cm $^{-1}$ ) permitió calcular la concentración. Alícuotas de este stock permitieron generar una solución de trabajo (aproximadamente 10 $^{-5}$  M). A su vez se calculó el factor de integridad mediante el cociente entre los picos de máxima ( $\lambda$ : 265 nm) y mínima ( $\lambda$ : 228 nm) absorción. Si el resultado es superior a 1,68, el anillo beta de este secoesteroide está intacto, y puede utilizarse, siempre en oscuridad. Los tratamientos se realizaron con DMEM 2% de SFB, un porcentaje menor al de siembra, dado que tiempos prolongados de incubación en ausencia de suero desencadenan la apoptosis

en estas células lo que permite valorar el efecto de los agonistas. Previo a los tratamientos, se efectuó un pre-tratamiento con los agonistas en el medio sin SFB durante 1 hora. Para estudiar el efecto de los agonistas se realizaron ensayos dependientes de la concentración (0,1-100 nM) y del tiempo (0,3-72 h).

### **Inhibidores Farmacológicos**

Se utilizaron los inhibidores farmacológicos Celecoxib y Actinomicina-D. Celecoxib es un inhibidor no competitivo altamente selectivo de COX-2 y, la Actinomicina-D bloquea la transcripción mediante la formación de un complejo estable con el ADN que interfiere en la síntesis de ARNm. La concentración empleada se determinó en base a estudios previos. Se agregaron 15 minutos previos a los períodos de pre-tratamiento y tratamiento cuando se administraron en combinación con el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

### **3- RT-PCR Cuantitativa**

La expresión de distintos genes se evaluó por PCR en tiempo real cuantitativa o qRT-PCR. El molde de reacción empleado fue ADN complementario (ADNc) generado a partir de la retrotranscripción del ARN de las muestras.

#### **Extracción del ARN total**

**Extracción:** El ARN total se obtuvo empleando el kit comercial *High Pure RNA isolation* de Roche basado en la extracción por columnas. Finalizado el tratamiento, siguiendo las instrucciones del fabricante, el medio de cultivo se extrajo por aspiración y luego de los lavados con PBS 1X estéril, las células se incubaron con buffer lisis. El lisado así obtenido se colocó en columnas que poseen un filtro capaz de unir y retener el ARN. Se realizó una incubación por 15 minutos con ADNasa. El ARN se purificó luego de varios lavados y finalmente, se eluyó de las columnas. El ARN obtenido se guardó a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

**Cuantificación:** El ARN obtenido se analizó espectrofotométricamente. La cantidad se determinó en base a la relación donde una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg/ml de ARN. La pureza se chequeó mediante la relación entre absorbancias 260/280, donde las proteínas absorben a 280 nm, cociente que se mantuvo entre 1,8-2, considerándose que el ARN obtenido presento baja contaminación proteica.

### **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 retro transcripción se realizó en un termociclador *Biometra UNO-Termoblock*. La reacción se desarrolló contemplando los siguientes pasos:

10 minutos a 25°C

120 minutos a 37°C

5 minutos a 85°C

30 minutos a 4°C

El 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 *ABI 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems)*. Las reacciones se desarrollaron con una dilución 1/10 del ADNc, empleando el reactivo *Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)* según el protocolo proporcionado por el fabricante. En todos los casos, al finalizar los ciclos de PCR se realizaron curvas de disociación (*curvas de melting*) para confirmar la especificidad de la amplificación. Los oligonucleótidos de origen

murino (*primers*) fueron sintetizados en escala de 25 nmoles. Las secuencias empleadas fueron:

Primers	Orientación	Secuencias 5'-3'
GAPDH	<i>fwd</i>	AAGGTGAAGGTCGGAGTC
	<i>rev</i>	GAAGATGGTGATGGGATTTTC
JunB	<i>fwd</i>	TTGCGGACGGTTTTGTCA
	<i>rev</i>	CGTCACGTGGTTCATCTTGTG
c-Fos	<i>fwd</i>	CACTCCAAGCGGAGACAGAT
	<i>rev</i>	TGGGCTGCCAAAATAAACTC
HIF-1 $\alpha$	<i>fwd</i>	CGACACCATCATCTCTCTGG
	<i>rev</i>	AAAGGAGACATTGCCAGGTT
VEGF	<i>fwd</i>	ATGAACTTTCTGCTCTCTGGGTG
	<i>rev</i>	GACTTCTGCTCTCCTTCTGTCGTG
vGPCR	<i>fwd</i>	TGGTTCCCCTGATATACTCCTG
	<i>rev</i>	GGACATGAAAGACTGCCTGAG
EGR-1	<i>fwd</i>	GAGCGAACAACCCTATGAGC
	<i>rev</i>	AGGCCACTGACTAGGCTGAA
$\beta$ -catenina ( <i>Ctnnb1</i> )	<i>fwd</i>	ACAAGAAGCGGCTTTTCAGTC
	<i>rev</i>	CTGCAGTCTCATTCCAAGCC
Dkk-1	<i>fwd</i>	TCTCTTTTCCTGACCTTTGCC
	<i>rev</i>	TGAGTTCAAGGTGGCACTG
c-myc	<i>fwd</i>	GCCCAGTGAGGATATCTGGA
	<i>rev</i>	ATCGCAGATGAAGCTCTGGT
Mmp-9	<i>fwd</i>	ACGACATAGACGGCATCCAGTATC
	<i>rev</i>	AGGTATAGTGGGACACATAGTGGG
Ciclina D1 ( <i>Cnnd1</i> )	<i>fwd</i>	TCCCAGACGTTCAGAACC
	<i>rev</i>	AGGGCATCTGTAAATACT
COX-2	<i>fwd</i>	TAGCAGATGACTGCCCAACT
	<i>rev</i>	CAGGGATGAACTCTCTCCGT
EP1 ( <i>Ptgdr1</i> )	<i>fwd</i>	CTAACCAAGAGTGCCTGGGA
	<i>rev</i>	GCTTCTGGGCACATTCAGAG
EP2	<i>fwd</i>	CGATGCTCCTGCTGCTTATC

( <i>Ptgdr2</i> )	<i>rev</i>	TGCATGCCAATGAGGTTGAG
EP3 ( <i>Ptgdr3</i> )	<i>fwd</i>	GGGATCATGTGTGTGCTGTC
	<i>rev</i>	GCATTGCTCAACCGACATCT
EP4 ( <i>Ptgdr4</i> )	<i>fwd</i>	TCTCTGGTGGTGCTCATCTG
	<i>rev</i>	GTCTTTCACCACGTTTGGCT

**Cuantificación relativa:** Se utilizó el Método del CT Comparativo ( $\Delta\Delta CT$ ), que establece lo siguiente:

$$\text{Expresión de un gen relativa al calibrador} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Donde,  $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{experimental}} - \Delta CT_{\text{control}}$

Cada  $\Delta CT$  es el resultado de la diferencia entre el CT del gen de interés y el CT del gen de referencia, para las condiciones control y experimental. Así se determinó la expresión de los genes de interés mediante la comparación de los datos obtenidos con un calibrador (condición control), y se normalizó por comparación con un gen de referencia o de expresión constante durante las condiciones experimentales. En este caso se utilizó el gen de la enzima gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Siempre se realizó el control negativo NTC (*no template control*) por duplicado. Los valores se expresan como  $2^{-\Delta\Delta CT}$  en unidades arbitrarias (Giulietti et al., 2001; Livak and Schmittgen, 2001).

#### 4- Procesamiento y Cuantificación de proteínas

Finalizado el tratamiento, se removió el medio de cultivo por aspiración. Luego de los lavados con PBS 1X, 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  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ; 1 mM  $\beta$ -glicerofosfato; 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; 1 mM PMSF; 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptina y aprotinina) en frío. Los lisados celulares se colectaron en tubos eppendorf e incubaron a  $4^\circ\text{C}$  durante 30 minutos seguido de agitación vigorosa en vórtex durante 30 segundos. Por

centrifugación a 14.000 g durante 10 minutos se eliminaron los restos celulares (*debris*). El contenido proteico del sobrenadante obtenido se cuantificó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Las determinaciones se realizaron utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como solución estándar. La absorbancia se midió a 595 nm.

## **5- Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Las proteínas de los lisados celulares se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida. En primer lugar, 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 se sembraron de 15-30 µg de proteína por calle y se separaron por electroforesis. El porcentaje de poliacrilamida/bisacrilamida de los geles varió según el peso molecular de las proteínas de interés (gel de stacking: 4%; gel de separación: 8-15%). Se emplearon marcadores coloreados de peso molecular de amplio rango (10-250 kDa) para evaluar la migración relativa de las bandas. 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).

## **6- Western blot**

### **Electrotransferencia**

Luego de la electroforesis, las proteínas se transfirieron eléctricamente desde los geles a membranas sintéticas de polifluoruro de vinilideno (PVDF). Estas membranas se activaron previamente 1 minuto en metanol puro. Posteriormente, se incubaron 10 minutos en buffer de transferencia Towbin al igual que los geles (0,25 M Tris pH 8,3; 0,192 M glicina; 20% metanol). La transferencia se realizó por aproximadamente 90 minutos a corriente constante con 125 mA por gel (Towbin et al., 1979).

### **Bloqueo de sitios inespecíficos**

Los sitios de la membrana libres de proteínas se bloquearon luego de la transferencia. Las membranas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con TBS-T (6,05 g Tris-HCl; 11,68 g NaCl; 0,01% Tween) conteniendo como agente bloqueante 5% de leche descremada en polvo. Las proteínas de la leche en polvo se unen a los sitios libres de proteínas en la membrana, evitando así el ruido de fondo por uniones inespecíficas.

### **Detección de proteínas**

Las membranas bloqueadas se incubaron con una dilución apropiada del anticuerpo primario en TBS-T con 2,5% de BSA a 4°C durante la noche. Luego, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T en agitación continua para eliminar el exceso de anticuerpo no unido. Seguidamente, éstas se incubaron con una dilución de anticuerpo secundario anti-especie (correspondiente con el anticuerpo primario) conjugado a peroxidasa (en TBS-T con 2,5% de leche en polvo) durante una hora en agitación suave. A continuación, las membranas se lavaron nuevamente para eliminar el exceso de anticuerpo no unido. Finalmente, la detección de las bandas proteicas inmunorreactivas se visualizó por quimioluminiscencia (ECL-Amersham) por exposición de las membranas a placas hipersensibles para la detección de quimioluminiscencia (*Amersham Hyperfilm-ECL*). Estas placas se digitalizaron y las bandas se cuantificaron utilizando el programa de análisis *ImageJ*. Los datos se volcaron en planillas de Excel para su posterior análisis.

### **Remoción de los anticuerpos**

Para reutilizar las membranas y detectar proteínas de similar peso molecular es necesario remover los anticuerpos previamente unidos. En consecuencia, las membranas de PVDF se lavaron con buffer desnaturalizante o buffer *stripping* (0,75%

g/v Tris-HCl pH 6,8; 0,02 % p/v SDS; 0,0035% v/v  $\beta$ -Mercaptoetanol) a 55°C por 30 minutos en agitación constante. Luego, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T durante 10 minutos y bloquearon nuevamente para la posterior incubación con los anticuerpos de interés.

## **7- Inmunocitoquímica**

Las células se sembraron sobre cubreobjetos en cajas de Petri de 35 mm. Concluido el tratamiento, se extrajo el medio de cultivo por aspiración. Las cajas se lavaron dos veces con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 2% suplementado con sacarosa al 5% por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de tres lavados con PBS 1X para retirar los restos de fijador, las células se permeabilizaron con 0,1% Tritón X-100 (Sigma-Aldrich®) en PBS 1X por 15 minutos a temperatura ambiente. Se bloquearon los sitios de ligado no específico con 5% de BSA en TBS-T por 30 minutos a temperatura ambiente. Se retiraron los cubreobjetos de las placas y se incubaron invertidos con una dilución 1/50 de anticuerpo anti- $\beta$ -catenina de conejo en 5% de BSA en PBS 1X toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados en agitación constante y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a fluoróforo (Cy2) diluido en PBS (1/200) por 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Luego de un lavado se adiciono el marcador nuclear TO-PRO a temperatura ambiente y transcurridos los 15 min de incubación se efectuaron cuatro lavados con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo. Finalmente, los preparados se montaron sobre portaobjetos a los cuales se les adiciono 10  $\mu$ l de glicerol 95% diluido en PBS1 X para su posterior visualización en un microscopio confocal.

## **8- Microscopía de fluorescencia confocal**

Se utilizó un microscopio invertido confocal Leica DM IRB2 con un módulo espectral SP2 equipado con láser Ar (458, 476, 488 y 514 nm) y láser HeNe (633 nm).

La observación se realizó con un objetivo de inmersión en agua 63x 1.2 NA. El *software* adosado al microscopio permitió la obtención de imágenes que luego fueron exportadas al *Adobe Photoshop* para su procesamiento digital.

## 9- Fraccionamiento subcelular

Concluido el tratamiento, el medio de cultivo se retiró por aspiración y se realizaron dos lavados con PBS 1X frío. Con el mismo buffer las células se colectaron con *scraper* en tubos eppendorf y se realizó una centrifugación por 10 minutos a 1.500 *g* para descartar el PBS 1X. El sedimento o *pellet* del lisado celular se le adicionó buffer TES (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA; 250 mM Sacarosa; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 20 µg/ml Leupeptina y Aprotinina) y se homogeneizó con jeringa 10 veces resuspendiendo el *pellet* durante la incubación en hielo por 30 minutos a 1 hora. Posteriormente, se realizó una centrifugación diferencial a 4°C (Centrífuga Sigma 3k30). Primero se descartó el *debris* con una centrifugación a 100 *g* por 5 minutos. Aumentando la velocidad y el tiempo a 1.500 *g* y 20 minutos se obtuvo la fracción nuclear (**FN**). El sobrenadante post nuclear (**SPN**) se centrifugó nuevamente a 1.400 *g* por 20 minutos. El *pellet* obtenido es la fracción mitocondrial (**FMit**) y el sobrenadante post mitocondrial (**SPMit**) se centrifugó a mayor velocidad y tiempo (100.000 *g* por 1 hora y 30 minutos) en una Ultracentrífuga (Beckman, Optima TLX. Rotores TLA 100.4), que permitió obtener la Fracción Microsomal (**FMic**). Los precipitados de **FN** y **FMic** se resuspendieron en buffer lisis (Detallado en Metodología, Punto 4) y se incubaron 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 con marcadores específicos: Lámina nuclear-β para **FN**, MEKα para **FC** y α-Q11 para **FMic**.

## 10- Co-Inmunoprecipitación

Luego de retirar el medio y realizar los lavados con PBS 1X, las células se colectaron con *scraper* en buffer 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 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 0,5% Nonidet P-40; 1 mM β-glicerofosfato; 20 µg/ml leupeptina y aprotinina). El lisado se resuspendió varias veces con micropipeta, posteriormente, se incubó en hielo por 30 minutos. Transcurrido el tiempo, el lisado se centrifugó a 14.000 g por 10 minutos a 4°C. Las proteínas del sobrenadante se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford, 1976). A continuación, 250 µg de proteínas totales se incubaron con 1 µl de anticuerpo específico para la proteína 1 que se quiere inmunoprecipitar. La incubación se efectuó durante cinco horas en agitación a 4°C. Luego se agregaron 25 µl de Proteína A/G plus agarosa y se incubó toda la noche. Al día siguiente, se continuó la agitación en frío por 1 hora y se lavó el inmunocomplejo con buffer Co-IP por tres centrifugaciones a 14.000 g durante 5 minutos. Finalmente, se agregó buffer muestra 6X. Las muestras luego se corrieron en geles de acrilamida y se realizó la inmunodetección por Western blot de la proteína 1, primariamente inmunoprecipitada como control, y de la proteína 2 que se quiere ver la asociación. Para confirmar la asociación, se realizó una Co-IP con anticuerpo inicialmente contra la proteína 2, y se procedió de la misma manera para identificar la proteína 1.

## **11- Ensayos de proliferación**

### **Conteo celular**

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (150.000 células por pocillo final) por triplicado por condición. Finalizado el tratamiento, las células se lavaron con PBS 1X frío, se colectaron por tripsinización y se contaron en cámara de Neubauer.

### **MTS**

Para el ensayo de viabilidad se empleó el kit *comercial CellTiter 96® Aqueous one solution* utilizado acorde a las instrucciones del fabricante. Las células vGPCR se sembraron en placas de 96 pocillos (16.000 células por pocillo final) por triplicado por condición. Finalizado el tratamiento, se extrajo el medio por aspiración y se adicionó un mix compuesto por DMEM 1% SFB sin rojo fenol y el reactivo MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Cuando se produjo el viraje de color por diferencia entre las muestras y el blanco (pocillo con el mix libre de células) se finalizó la reacción por el agregado de SDS al 10%. Este método colorimétrico permite la detección de células metabólicamente activas mediante la bio-reducción del MTS generando un producto soluble coloreado. La absorbancia fue detectada a 490 nm en un lector de placas (Biotek Synergy-HT) y es proporcional al número de células viables.

## **12- Ensayo de actividad COX-2**

La actividad de COX-2 se midió colorimétricamente mediante el kit *COX-2 Activity Assay kit* siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante. Brevemente, finalizado el tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  se colectaron las células con PBS1X. Luego de una centrifugación a 1.000 g por 10 minutos a 4°C, el *pellet* se homogeneizó mediante el agregado de buffer (0.1M Tris-HCl, pH 7.8) y posterior sonicación (1 ciclo de 15 seg.) en hielo. El sobrenadante obtenido mediante una segunda centrifugación a mayor velocidad (10.000 g por 15 min. a 4°C) se utilizó para la determinación. Primero se determinó el contenido proteico por el método de Bradford (M. M. Bradford, 1976) para estandarizar la señal detectada. Seguidamente se midió la actividad peroxidasa en un lector de placas (Biotek Synergy-HT), mediante el monitoreo de la aparición de TMPD (*N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine*), reactivo redox oxidado a 590 nm tras el inicio de la reacción por el agregado de ácido araquidónico.

En cada lectura se midió el estándar de COX-2 junto a las condiciones experimentales para verificar la estabilidad de los reactivos.

### **13- Cuantificación de VEGF en lisado de células vGPCR**

Se cuantificaron los niveles de VEGF de ratón en las proteínas de los lisados celulares mediante un kit de ELISA sándwich *DuoSet® ELISA Development System* siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante. Luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  se colectaron las células con PBS1X y se centrifugó a 1.000 g por 10 minutos a 4°C, el *pellet* se homogeneizó mediante el agregado de buffer (HEPES 50 mM, NaCl 140 mM, glicerol 10%, EDTA 1 mM y tritón 1%) y agitación con vórtex. Por medio de una segunda centrifugación a 10.000 g (15 min. a 4°C) se obtuvo el sobrenadante a utilizar en la determinación. La muestra se incubó con un anticuerpo de captura para VEGF, y luego de los lavados, con un anticuerpo de detección biotinilado. Se adicionó entonces streptavidina conjugada a peroxidasa que mediante la incubación con la solución sustrato ( $\text{H}_2\text{O}_2$  y TMB, 1:1) permitió medir la densidad óptica a 450 nm producto de la oxidación del sustrato cromogénico, luego de frenar la reacción con una solución ácida ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 2N). Para la cuantificación se realizó una curva de calibrado con distintas concentraciones del estándar de VEGF de ratón (pg/ml) proveniente del kit.

### **14- Análisis computacional de la interacción proteína-proteína**

La energía electrostática de interacción entre dos proteínas fue calculada resolviendo la ecuación lineal de Poisson–Boltzmann. Se utilizó el software *Adaptive Poisson-Boltzmann Solver* (APBS) (Jurrus et al., 2018) paquete de programas para modelar biomoléculas que permitió calcular la energía electrostática de cada estructura individual y del complejo formado por ambas proteínas. Luego se encontró

la energía de interacción electrostática calculando la diferencia entre el complejo y las estructuras individuales con la ecuación:

$$E_{\text{Interacción}} = E_{\text{Complejo}} - (E_{\text{Proteína1}} + E_{\text{Proteína2}})$$

Este procedimiento se realizó sobre las diversas orientaciones posibles que las proteínas podían adoptar entre sí. Para poder probar todas las configuraciones posibles se utilizó un programa de elaboración propia, capaz de generar todas las configuraciones necesarias girando las dos proteínas, una alrededor de la otra. Primero, la Proteína 1 se rotó alrededor de la Proteína 2 para que la Proteína 1 cubra todas las posiciones posibles a lo largo de una esfera imaginaria alrededor de la Proteína 2. A su vez, la Proteína 1 se rotó alrededor de su propio centro, de tal manera que se tomaron muestras de todas las orientaciones posibles. La distancia ( $r$ ) entre cada estructura final se estableció por igual y se calculó proyectando todas las coordenadas de las dos estructuras al eje definido por el centro de ambas estructuras. La distancia mínima entre las dos estructuras sobre este eje se estableció en el valor deseado de  $r = 10 \text{ \AA}$ . El programa fue escrito en el lenguaje *Python* y necesita la estructura de ambas proteínas en formato *.pqr*, que contiene la carga eléctrica y el radio de Van der Waals para cada átomo. Con ese objetivo, se extrajeron de la base de datos digital *PDBDataBank* (Berman et al., 2000) las estructuras en formato *.pdb* reportadas de dos especies diferentes, como Rata y Ratón (PDB IDs: 1RJK and 3QMO), mientras que las estructuras terciarias no declaradas (no resueltas o no publicadas) se modelaron con métodos de modelado por homología canalizando sus secuencias primarias a través del servidor *Swiss Model* (Benkert et al., 2011; Bertoni et al., 2017; Bienert et al., 2017; Guex et al., 2009; Waterhouse et al., 2018) (**Tabla 14.1**). Luego, se utilizó el *PDB2PQR* (Dolinsky et al., 2007) para convertir los archivos *.pdb* en *.pqr*. Finalmente, el usuario debe definir la distancia entre las

orientaciones finales  $r$  y el tamaño de los pasos angulares utilizados durante la rotación. En este caso, todos los pasos angulares se establecieron en  $45^\circ$  y un  $r = 10$  Å.

**Tabla 14.1:**

	<b>Rata</b>	<b>Ratón</b>
<b>VDR</b>	<b>1RJK</b>	<b>Modelado</b>
<b>COX-2</b>	Modelado	3QMO

## **15- Ensayo GST-Pull-down**

El ensayo se diseñó para detectar la interacción del VDR con COX-2 en base al trabajo de Salehi-Tabar y col. (Salehi-Tabar et al., 2019). Para ello, una de las dos proteínas (VDR) unida a glutatión-S-transferasa (GST) se incubó con el lisado celular de las células vGPCR conteniendo la proteína de interés (COX-2). Primero se resuspendió una colonia de las bacterias BL21(DE3) *E. coli* transformadas con los constructos PGEX4T3-GST o PGEX4T3-GST-VDR, en medio LB (Luria-Bertani) con 50 µg/ml de ampicilina (SIGMA A0166) y se incubaron a 37°C por 24 horas. Cuando la D.O. alcanzó valores de 0,4-0,8 a 600 nm se indujeron con 400 µM de IPTG (isopropilo β-D-tiogalactopiranosido) (An et al., 2010; Solomon et al., 2001) para expresar las proteínas de fusión GST o GST-VDR. Luego, el medio se centrifugó por 15 minutos las bacterias del sedimento o *pellet* se resuspendieron en buffer lisis (20 mM Tris-HCl pH 7.5; 100 mM NaCl; 0.5 mM EDTA; 0.5% NP-40; 3 µg/ml lisozima e inhibidores de proteasas). Seguidamente, el lisado bacteriano se sometió a agitación con vortéx por 15 segundos durante 10 minutos en hielo y posteriormente, a sonicación con 10 ciclos por 15 minutos como mínimo, finalmente una última centrifugación por 10 minutos a mayor velocidad permitió la obtención del

sobrenadante proteico, posteriormente se cuantifico por el método de Bradford (Bradford, 1976). Posteriormente, 100 µg de proteínas proveniente del lisado bacteriano que expresó las proteínas de fusión, GST o VDR-GST, se incubaron con la misma cantidad de perlas GSH (glutación-sefarosa) en rotación suave por 2 horas a temperatura ambiente para lograr su inmovilización. El producto de la incubación, se centrifugó nuevamente a menor velocidad (500 g) por 5 minutos. Seguidamente, las proteínas de fusión inmovilizadas en perlas (GSH-GST o GSH-GST-VDR) del *pellet*, se incubaron con la fracción soluble del lisado celular de vGPCR en rotación suave por 2 horas a temperatura ambiente. Mediante centrifugación e incorporación de buffer de elución (50 mM Tris pH8; 10mM glutación e inhibidores de proteasas) los complejos eluidos de las perlas se resolvieron por Western blot.

## **16- Determinación de los niveles oxidantes**

El nivel de estrés oxidativo en células vGPCR fue evaluado usando la sonda H2-DCF-DA (diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína o también denominada diclorofluoresceína diacetato) que se trata de una forma de fluoresceína reducida químicamente. Una vez que ingresa a la célula, el H2-DCF-DA no fluorescente pierde los grupos acetato por las estereasas intracelulares y se oxida por las especies reactivas de oxígeno (ROS) presentes, convirtiéndose en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) altamente fluorescente. Concluido el tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  se reemplazó el medio de cultivo por medio conteniendo 10 µM de la sonda H2-DCF-DA. Después una incubación de 30 minutos a 37°C, se retiró el medio y se realizaron tres enjuagues con PBS 1X. El lisado celular se obtuvo mediante homogenización con Nonidet P-40 1% y sonicación posterior por 2 ciclos de 15 segundos en hielo. Se midió la fluorescencia en los lisados obtenidos a una longitud de onda de excitación a 538 nm y de Emisión a 590 nm, en un fluorímetro 4800 SLM (SLM Instruments, Urbana,

IL). Para estandarizar la señal detectada se determinó el contenido proteico por el método de Bradford (Bradford, 1976).

## **17- Análisis estadístico**

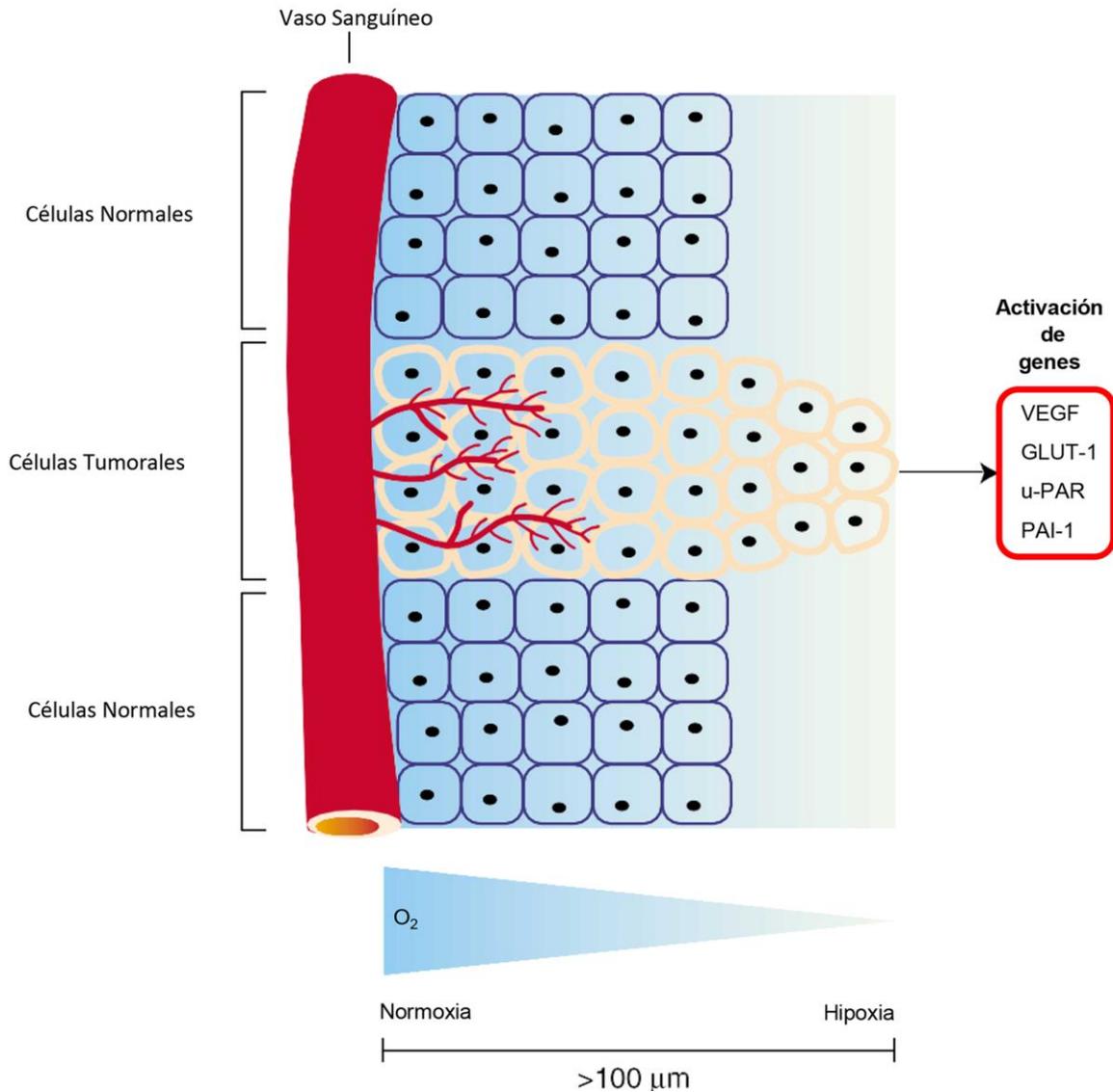
Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  desvío estándar (DE). La comparación de medias entre dos grupos de resultados se realizó por la prueba t de Student, a dos colas considerándose diferencias estadísticamente significativas con valores de  $p < 0,05$  (\*) y altamente significativas con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

# CAPÍTULO I

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE  
MOLÉCULAS PRO-ANGIOGÉNICAS POR  
 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

# Introducción

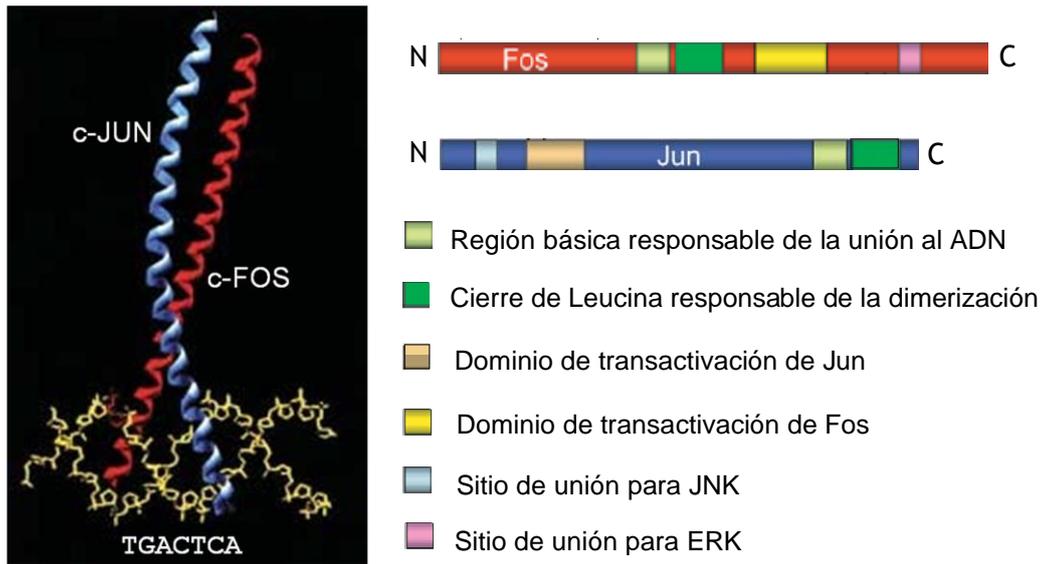
Todos los tejidos dependen del suministro de oxígeno para el funcionamiento normal de sus funciones metabólicas y fisiológicas, pero cuando este es insuficiente durante la isquemia u otras condiciones vasculares, aparecen regiones con baja concentración de oxígeno o regiones de hipoxia. Para restablecer la homeostasis de oxígeno y satisfacer las demandas metabólicas, las células activan un gran abanico de genes como los implicados en el aumento del transporte de oxígeno (eritropoyetina), la absorción de glucosa (GLUT-1), la glicolisis (Lactato deshidrogenasa A), regulación del pH (CA9 y CA12) y angiogénesis (VEGF). En los tumores, la rápida expansión de las células en proliferación usualmente supera al suministro vascular, lo que resulta en regiones de hipoxia tumoral que promueven la iniciación de mecanismos de supervivencia y aumenta la proliferación y migración celular (Brown and Wilson, 2004; Carroll and Ashcroft, 2005; Harris, 2002) (**Figura I.1**). En el modelo celular murino del sarcoma de Kaposi utilizado, el vGPCR induce la expresión y secreción de citoquinas críticas para el desarrollo tumoral generando una transformación a nivel paracrino. Para esto activa y controla factores de transcripción inducidos por hipoxia como el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB), la proteína activadora 1 (AP-1) y el factor inducible por hipoxia (HIF) (Montaner et al., 2004) promoviendo así la expresión de moléculas pro-angiogénicas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el más potente activador de la formación de nuevos vasos (Folkman, 1995).



**Figura I.1. Hipoxia tumoral.** Cuando un tumor pequeño y localizado supera su suministro vascular (distancias  $> 100 \mu\text{m}$ ), la hipoxia tumoral surge en regiones con suministro de oxígeno deficiente. En consecuencia, las células hipóxicas activan genes diana implicados en la angiogénesis [(VEGF), el transporte de glucosa [(GLUT-1) y la migración celular [receptor activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (u-PAR) y plasminógeno inhibidor activador 1 (PAI-1)]. El aumento del suministro vascular al tumor a través de la inducción de la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) estimula el crecimiento del tumor y facilita la metástasis a sitios distantes (Modificado de V. A. Carroll & M. Ashcroft, 2005).

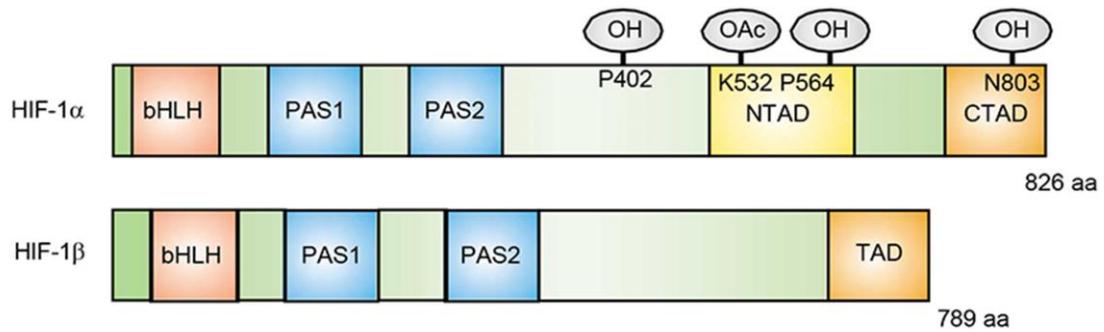
AP-1 se identificó originariamente en extractos celulares de HeLa donde reconocía un segmento en la región potenciadora de SV40 y en la metalotioneína IIA humana (Lee et al., 1987). AP-1 consiste de variados dímeros conformados por proteínas de las familias Jun, Fos, ATF y MAF (Raivich and Behrens, 2006). Estos son reguladores tempranos de señales de crecimiento y diferenciación celular. Primero se demostró a c-Jun como componente del factor de transcripción AP-1 y luego, c-Fos. Así se encontraron varias proteínas relacionadas a Jun y Fos componentes de AP-1 (Foletta et al., 1998) que junto con c-myc, constituyen los primeros genes identificados de respuesta temprana homólogos de oncogenes retrovirales. Pueden formar varias combinaciones de homodímeros y heterodímeros, las cuales determinan los genes que van a ser regulados ya que reconocen diferentes secuencias de promotores (Raivich and Behrens, 2006), por lo que de acuerdo al patrón de dimerización son los efectos en la proliferación, diferenciación, apoptosis y transformación oncogénica (Hess et al., 2004; Kovary and Bravo, 1991). La base dimérica de AP-1 contiene un cierre de leucina (bZIP), las proteínas dimerizan con un motivo de leucina y contienen un dominio de unión al ADN (**Figura I.2**).

HIF-1 $\alpha$  controla el suministro de oxígeno (vía angiogénesis) y la adaptación metabólica a la hipoxia (vía glicolisis). Primero fue descrito como factor de unión al ADN inducido por hipoxia que media la activación transcripcional del amplificador o *enhancer* del gen de la eritropoyetina humana (Semenza and Wang, 1992), posteriormente se descubrió que interviene en la inducción hipóxica de genes implicados en la glucólisis (Wang and Semenza, 1993). Es un heterodímero que reconoce el elemento de respuesta a la hipoxia (HRE), secuencia consenso de ADN conservada ubicada en el promotor de los genes diana. Las subunidades HIF  $\alpha$  y  $\beta$  contienen un dominio básico-hélice-bucle-hélice (bHLH), dos dominios PER-ARNT-



**Figura I.2. Heterodímero Jun-Fos.** Los dominios bZIP de Jun y Fos forman una estructura  $\alpha$ -hélice con forma de X, que se une a la secuencia palindrómica de AP-1 (TGAGTCA). A la izquierda se muestran los dominios bZIP de Jun en color azul, de Fos en rojo y la secuencia de ADN en amarillo. A la derecha, se encuentra el esquema de los dominios bZIP, de transactivación y de unión a quinasas de Jun y Fos. JNK fosforila dominios serina de Jun y ERK fosforila dominios serina y treonina de Fos (Modificado de Jochen Hess, et al, 2004).

SIM (PAS) en sus regiones N-terminales responsables de la unión del ADN y de la dimerización. La subunidad  $\alpha$  contiene dos dominios de activación transcripcionales, N-terminal (NTAD) y C-terminal (CTAD), unidos por un dominio inhibitorio. El NTAD se superpone el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD), su modificación postraduccional regula la estabilidad  $\alpha$ , ya que mientras la subunidad  $\beta$  es constitutiva la subunidad  $\alpha$  es regulada por la disponibilidad de oxígeno. La subunidad  $\beta$  contiene un dominio de transactivación en su C-terminal (TAD) que no parece ser necesario para la actividad HIF-1 (**Figura I.3**) (Carroll and Ashcroft, 2005; Jiang et al., 1996; Wang and Semenza, 1993).



**Figura I.3. HIF-1  $\alpha$  y  $\beta$ .** Contienen un dominio básico-hélice-bucle-hélice (bHLH) y dos dominios PER-ARNT-SIM (PAS1 y PAS2) en sus regiones N-terminales. Se indican las posiciones de las hidroxilaciones (OH) y acetilaciones (OAc) postraduccionales. La hidroxilación en prolina (P402 y P564) y la acetilación en lisina (K532) dentro del dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD) (residuos 401–603) y cerca del dominio de transactivación N-terminal (NTAD) compone el sitio de reconocimiento para pVHL (producto del gen supresor tumoral von Hippel–Lindau), responsable de la degradación de la subunidad. La hidroxilación en N803 en el dominio de transactivación del C-terminal (CTAD) de  $\alpha$  inhibe el reclutamiento de activadores para su actividad transcripcional.  $\beta$  contiene uno dominio de transactivación en el C-terminal (TAD) (Modificado de V. A. Carroll & M. Ashcroft, 2005).

En condiciones de normoxia, la subunidad  $\alpha$  es rápidamente degradada, pero los niveles se estabilizan a bajas concentraciones de oxígeno. Esta regulación negativa ocurre por hidroxilación en los residuos prolina (Pro402 y Pro564) dentro del dominio dependiente de oxígeno (ODD). La subunidad  $\alpha$  hidroxilada es reconocida por el producto del gen supresor tumoral von Hippel–Lindau (pVHL) que junto con un polímero de ubiquitina ligasa, marcan a HIF-1 $\alpha$  para su posterior degradación en el proteasoma (**Figura I.4**). En condiciones de hipoxia, el oxígeno se convierte en un factor limitante para la hidroxilación en prolina lo que disminuye la ubiquitinación y la consecuente degradación (Epstein et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Semenza, 2002), por lo que HIF-1 $\alpha$  se acumula y transloca al núcleo para dimerizar con HIF-1 $\beta$  y actuar como factor de transcripción, aumentando directamente la expresión de varios factores pro-angiogénicos incluyendo VEGF para dar comienzo a la formación de nuevo endotelio vascular (Fukuda et al., 2003; Giaccia et al., 2003; Rankin and Giaccia, 2008; Sakamoto et al., 2008). VEGF estimula la proliferación de células endoteliales y su migración, es un factor de supervivencia para vasos sanguíneos recién formados esencial durante el desarrollo embrionario (Mantell et al., 2000).



Los miembros de la familia VEGF son glicoproteínas diméricas secretadas de aproximadamente 40 kDa, en mamíferos la familia consiste de cinco miembros como VEGFA, B, C, D y el factor de crecimiento placentario (PLGF). VEGFA es la variante más estudiada, por *splicing* alternativo tiene diversas isoformas en el humano como VEGFA 121, VEGFA 145, VEGFA 165, VEGFA 189 y VEGFA 206. En el ratón, las isoformas son un residuo aminoacídico más cortas que las correspondientes isoformas en el humano y se denominan VEGF 120 y así en adelante (Olsson et al., 2006). VEGFA no solo está sobreexpresado en células cancerosas invasivas, sino también en lesiones premalignas (lesiones precursoras de cáncer de mama y de colon) donde los niveles de expresión aumentan en paralelo a la progresión tumoral (Brown et al., 1995; Dvorak, 2002; Wong et al., 1999). VEGFA actúa a través de dos receptores tirosina quinasa de alta afinidad, VEGFR-1 (flt-1) y VEGFR-2 (KDR/flk-1). VEGFR-1 es un regulador negativo de la angiogénesis. Si bien tiene mayor afinidad por VEGF que el VEGFR-2, su actividad tirosina quinasa es muy débil por lo que une a VEGF, pero no traduce su señal. VEGFR-2 en cambio, es un regulador positivo de la formación de nuevos vasos (Keifer et al., 2014). Existe un tercer receptor no quinasa denominado neuropilina (NRP-1) que si bien potencia la unión de VEGFA al receptor VEGFR-2, se expresa menos en células endoteliales que los receptores tirosina quinasa (Dvorak, 2002).

Los complejos diméricos AP-1 regulan una variedad de procesos celulares como crecimiento, diferenciación, supervivencia, muerte celular; y suelen ser activados en infecciones virales. El KSHV es capaz de activar el factor AP-1 mediante múltiples vías mediadas por MAPKs, causando un rápido aumento de expresión y secreción de IL-6, factor autocrino de crecimiento en células de sarcoma de Kaposi (Xie et al., 2005). Mediante la activación de AP-1, el KSHV estimula la angiogénesis mediante la

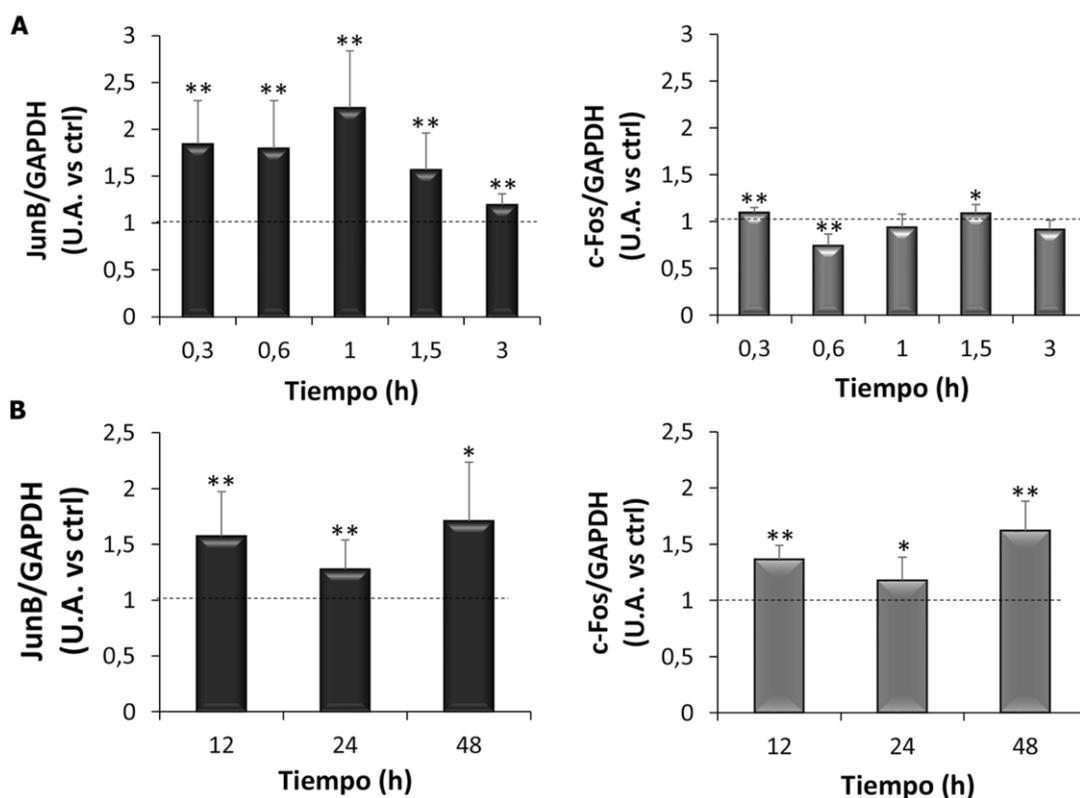
inducción de la angiopoyetina-1, factor angiogénico encargado del remodelado vascular y la formación de endotelio a partir de vasos preexistentes (Ye et al., 2007). Otros factores pro-angiogénicos como se mencionó anteriormente son HIF-1 $\alpha$  y VEGF. Este último tiene en su promotor un elemento de respuesta a HIF-1 $\alpha$  que induce su transcripción por estímulo del vGPCR del KSHV. Así aumentando la producción de VEGF, el receptor viral desencadena la angiogénesis necesaria para el desarrollo del SK (Sodhi et al., 2000). La expresión constitutiva de vGPCR en células HUVEC provoca la activación paracrina de la angiogénesis mediante la inducción de la secreción de VEGF (Bais et al., 2003). Dados estos antecedentes se investigó si en el modelo celular murino que expresa constitutivamente el vGPCR, existe una modulación de los factores pro-angiogénicos por 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  como parte del mecanismo anti-proliferativo.

# Resultados

## **Los componentes del factor de transcripción AP-1, JunB y c-Fos, son regulados por $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$**

Como se mencionó previamente, AP-1 es un factor de transcripción dimérico involucrado en la proliferación, transformación y muerte celular. JunB es un regulador negativo de la proliferación celular, por lo que se lo considera un factor anti-oncogénico (Eferl and Wagner, 2003). c-Fos por el contrario regula positivamente la proliferación e induce la invasión tumoral (Eferl and Wagner, 2003; Shaulian and Karin, 2002). Evidencias demuestran que la vitamina D regula los factores JunB y c-Fos a nivel transcripcional y postranscripcional (Candelieri et al., 1991; Meyer et al., 2012). En base a estos antecedentes, en este trabajo de tesis se analizó si la expresión del ARNm de JunB y c-Fos, componentes del factor AP-1, son regulados por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . En primer lugar, las células endoteliales que expresan constitutivamente el vGPCR se 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 vehículo (0,01% de etanol) a diferentes tiempos (0,3-48 h). Al finalizar el periodo de tratamiento, se extrajo el ARN total y se retrotranscribió a ADN complementario (ADNc). La expresión de JunB y c-Fos se analizó en el ADNc resultante por qRT-PCR utilizando *primers* específicos y GAPDH para normalizar los valores de expresión. Los resultados presentados en gráficos de barras en la **Figura I.5** muestran el perfil temporal de la expresión del ARNm de JunB y c-Fos a tiempos cortos (**A**) y largos de tratamiento (**B**). Se evidencia que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aumentó significativamente la expresión de JunB a tiempos cortos (0,3-3 h) con respecto al control, mientras que c-

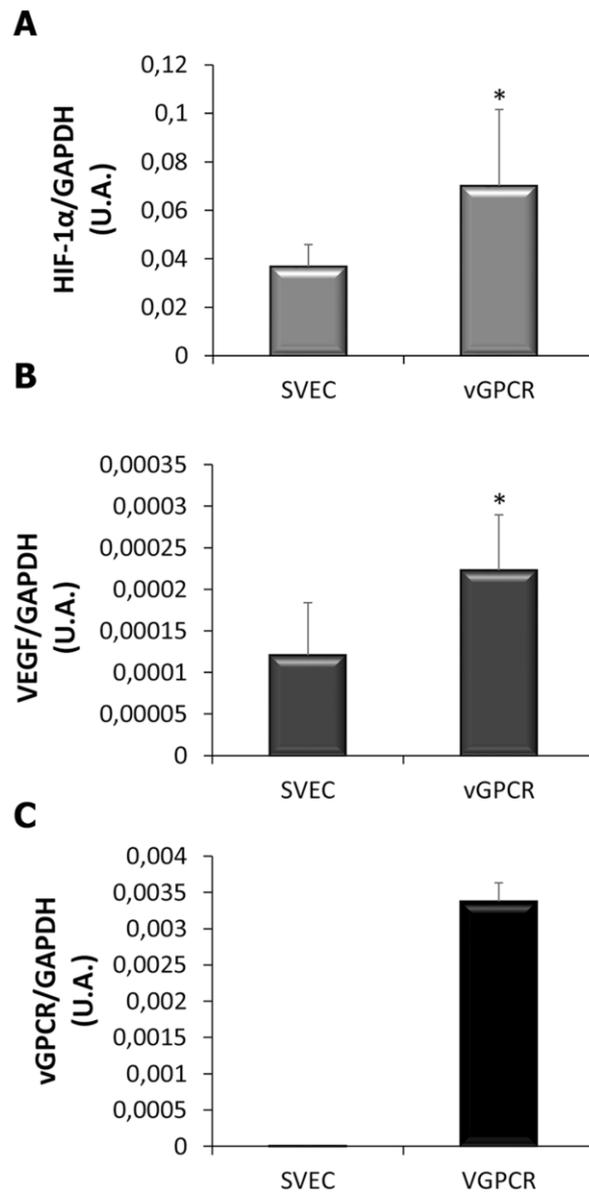
Fos varió durante el mismo periodo; se observó un aumento significativo de c-Fos a 0,3 y 1,5 horas y disminución a 0,6 horas. A tiempos largos (12-48 h), tanto el ARNm de JunB como c-Fos, se encontró significativamente aumentado (**Figura I.5B**).



**Figura I.5. Regulación de la expresión génica de JunB y c-Fos por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Las células vGPCR se cultivaron y trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o vehículo (0,01% de etanol) durante 0,3-3 h (**A**) o 12-48 h (**B**). El ARN total se extrajo y retro transcribió a ADNc. La expresión génica de JunB y c-Fos se evaluó por qRT-PCR. Los valores obtenidos se normalizaron con GAPDH. Los gráficos de barras muestran los niveles de expresión entre las condiciones tratadas con respecto al vehículo a cada tiempo en unidades arbitrarias (U.A.). La significancia estadística de los resultados de al menos tres experimentos independientes en cada de tiempo, se evaluó por la prueba t de Student (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

## **El ARNm de HIF-1 $\alpha$ y VEGF se encuentra sobreexpresado basalmente en células endoteliales que expresan constitutivamente el vGPCR**

La estabilización del factor transcripcional HIF-1 $\alpha$ , contribuye a las secreciones angiogénicas paracrinas y a la neovascularización anormal en el sarcoma de Kaposi induciendo la expresión de VEGF, mecanismo desencadenado por vGPCR (Bais et al., 2003). En base a esto, se evaluó en principio la expresión basal de factores proangiogénicos como HIF-1 $\alpha$  y VEGF, al igual que la expresión del vGPCR en células endoteliales en ausencia del receptor viral (SVEC) y en presencia (vGPCR). Las células SVEC y vGPCR se mantuvieron en cultivo, se sincronizaron con el recambio de medio sin suero durante 24 horas. Seguidamente, se extrajo el ARN total y se retrotranscribió a ADNc. La expresión de HIF-1 $\alpha$ , VEGF y vGPCR se analizó en el ADNc resultante por qRT-PCR utilizando *primers* específicos y GAPDH para normalizar los valores de expresión. En la **Figura I.6** se observa que, en condiciones basales, la expresión de HIF-1 $\alpha$  (**A**) y VEGF (**B**) fue significativamente mayor (aproximadamente un 80%) en células vGPCR en comparación con las SVEC. La expresión del vGPCR se corroboró en ambas líneas encontrándose ausente en las SVEC (**C**).

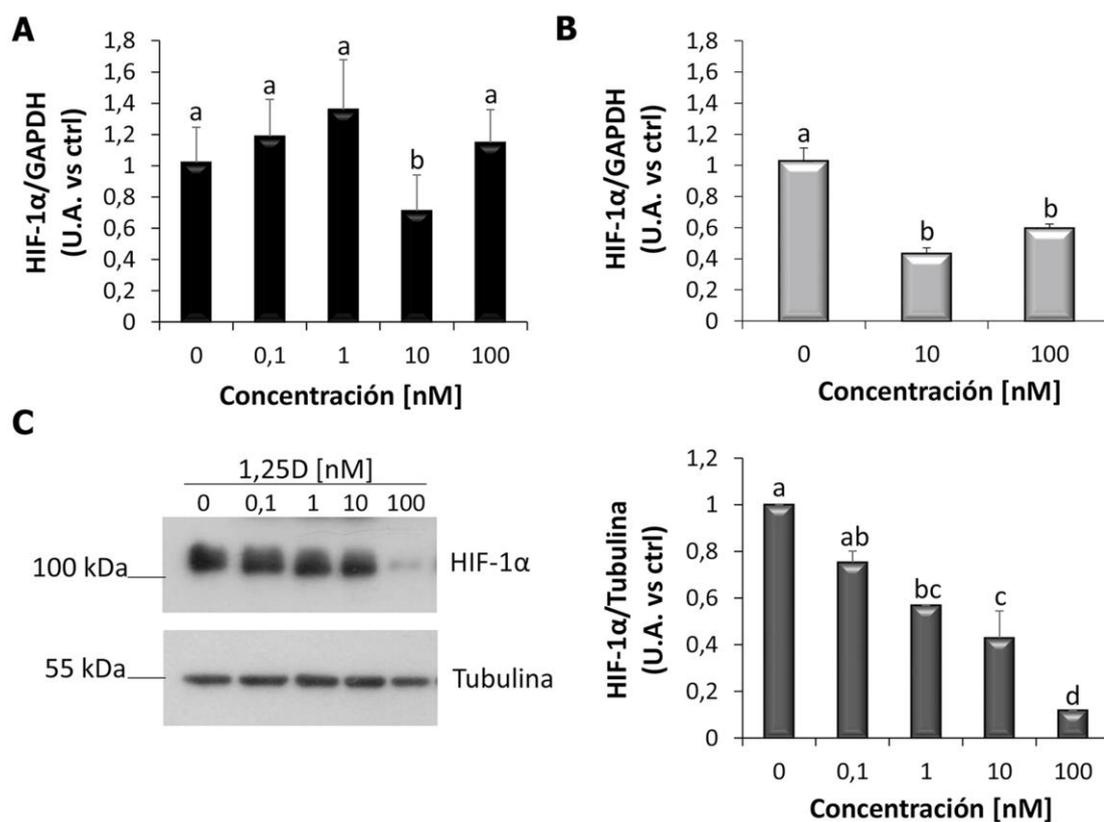


**Figura I.6. Expresión basal de HIF-1 $\alpha$ , VEGF y vGPCR.** Las células SVEC y vGPCR se cultivaron y luego de 24 h de privación de suero, el ARN total se extrajo y retro transcribió a ADNc. La expresión génica de HIF-1 $\alpha$  (A), VEGF (B) y vGPCR (C) se evaluó por qRT-PCR. Los valores obtenidos se normalizaron con GAPDH. Los gráficos de barras muestran los niveles de expresión en unidades arbitrarias (U.A.). La significancia estadística de los resultados de tres experimentos independientes para A y B se evaluó por la prueba t de Student (\* $p < 0,05$ ).

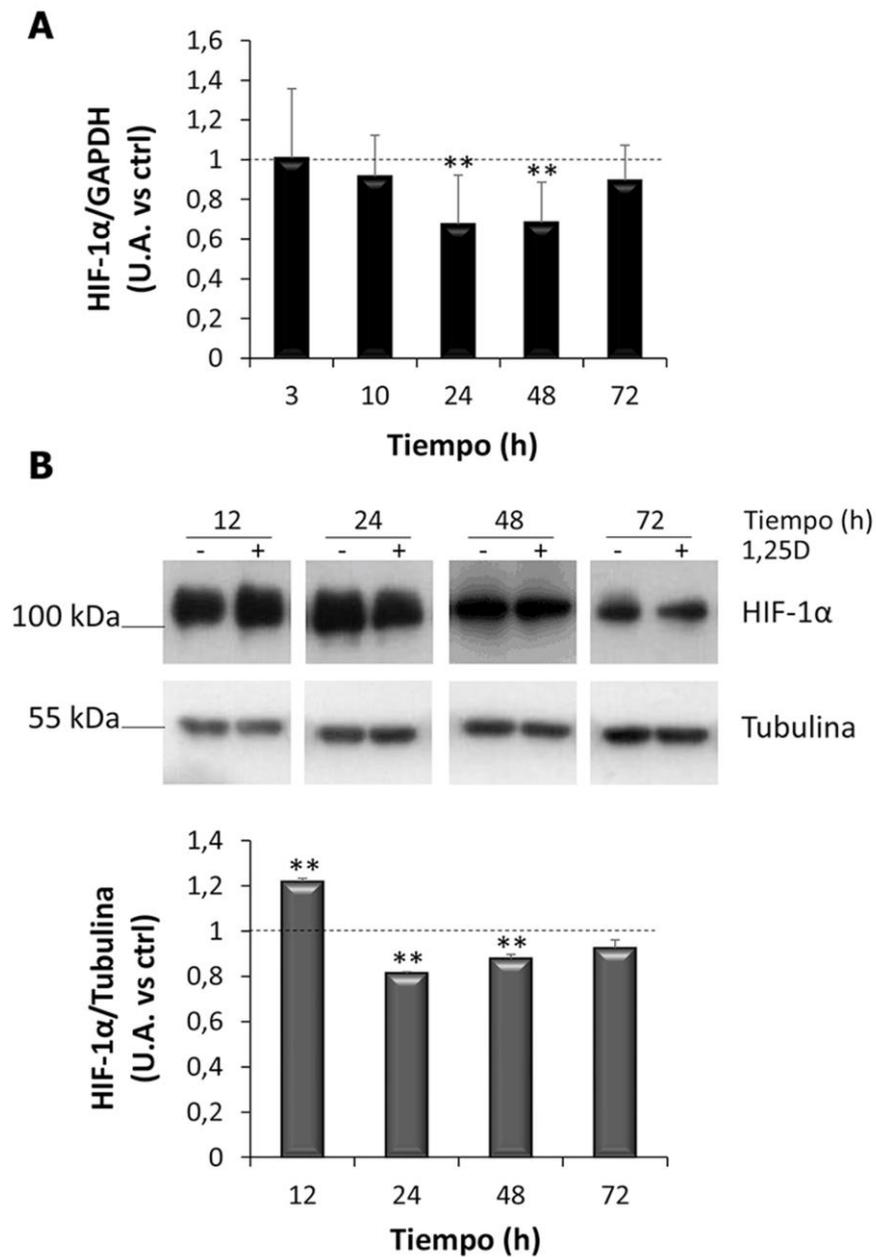
## **El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ disminuye la expresión de HIF-1 $\alpha$ en células endoteliales vGPCR**

La hipoxia es la condición fisiopatológica más importante para estimular la angiogénesis por lo que HIF-1 $\alpha$  es un regulador positivo del crecimiento tumoral y su inhibición suele resultar en la supresión del tumor. El tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibe la expresión de HIF-1 $\alpha$  y su actividad transcripcional en células de cáncer de colon y de próstata humanas (Ben-Shoshan et al., 2007), por lo que se evaluó la regulación de HIF-1 $\alpha$  por el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en las células endoteliales que expresan constitutivamente el vGPCR (monocapa) y en un modelo tridimensional, donde las células vGPCR forman esferoides multicelulares (modelo 3D). Las células vGPCR en monocapa o esferoides se cultivaron y privaron de suero antes del tratamiento 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 con el fin de determinar el mayor efecto. Luego, se extrajo el ARN total, se retrotranscribió a ADNc y se analizó la expresión de HIF-1 $\alpha$  por qRT-PCR utilizando *primers* específicos y GAPDH para normalizar los valores de expresión (**Figura I.7**). El análisis cuantitativo de los datos obtenidos de qRT-PCR revela una expresión diferencial del ARNm de HIF-1 $\alpha$  en células en monocapa y en esferoides en respuesta a diferentes concentraciones de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . En el cultivo en monocapa, sólo se observó una disminución significativa del mensajero a 10 nM (**A**) mientras que en los esferoides la disminución del mensajero también fue significativa a 100 nM (**B**). A su vez, experimentos en paralelo permitieron analizar las variaciones en los niveles proteicos de HIF-1 $\alpha$  por Western blot. En la **Figura I.7C** se muestra un blot representativo y gráfico de barras que representa la cuantificación de las bandas de HIF-1 $\alpha$  normalizadas con de tubulina. El análisis de los resultados, reveló una disminución significativa de los niveles proteicos de HIF-1 $\alpha$  en función de

la concentración de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  siendo máxima a 100 nM. A continuación, se investigó el perfil temporal de expresión del mensajero y de la proteína HIF-1 $\alpha$  en respuesta a 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Las células vGPCR se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (10 nM) o vehículo (0,01% de etanol) a diferentes tiempos (3-72 h) (**Figura I.8**). Los resultados muestran que a 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  tanto la expresión del ARNm como los niveles proteicos de HIF-1 $\alpha$  disminuyeron significativamente durante 24 y 48 horas de tratamiento.



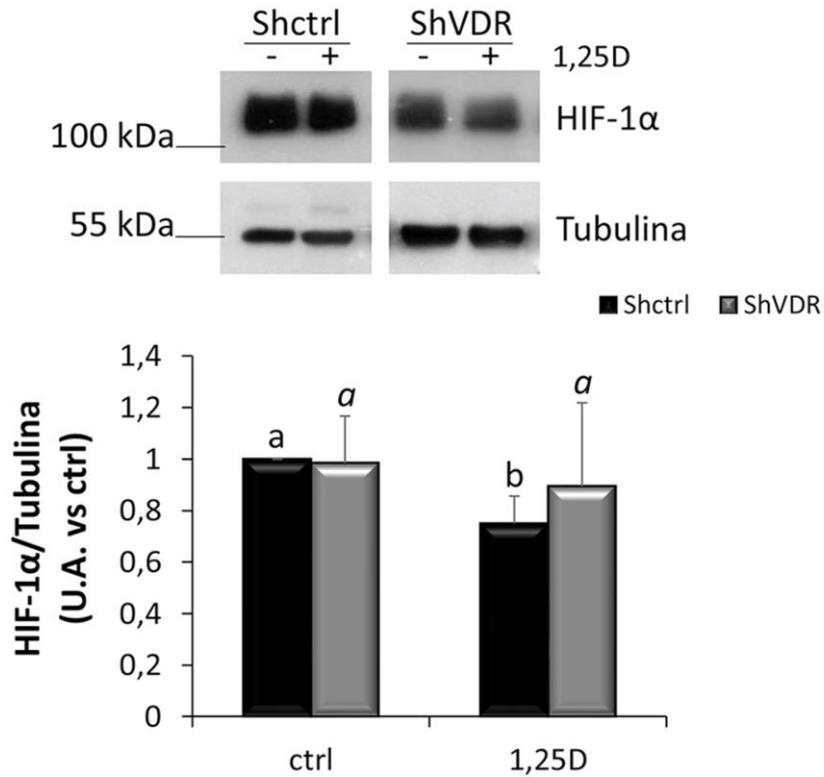
**Figura I.7. Disminución de HIF-1α en función de la concentración de  $1\alpha,25(OH)_2D_3$ .** Las células vGPCR creciendo en cultivo en monocapa (**A** y **C**) o en esferoides (**B**) se trataron con concentraciones crecientes de  $1\alpha,25(OH)_2D_3$  (1,25D, 0,1-100 nM) o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 h. Los niveles del ARNm se analizaron por qRT-PCR (**A**) y (**B**). Los niveles proteicos de HIF-1α se analizaron por Western blot (**C**). Se muestra un blot representativo y en el gráfico de barras la cuantificación de las bandas de HIF-1α, normalizadas con Tubulina de dos blots. El análisis estadístico de los resultados se realizó por ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni, en donde las diferencias significativas se representan con distintas letras [ $p < 0,05$  para **A** ( $n=4$ ) y **C** ( $n=2$ );  $p < 0,01$  para **B** ( $n=6$ )].



**Figura I.8. Expresión de HIF-1 $\alpha$  en función del tiempo de exposición al 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ .** Las células vGPCR se trataron con 10 nM de 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  (1,25D) o vehículo (0,01% de etanol) por 3 a 72 h. Los niveles del mensajero se analizaron por qRT-PCR, se muestra el resultado de cuatro experimentos independientes (**A**). Los niveles proteicos de HIF-1 $\alpha$  se analizaron por Western blot (**B**). Se muestra un blot representativo de dos experimentos independientes y la cuantificación de las bandas de HIF-1 $\alpha$ , normalizadas con Tubulina, se presenta en gráficos de barras. El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba t de Student (\*\*  $p < 0,01$ ).

## **La disminución de HIF-1 $\alpha$ inducida por 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ depende del VDR**

Como se mencionó en la introducción, el 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  puede ejercer sus efectos a través de un mecanismo genómico, regulando la transcripción de genes y de uno no genómico de respuestas rápidas iniciadas en la membrana (Norman, 2008). El VDR una vez unido al ligando por sitios específicos, forma un heterodímero con el receptor X retinoideo (RXR), capaz de translocar al núcleo (Fleet et al., 2012). Sin embargo, no se saben si todas las acciones del 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  involucran la interacción directa o no de la hormona con su receptor nuclear. Se investigó entonces si el silenciamiento del VDR afecta la expresión de HIF-1 $\alpha$  en células vGPCR. 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(OH) $_2$ D $_3$  o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas. En la **Figura I.9** se observa que el 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  provocó la disminución de los niveles proteicos de HIF-1 $\alpha$  luego de 48 horas de tratamiento, mientras que cuando se silenció la expresión del VDR, este efecto se revirtió sugiriendo la participación del VDR en la regulación de la expresión de HIF-1 $\alpha$ .

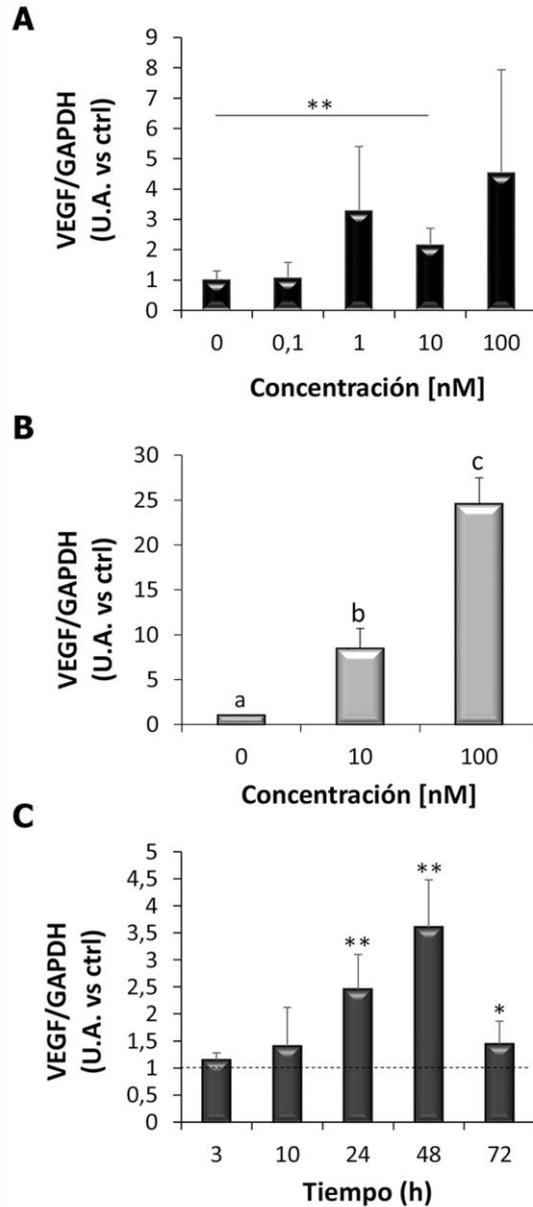


**Figura I.9. Dependencia del VDR en la regulación de HIF-1 $\alpha$  por 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ .** Las líneas celulares vGPCR-shctrl (shctrl) y vGPCR-shVDR (shVDR) fueron cultivadas y tratadas con 10 nM de 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  (1,25D) o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 h. Se analizaron los niveles proteicos de HIF-1 $\alpha$ . Se muestra un blot representativo, de tres experimentos independientes, y la cuantificación 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  $p < 0,05$ .

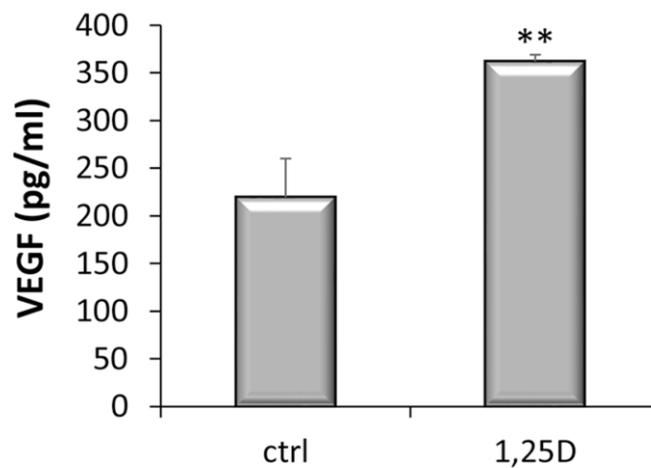
## **El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aumenta la expresión del VEGF en células endoteliales vGPCR y en esferoides multicelulares derivados de ellas**

Algunos reportes indican que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibe la formación de vasos inducida por VEGF, en modelos *in vivo* e *in vitro*, disminuyendo el crecimiento vascular de tumores en ratones con xenoinjertos de células que sobreexpresan VEGF (Mantell et al., 2000) e inhibiendo la proliferación de células endoteliales (Ben-Shoshan et al., 2007). A nivel molecular, el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  reduce la expresión de VEGF en varios tipos de células malignas, incluyendo células de cáncer de próstata, a través de la represión transcripcional de HIF-1 $\alpha$  (Ben-Shoshan et al., 2007). Por lo tanto, en este trabajo se indagó sobre los efectos de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en la expresión VEGF. Las células vGPCR creciendo en monocapa o esferoides se cultivaron y sincronizaron como se mencionó previamente y luego 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) por 48 horas. Luego la expresión de VEGF se analizó por qRT-PCR utilizando *primers* específicos y normalizando con GAPDH (**Figura I.10**). En células vGPCR creciendo en monocapa, se observó un aumento muy variable en el mensajero de VEGF conforme aumenta la concentración de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  que sólo mostró ser significativo a una concentración de 10 nM (**Figura I.10A**). En los esferoides multicelulares, el mensajero de VEGF aumentó en forma dependiente de la concentración y de forma altamente significativa a 10 y 100 nM (**Figura I.10B**). Seguidamente se investigó el perfil de expresión temporal del ARNm de VEGF. 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) a diferentes tiempos (0,3-72 h). Se analizaron los niveles de mensajero por qRT-PCR como ya se explicó previamente empleando *primers* específicos para VEGF. Los resultados que se muestran en la **Figura I.10C** revelaron que el ARNm de

VEGF aumentó significativamente en forma dependiente del tiempo siendo el máximo efecto a las 48 horas para luego descender. Por consiguiente, como los niveles de mensajero de VEGF se encontraron aumentados luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , se evaluó si el factor VEGF se encuentra presente en las células. 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) por 48 horas, seguidamente, las células vGPCR se lisaron y se midieron los niveles de VEGF por medio de un ensayo de ELISA como se especificó en la sección de Metodología. En la **Figura I.11** se observa que el VEGF aumentó significativamente luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en concordancia con lo previamente observado para el mensajero.



**Figura I.10.** El tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aumenta el ARNm de VEGF. Las células vGPCR creciendo en monocapa (A) o en esferoides (B) se trataron con concentraciones crecientes (0,1-100 nM) de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 h. Perfil temporal del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  10 nM en células vGPCR en monocapa (C). Los niveles del mensajero se analizaron por qRT-PCR. El análisis estadístico se realizó primeramente por ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni en donde las diferencias significativas se representan con distintas letras en B ( $n = 6$ ,  $p < 0,01$ ). El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba t de Student en A ( $n = 2$ ) y C ( $n = 3$ ) con  $*p < 0,05$  y  $**p < 0,01$ .

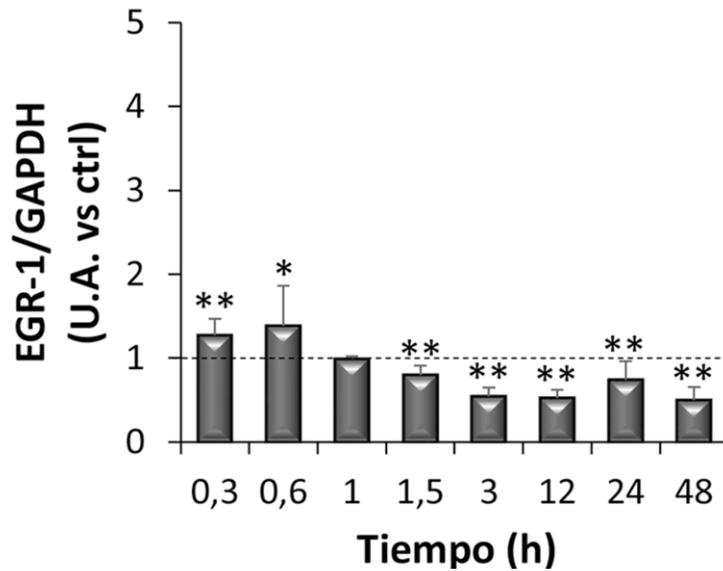


**Figura I.11. Aumento del factor VEGF por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Las células vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 h. Los niveles de la proteína se midieron por ELISA. Resultado de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó por la prueba *t* de Student (\*\* $p < 0,01$ ).

### Disminución de la expresión de EGR-1 por $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

El factor de respuesta temprana de crecimiento (EGR-1) es un miembro de la familia de genes de respuesta temprana al crecimiento identificados como mensajeros de factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores y metabolitos. Se acumula rápidamente en el núcleo al ser estimulada por mitógenos, citoquinas y estrés celular, debido a hipoxia y/o lesiones vasculares (Li et al., 2020; Rong et al., 2006). Reportes previos demuestran que el EGR-1, inducido por activación de ERK, activa a VEGFA en células cancerosas de pulmón por unión al promotor de VEGF e inclusive puede inducir la expresión de VEGFA independientemente de HIF-1 $\alpha$  (Shimoyamada et al., 2010). Se investigó entonces si el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  regula la expresión del ARNm de EGR-1. Las células vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o vehículo (0,01% de etanol) a diferentes tiempos (0,3-48 h). Se analizaron los niveles de mensajero por qRT-PCR como se explicó anteriormente utilizando *primers* específicos para EGR-1.

Los resultados en la **Figura I.12** revelaron que el ARNm de EGR-1 se mantuvo disminuido a lo largo del tiempo luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .



**Figura I.12.** Perfil temporal de la regulación de EGR-1 por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Las células vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o vehículo (0,01% de etanol) durante diferentes periodos de tiempo (0,3 - 48 h). Se analizaron los niveles del mensajero por qRT-PCR y la cuantificación se muestra en gráficos de barras. Resultado de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó por la prueba t de Student (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

# Discusión

Ante condiciones de hipoxia las células experimentan una variedad de respuestas biológicas como la activación de vías de señalización que regulan la proliferación, la angiogénesis y la muerte. Las células cancerosas adaptaron estas vías, permitiendo que los tumores sobrevivan e incluso crezcan bajo condiciones hipóxicas. Por lo que se considera a los elementos de respuesta a hipoxia como candidatos para el direccionar la terapia anti-tumoral (Harris, 2002). Las células endoteliales transformadas por vGPCR inducen factores de crecimiento angiogénicos y citoquinas en respuesta a las bajas concentraciones de oxígeno, que reclutan y transforman las células endoteliales presentes a nivel paracrino. Dentro de los factores de transcripción se encuentran el NF- $\kappa$ B y AP-1 a través de la activación de proteínas G pequeñas Rac1 (Montaner et al., 2004). Existen evidencias de que la expresión del vGPCR en líneas transfectadas de células epiteliales, monocíticas y células T induce la activación constitutiva de los factores de transcripción inmunorreguladores NF- $\kappa$ B y AP-1, lo que se encuentra asociado a la inducción constitutiva de citoquinas pro-inflamatorias dependientes de NF- $\kappa$ B como IL-1 b, IL-6 y TNF $\alpha$ , y de AP-1 como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (Schwarz and Murphy, 2001). NF- $\kappa$ B regula la transcripción de una amplia gama de genes involucrados en inflamación, regulación del crecimiento, apoptosis, procesos de invasión/metástasis en cáncer y progresión tumoral (Aggarwal et al., 2004). La expresión de NF- $\kappa$ B se encuentra aumentada en sarcoma de Kaposi y en las células vGPCR se activa esta vía para la inducción de la neoplasia (Martin and Gutkind, 2009). Resultados previos de nuestro grupo demostraron que el efecto anti

proliferativo del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  se debe en parte a la inhibición de la vía NF- $\kappa\text{B}$  (González Pardo et al., 2012b).

El factor de transcripción AP-1, compuesto principalmente por dímeros de subunidades Jun, Fos y ATF, interviene en procesos biológicos como la proliferación, diferenciación, apoptosis y transformación oncogénica. Su contribución a la determinación del destino celular depende de la abundancia de sus subunidades, la composición de los dímeros, la calidad del estímulo, el tipo y el entorno celular (Hess et al., 2004). A su vez, si AP-1 es oncogénica o anti-oncogénica, depende principalmente de la actividad antagonista de las diferentes proteínas JUN, ya que puede promover o no la proliferación (Eferl and Wagner, 2003). Mientras c-Jun es oncogénica, JunB y JunD pueden ser reguladores negativos de la proliferación celular (Jochum et al., 2001). JunB es capaz de promover la apoptosis actuando como anti-oncogen *in vitro* usando fibroblastos inmortalizados (Passegue and Wagner, 2000). JunB y JunD pueden cambiar la activación o represión mediada por c-Jun de reguladores cruciales de la progresión del ciclo celular (Eferl and Wagner, 2003). Por otro lado, c-Fos es indispensable para la proliferación celular, es el homólogo de v-Fos, el oncogén transformador de los virus de osteosarcoma murino FBJMuSV y FRB-MuSV (Curran et al., 1983). Al igual que v-Fos, c-Fos también tiene actividad oncogénica, que depende de su capacidad de heterodimerizarse con proteínas Jun y de unirse al ADN (Schuermann et al., 1989). Igualmente, solo la sobreexpresión de c-Fos es capaz de inducir el crecimiento invasivo en geles de colágeno, lo que indica una mayor participación que c-Jun durante la tumorigénesis en etapa tardía (Reichmann et al., 1992). En reportes previos  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibe la proliferación de células de osteosarcoma humano por activación no genómica del VDR de las vías JNK y MEK1/MEK2 conduciendo a la regulación positiva de un complejo c-Jun/c-Fos

(AP-1) que estimula la expresión de p21 (Wu et al., 2007). En una línea celular de leucemia humana HL60, el complejo AP-1 es requerido por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  para inducir la diferenciación de los monocitos, Jun-B y Fos-B pueden promover la inactividad replicativa asociada con la diferenciación de células malignas (Wang and Studzinski, 2006).

En este trabajo de tesis los resultados presentados muestran la variación de la regulación del mensajero de JunB y c-Fos con el tiempo de exposición a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Durante cortos periodos de tiempo, la expresión de JunB se encuentra elevada y c-Fos disminuida. Distinto es lo que se observó a mayores periodos de tiempos donde si bien, la expresión de JunB también se encuentra elevada, la expresión de c-Fos no se encuentra disminuida. Pese a que no se determinaron los niveles proteicos de JunB, la elevada expresión génica sugiere una participación activa en la disminución de la proliferación en células vGPCR. En el caso de c-Fos, se observó una disminución en los niveles de mensajero durante cortos periodos de tiempo, indicando una posible caída de su efecto como regulador positivo de la proliferación e invasión tumoral por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . A tiempos largos c-Fos se encontró aumentado, lo que podría vincularse a evidencias de un elemento de respuesta a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en el promotor del gen c-Fos de ratón (Schrader et al., 1997). Asimismo, existen reportes de que ERK, perteneciente a la familia de quinasas activadas por mitógenos (MAPK), cataliza la fosforilación de c-Fos para así activarlo (Gilley et al., 2009). Resultados previos de nuestro grupo determinaron que  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  disminuye la fosforilación de ER1/2 en función de la concentración y del tiempo de exposición a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Suarez, 2018). Por lo que la fosforilación de c-Fos podría estar inhibida como parte del efecto regulador de la proliferación.

Un agente clave para la expresión de genes involucrados en la supervivencia celular y la angiogénesis durante hipoxia local es el factor inducible por hipoxia (HIF). En la mayoría de los modelos experimentales, la vía de estos factores mediadores de señalización del oxígeno celular, es un regulador positivo del crecimiento tumoral cuya inhibición a menudo resulta en la supresión oncogénica (Rankin and Giaccia, 2008). El 50-60% de los tumores sólidos contienen áreas de tejidos hipóxicos y/o anóxicos resultados de un desequilibrio entre el suministro y el consumo de oxígeno en los tumores en proliferación. En muestras clínicas, HIF-1 $\alpha$  se encuentra elevado lo que se correlaciona con un mal pronóstico en varios tipos de cáncer (Vaupel and Mayer, 2007). La neovascularización es crítica para la progresión tumoral y HIF-1 $\alpha$  puede activar directamente la expresión de varios factores pro-angiogénicos como VEGF, receptores de VEGF FLT-1 y FLK-1, inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), angiopoyetinas (ANG-1 y -2), plaquetas derivado del factor de crecimiento B (PDGF-B), el receptor TIE-2 y las metaloproteinasas de matriz MMP-2 y -9 (Hickey and Simon, 2006). De todos estos factores VEGF-A tiene potentes propiedades angiogénicas y se expresa en una gran cantidad de tumores humanos (Dvorak, 2002), y se correlaciona al igual que HIF-1 $\alpha$  con un mal pronóstico. La expresión constitutivamente activa del vGPCR estimula la angiogénesis incrementando la secreción de VEGF por medio de HIF-1 $\alpha$ , el cual activa la transcripción de un elemento de respuesta a hipoxia dentro de la región flanqueante 5' del promotor de VEGF. La estimulación de HIF-1 $\alpha$  por el vGPCR implica la fosforilación de su dominio regulador/inhibidor por vías de señalización p38 y MAPKs, mejorando así su actividad transcripcional en una línea celular de fibroblastos NIH 3T3 (Sodhi et al., 2000). Antecedentes de estudios realizados *in vivo* e *in vitro* evidencian que el tratamiento con 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  inhibe la angiogénesis en cáncer. El tratamiento hormonal reduce

los niveles proteicos de HIF-1 $\alpha$  y VEGF e inhibe la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$ , así como la de sus genes diana como VEGF, endotelina-1 (ET-1) y el transportador de glucosa (GLUT-1) (Hirota and Semenza, 2006) en varias células cancerosas humanas. El mecanismo para suprimir la expresión de VEGF depende de la presencia de HIF-1 $\alpha$ , ya que en células cancerosas humanas con HIF-1 $\alpha$  silenciado, el tratamiento hormonal fue ineficaz. 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  también es capaz de inhibir la proliferación celular aun en condiciones de hipoxia (Ben-Shoshan et al., 2007). En este trabajo de tesis los resultados obtenidos indican que previo a la realización de un tratamiento con 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ , la expresión basal de HIF-1 $\alpha$  y VEGF en células vGPCR es de aproximadamente un 80% mayor que en la línea celular murina SVEC, lo que indica que el receptor viral induce la expresión de HIF-1 $\alpha$  y VEGF en células endoteliales murinas que conforman el modelo celular del sarcoma de Kaposi. Los resultados obtenidos en esta tesis, indican que a concentración 10 nM de 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  el mensajero de HIF-1 $\alpha$  disminuye significativamente tanto en células vGPCR creciendo en monocapa como en esferoides. A su vez, los niveles proteicos de HIF-1 $\alpha$  también se encontraron disminuidos en función de la concentración y tiempo de tratamiento. Esta disminución en HIF-1 $\alpha$  resultó ser dependiente del VDR.

El 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  inhibe en forma dependiente de la concentración el crecimiento de células endoteliales y su elongación para la formación de vasos inducida por el VEGF, proceso donde se encuentra involucrada la apoptosis (Mantell et al., 2000). Otro mecanismo regulatorio reportado es el aumento de VEGFA, pero con atenuación de su señalización a través del receptor VEGFR2 en pericitos (Jamali et al., 2019). En este trabajo los resultados indicaron que el mensajero y proteína del factor VEGF aumentan significativamente por 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  en células endoteliales que expresan

el vGPCR. Esta discrepancia podría explicarse por reportes de otros grupos donde  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  regula la expresión de VEGF por medio de un elemento de respuesta al receptor de vitamina D en el promotor de VEGF. Se observó que, en cultivos primarios de células de músculo liso vascular aórtico de rata, el VDR activado actúa directamente como factor de transcripción uniéndose a dos sitios en el promotor de VEGF. Los niveles del mensajero de VEGF se tradujeron en los niveles del factor presente en el lisado celular, aumento que al ser dependiente del VDR se condice con la evidencia preexistente de una regulación del promotor de VEGF por el VDR (Cardus et al., 2009).

Finalmente, en este trabajo de tesis se determinó que EGR-1 disminuyó luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Existe evidencia que indica que el aumento de expresión de EGR-1, factor de transcripción susceptible a hipoxia (Li et al., 2020), es inducido por activación de ERK y como consecuencia aumenta la expresión de VEGF en varios tipos de cáncer. EGR-1 se une a la región proximal del promotor de VEGFA e induce su aumento independientemente de HIF-1 $\alpha$  (Shimoyamada et al., 2010). En vista del aumento observado en VEGF se esperaba que EGR-1 también se encuentre aumentado, sin embargo, su expresión se encontró disminuida en función del tiempo con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Estos resultados sugieren que la regulación de VEGF por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  no sucede a través de la expresión de EGR-1.

## **Conclusión**

Los resultados presentados en este capítulo indican que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  regula negativamente factores pro-angiogénicos activados en condiciones de estrés celular como la hipoxia. El tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aumenta la expresión del mensajero del factor anti-oncogénico JunB y durante cortos periodos de tiempo disminuye el

mensajero del factor pro-oncogénico c-Fos. HIF-1 $\alpha$  disminuye su expresión en forma dependiente del VDR, no así VEGF que contrario a lo esperado, aumenta luego del tratamiento con 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  independientemente de la disminución de HIF-1 $\alpha$  y EGR-1. Esta diferencia puede deberse a una regulación directa del promotor de VEGF por parte del VDR.

# CAPÍTULO II

## MODULACIÓN DE LA VIA WNT/ $\beta$ -CATENINA POR $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

# Introducción

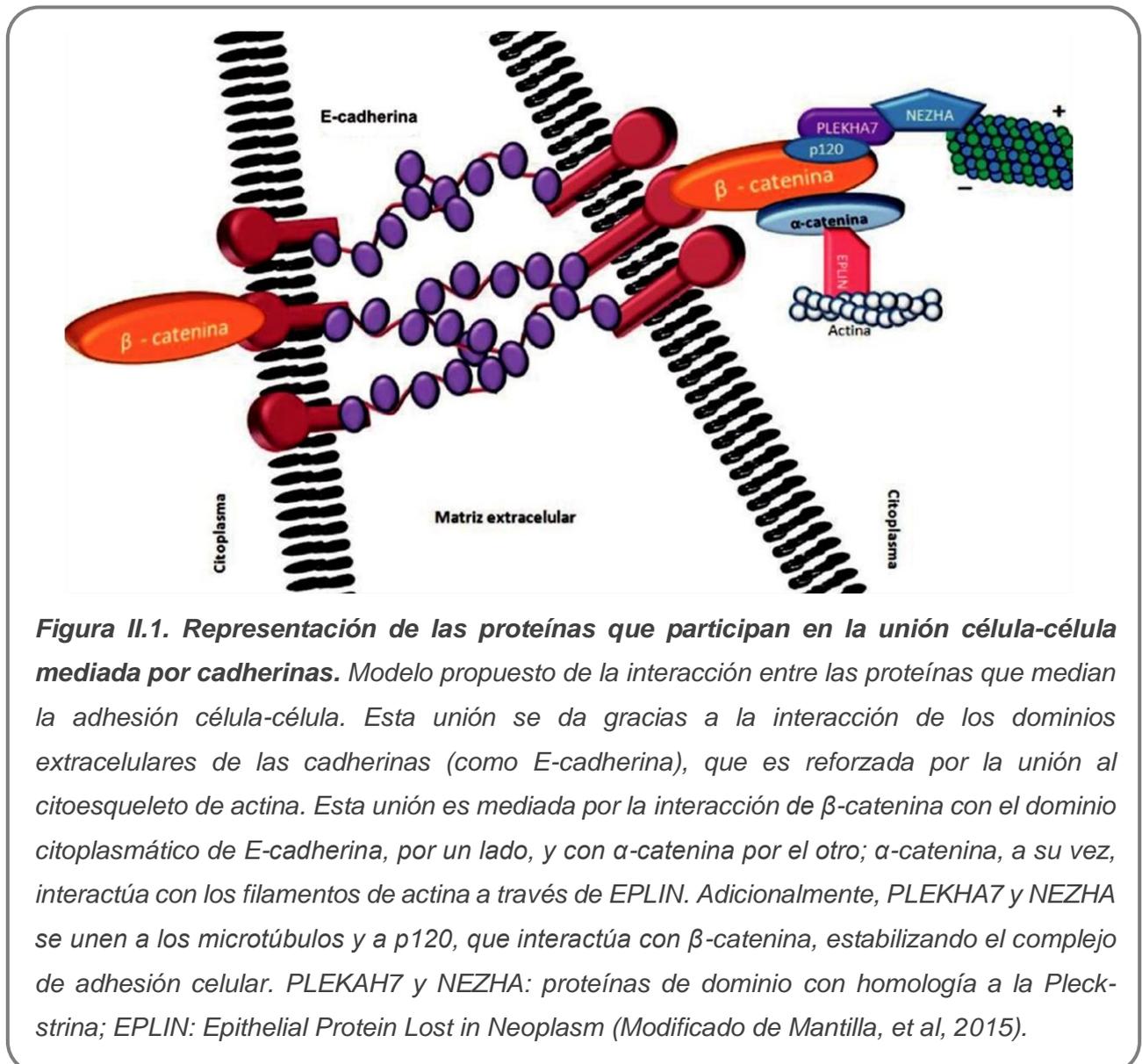
Las proteínas Wnt comprenden una familia importante de moléculas de señalización que participan en el control de la proliferación, supervivencia, migración, y diferenciación en muchos tipos celulares durante el desarrollo embrionario y la vida adulta (Willert and Nusse, 2012), son factores conservados evolutivamente que participan tanto en el desarrollo como en la enfermedad (Loh et al., 2016; Yang, 2012). El nombre Wnt deriva de *Drosophila melanogaster* sin alas y su homólogo de ratón Int (Loh et al., 2016). La vía Wnt a menudo se interpreta como señal difusible, sin embargo, es un sistema de comunicaciones extracelular de corto alcance a células vecinas ya que la base lipídica de los ligandos Wnt limita su difusión en el espacio extracelular hidrofílico (Farin et al., 2016). La vía Wnt puede ser no canónica (independiente de  $\beta$ -catenina) o canónica (dependiente de  $\beta$ -catenina). La vía canónica es la más estudiada y  $\beta$ -catenina, su componente principal.  $\beta$ -catenina es una proteína multifuncional de 92 kDa, codificada por el gen CTNNB1 localizado en el cromosoma 3p22. Participa además en la adhesión célula-célula formando parte de complejos de alto peso molecular por interacción con la proteína cadherina (proteínas de adhesión intercelular) (Mantilla et al., 2015). Es necesaria la coordinación entre estas dos funciones para mantener controlada la formación del eje y mesodermo en el embrión y la diferenciación de células madre. Durante la vida adulta, la vía Wnt puede desregularse en varios mecanismos moleculares y patologías como la inflamación, desordenes metabólicos y neurológicos y cáncer (Vallée et al., 2019).

En los vasos sanguíneos, las uniones adherentes conectan y coordinan las actividades de las células endoteliales individuales controlando así su permeabilidad,

el tráfico de células inmunes y la angiogénesis (Lampugnani et al., 2018). La interacción de VE-cadherina con  $\alpha$ -catenina ocurre por medio de  $\beta$ -catenina, fundamental para interactuar con el citoesqueleto (Dorland and Huveneers, 2016). A través de este complejo proteico, VE-cadherina puede controlar la señalización limitando la translocación nuclear de las cateninas y de otras proteínas que modulan la transcripción celular (Taddei et al., 2008). Con la disrupción de este complejo se pierde el contacto célula-célula, que conlleva a la pérdida de la inhibición por contacto y al movimiento celular propios del proceso de invasión celular durante la carcinogénesis (Tafrihi and Nakhaei Sistani, 2017) (**Figura II.1**).

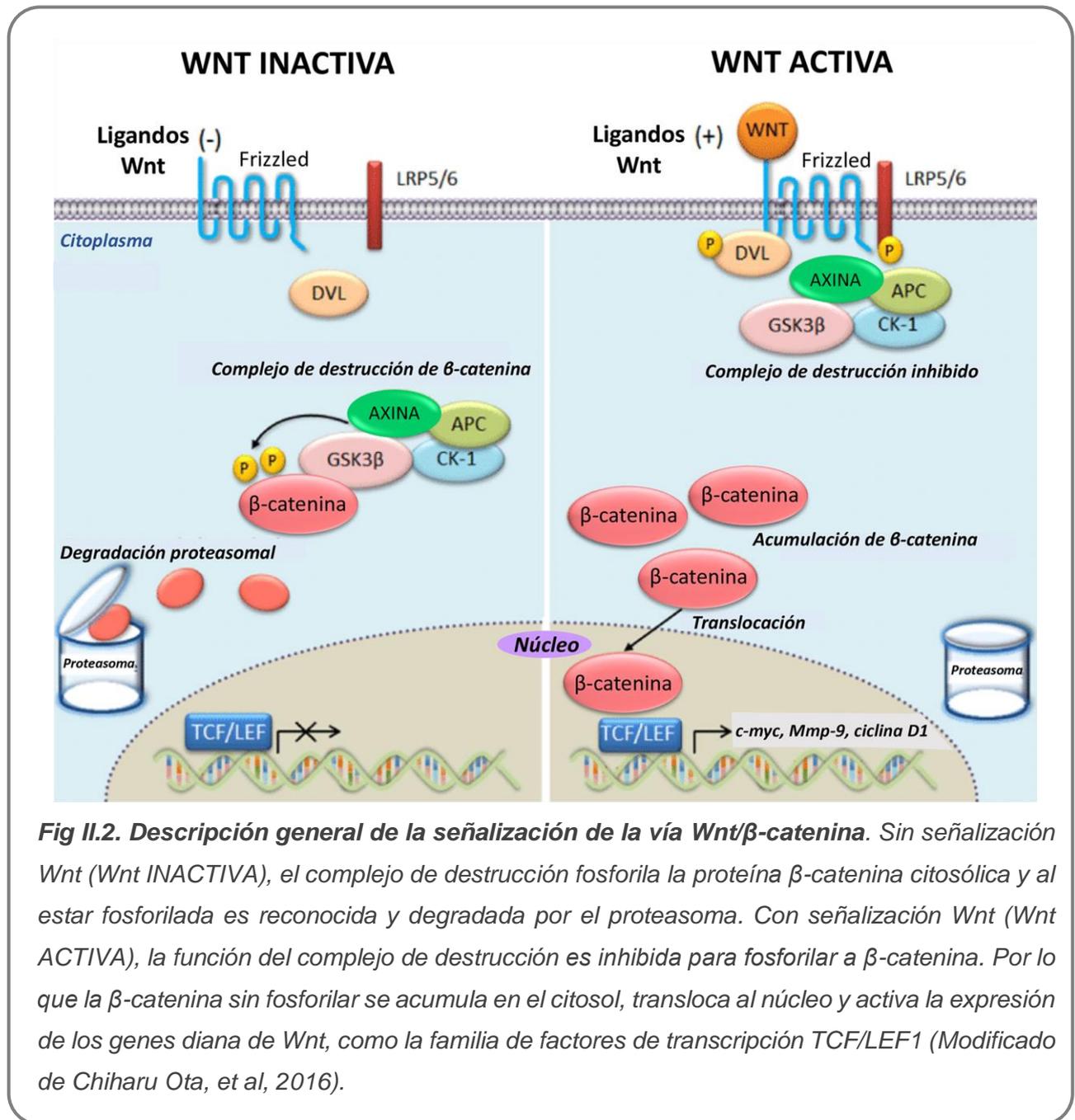
La vía canónica puede definir el destino celular. Durante la ausencia de ligando Wnt, un complejo proteico citoplasmático promueve la fosforilación, ubiquitinación y degradación de  $\beta$ -catenina por el proteasoma. Los supresores tumorales AXINA y APC (adenomatosis poliposis coli), y las quinasas CK1 (caseína quinasa 1) y GSK-3 $\beta$  (glicógeno sintasa quinasa 3 $\beta$ ) constituyen este complejo intracelular que inhibe la estabilización y la migración al núcleo de  $\beta$ -catenina marcándola para su degradación (Wu and Pan, 2010). Pero cuando los ligandos Wnt se unen al receptor de membrana heterodimérico Frizzled y los co-receptores LRP5 o LRP6 (proteína 5/6 relacionadas con el receptor de lipoproteína de baja densidad), llevan a la propagación de la señal de Wnt más allá de la membrana plasmática. Estos receptores ahora fosforilados reclutan la proteína citoplasmática DVL (Dishevelled) la que fosforilada por Frizzled, se activa y fosforila a su vez a AXINA, lo que lleva a la inhibición del complejo de destrucción. Como consecuencia,  $\beta$ -catenina logra escapar de la fosforilación y se estabiliza, aumenta su concentración en el citosol e ingresa al núcleo donde se comporta como factor de transcripción uniéndose a los co-activadores LEF/TCF (Factor de unión al potenciador linfoide-1/Factor específico de células T)

decodificando proteínas dianas de los ligandos Wnt como el proto- oncogén c-myc (Dang et al., 2006), ciclina D1 (Hong et al., 2004) y la proteasa Mmp-9 (Huang, 2018) involucradas en la proliferación, el ciclo celular y la diferenciación que se encuentran sobreexpresados en varios cánceres humanos (Cadigan and Waterman, 2012; Loh et al., 2016; Niehrs, 2012; Ota et al., 2016; Vallée et al., 2019) (**Figura II.2**).



En caso de una activación aberrante de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina se desencadenan procesos patogénicos como la carcinogénesis, debido a la acumulación nuclear de  $\beta$ -

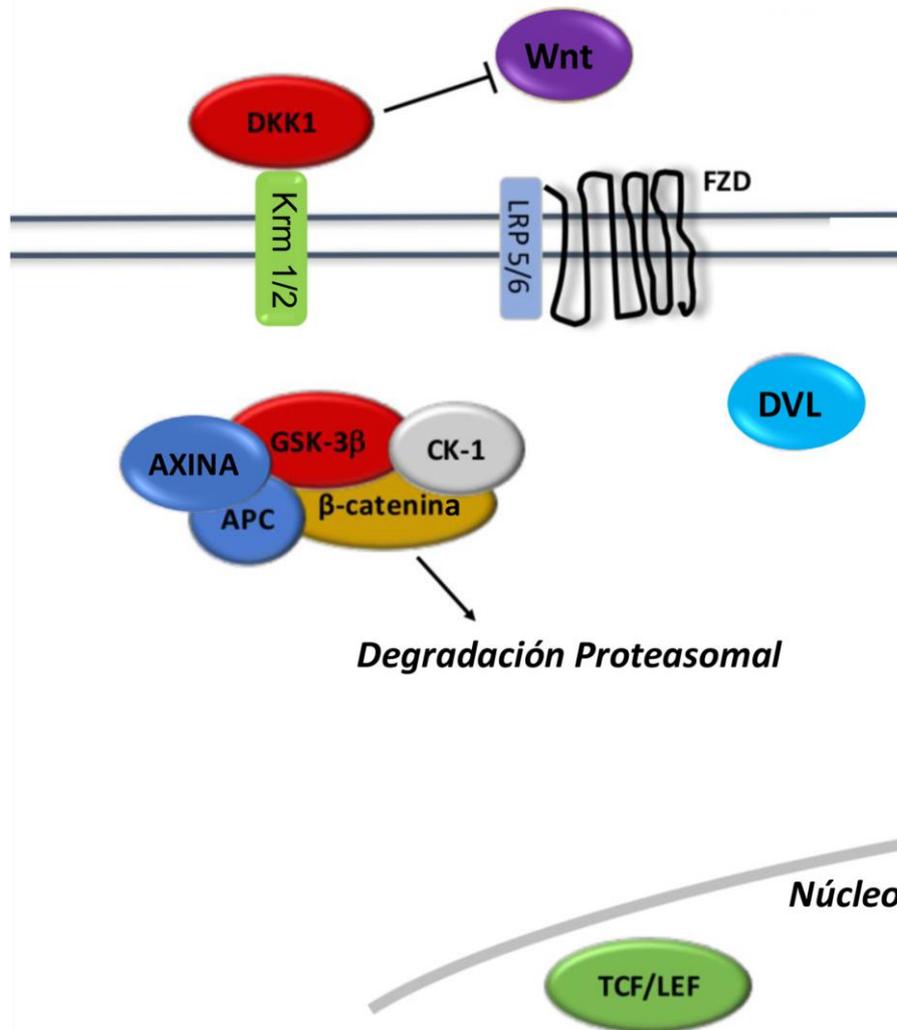
catenina lo que induce de la proliferación celular excesiva, crítica para la iniciación y la progresión de varios tipos de procesos tumorales (Polakis, 2012).



**Fig II.2. Descripción general de la señalización de la vía Wnt/β-catenina.** Sin señalización Wnt (Wnt INACTIVA), el complejo de destrucción fosforila la proteína β-catenina citosólica y al estar fosforilada es reconocida y degradada por el proteasoma. Con señalización Wnt (Wnt ACTIVA), la función del complejo de destrucción es inhibida para fosforilar a β-catenina. Por lo que la β-catenina sin fosforilar se acumula en el citosol, transloca al núcleo y activa la expresión de los genes diana de Wnt, como la familia de factores de transcripción TCF/LEF1 (Modificado de Chiharu Ota, et al, 2016).

Los antagonistas Wnt secretados intervienen en la modulación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. La familia Dickkopf de proteínas secretadas de 255-350 aminoácidos consiste de cuatro miembros principales en vertebrados (Dkk-1 a 4). Dkk-1 miembro más estudiado de la familia, puede ejercer su mecanismo inhibitorio de dos formas, como ligando inhibidor de los co-receptores LRP5/6 bloqueando su interacción con Wnt o puede formar un complejo terciario con LRP5/6 y otro receptor de alta afinidad por Dkks llamado Kremen (Krm1/2) que induce la remoción por endocitosis de LRP5/6 de la membrana plasmática, de ambas formas causa la degradación de  $\beta$ -catenina (Pendás-Franco et al., 2008; Watany, 2017) (**Figura II.3**).

En un modelo celular de oncogénesis viral, Angelova y colaboradores reportaron que la expresión estable del vGPCR activa la vía canónica Wnt/ $\beta$ -catenina e induce la expresión de ciclina D1, c-myc, Mmp-9 y VEGFA en células endoteliales humanas HUVEC (Angelova et al., 2014). Como la vía Wnt/ $\beta$ -catenina es activada en células endoteliales por la expresión de vGPCR, se investigó si en las células endoteliales murinas que expresan vGPCR existe una regulación de esta vía por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 como parte del mecanismo de acción antiproliferativo.

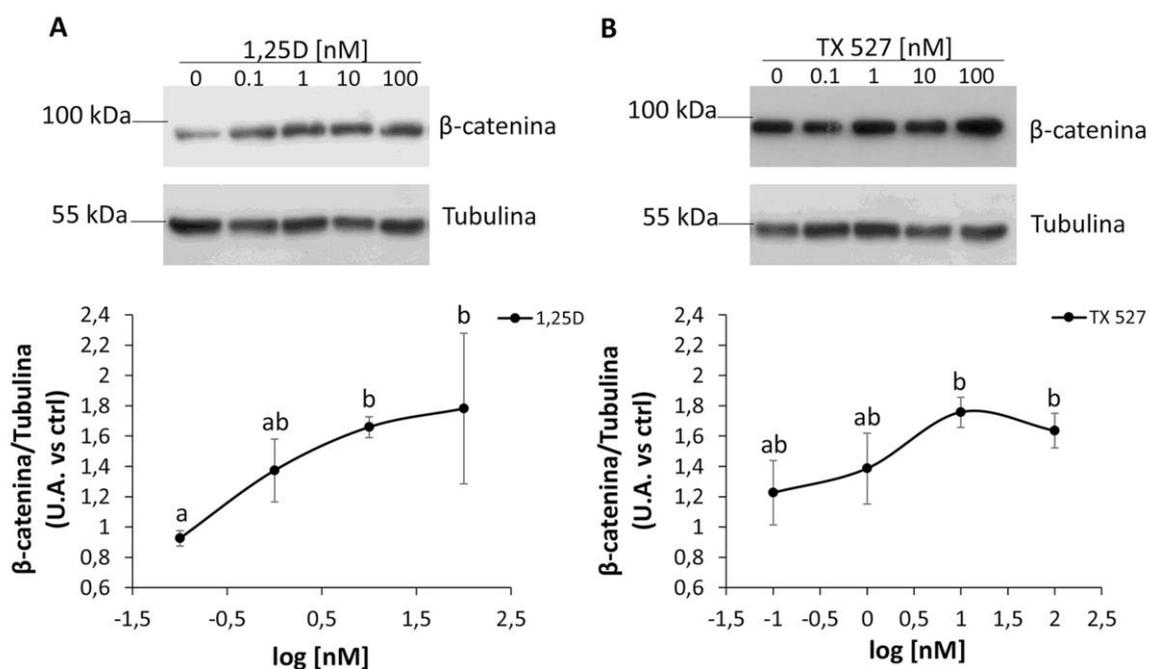


**Figura II.3. Inhibición de la vía canónica por Dkk-1.** En condiciones fisiológicas, la  $\beta$ -catenina citoplasmática está ligada al complejo de destrucción, que consiste en APC, AXINA y GSK3 $\beta$ . Luego de que CK-1 fosforila el residuo Ser45,  $\beta$ -catenina es fosforilada en Thr41, Ser37 y Ser33 por GSK-3 $\beta$ . Por lo que fosforilada es destruida en el proteasoma. Así el nivel citoplasmático de  $\beta$ -catenina se mantiene bajo en ausencia de ligando Wnt. Si  $\beta$ -catenina no se acumula en el núcleo, el complejo TCF/LEF no estimula los genes diana. En presencia de ligando Wnt, Dkk-1 mantiene los niveles bajos de  $\beta$ -catenina inhibiendo la vía por unión al mismo (Modificado de A. Vallée, et al, 2019).

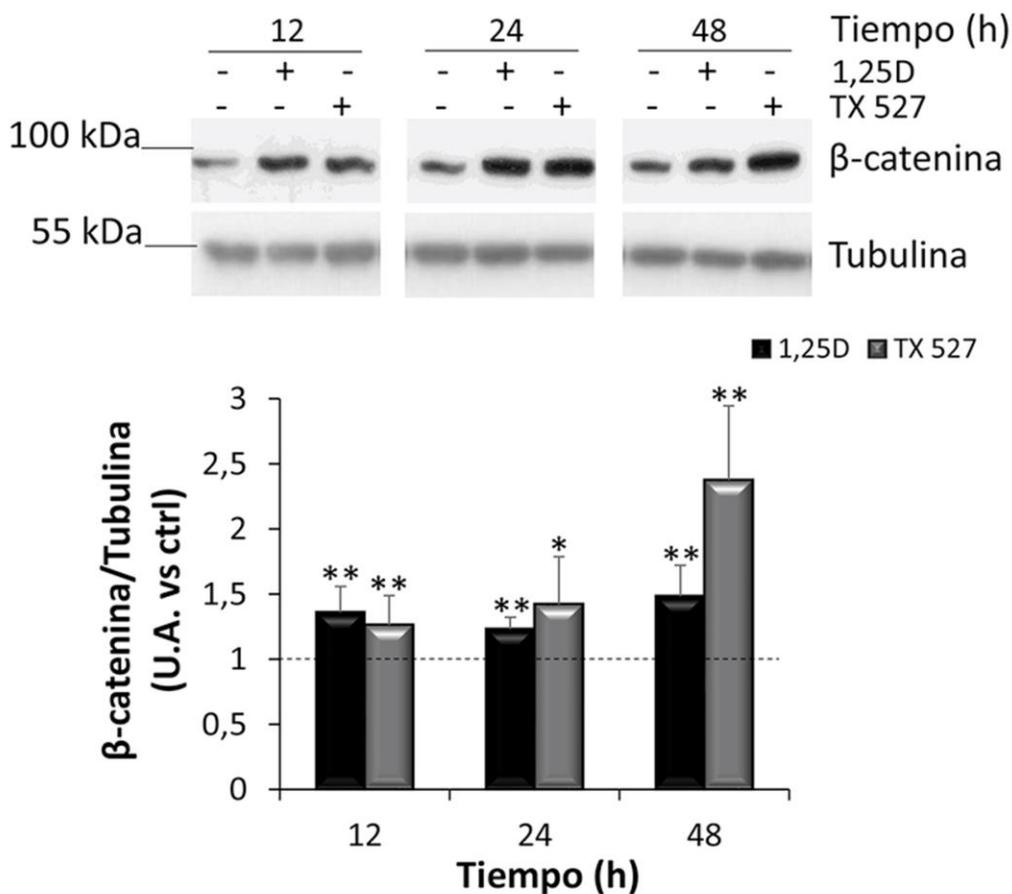
# Resultados

## **El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o TX 527 aumentan la expresión de $\beta$ -catenina**

El efecto del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en la regulación de la cascada Wnt/ $\beta$ -catenina ha sido estudiado en condiciones normales y patológicas, ejerciendo diferentes acciones como la de antagonizar la señalización de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en la progresión tumoral del cáncer de mama (Johnson et al., 2015), promover la diferenciación cardíaca (Hlaing et al., 2014) y favorecer la diferenciación y la supervivencia de osteoblastos (Xiong et al., 2017). Como se mencionó previamente la expresión estable de vGPCR en células endoteliales activa la vía canónica Wnt/ $\beta$ -catenina (Angelova et al., 2014). Por lo que en primer lugar se investigó si los agonistas del VDR regulan los niveles proteicos de  $\beta$ -catenina. Las células vGPCR se sembraron, se mantuvieron en cultivo durante 24 horas y luego por el mismo periodo de tiempo se privaron de suero para la sincronización del ciclo celular. Las células se trataron con diferentes concentraciones (0,1-100 nM) de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 horas para determinar el mayor efecto. Luego, se realizaron tratamientos con ambos metabolitos o su vehículo durante diferentes tiempos (12-48 h) a la concentración previamente determinada. Los niveles de  $\beta$ -catenina se analizaron a partir de lisados celulares por Western blot. Como se muestra en las **Figuras II.4 y II.5** los niveles proteicos de  $\beta$ -catenina aumentaron en forma significativa dependiendo de la concentración de los agonistas y del tiempo de tratamiento.



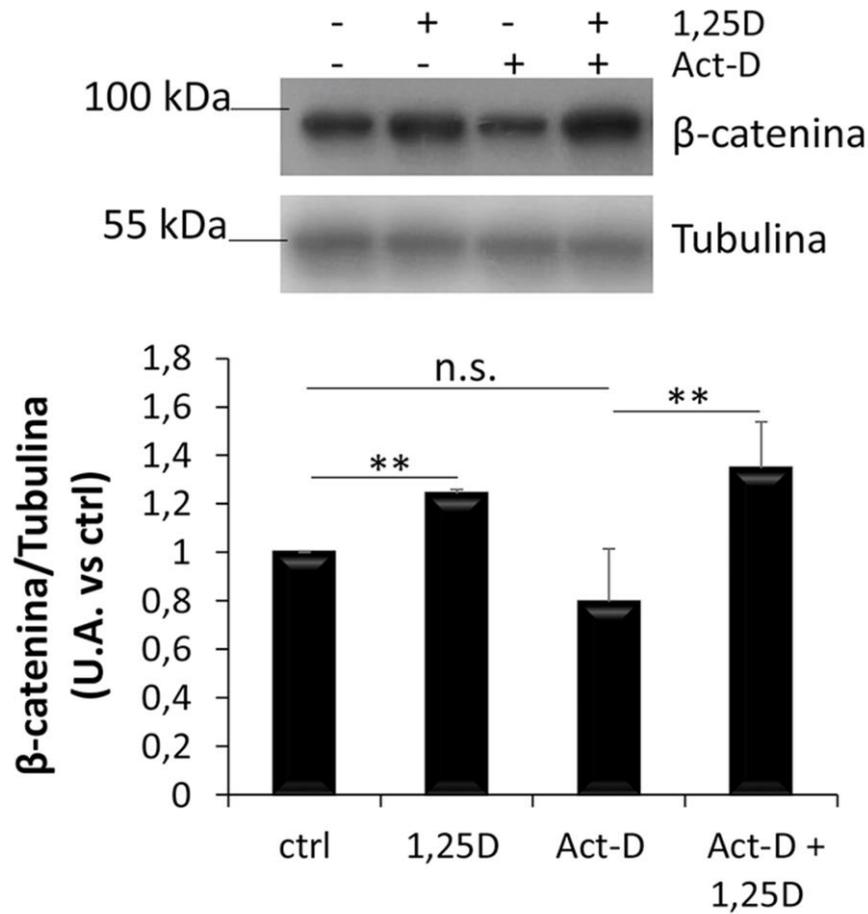
**Figura II.4. Aumento de  $\beta$ -catenina en función de la concentración de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527.** Las células vGPCR se trataron con concentraciones crecientes de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) (A) o TX 527 (B) de 0,1-100 nM o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 h. Los niveles proteicos de  $\beta$ -catenina se analizaron por Western blot. Se muestran blots representativos y en el gráfico de línea en formato log concentración/respuesta la cuantificación de las bandas de  $\beta$ -catenina, normalizadas con Tubulina. El análisis estadístico de los resultados se realizó por ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni, en donde las diferencias significativas se representan con distintas letras ( $p < 0,01$ ;  $n \geq 3$ ).



**Figura II.5.** Expresión de  $\beta$ -catenina en función del tiempo de tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527. 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) por 12-48 h. Los niveles proteicos de  $\beta$ -catenina se analizaron por Western blot. Se muestran blots representativos y en el gráfico de barras la cuantificación de las bandas de  $\beta$ -catenina, normalizadas con Tubulina. El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba t de Student (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0,01$ ;  $n = 5$ ).

Para determinar la naturaleza del aumento de  $\beta$ -catenina, se bloqueó la transcripción con Actinomicina-D (Act-D, 10  $\mu\text{g/L}$ ) o en combinación con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (10 nM) o en presencia del vehículo por 24 horas. El análisis de los resultados luego de la cuantificación de los inmunoblots muestra que en estas condiciones los niveles proteicos de  $\beta$ -catenina disminuyeron ligeramente en presencia de Act-D, mientras que en combinación con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aumentaron

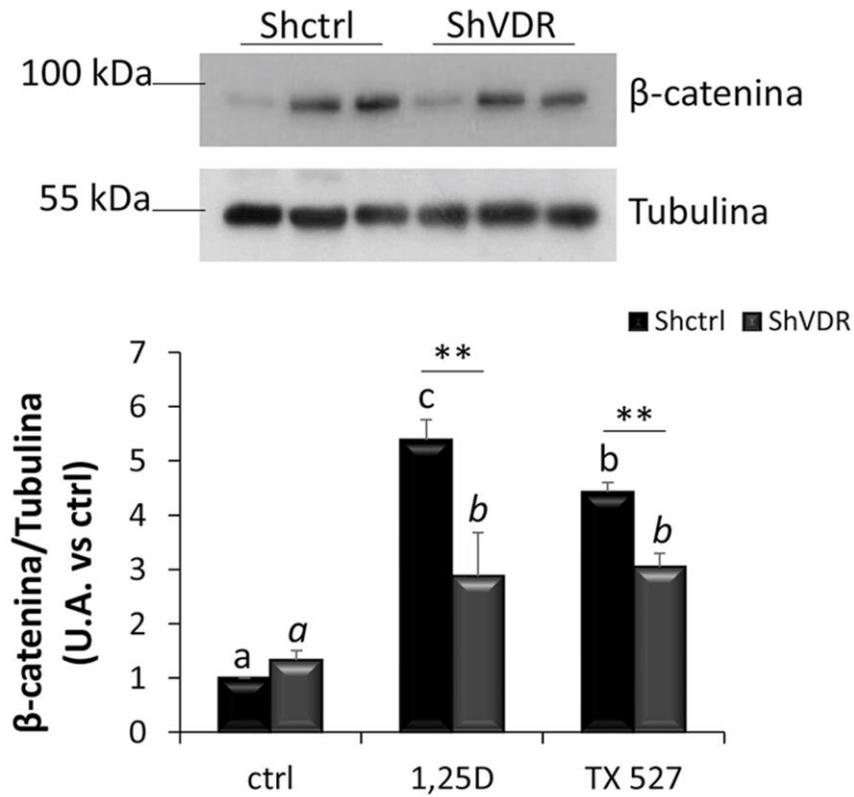
significativamente, este efecto es comparable con el tratamiento de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  solo (**Figura II.6**).



**Figura II.6. Regulación de  $\beta$ -catenina por Actinomicina-D y  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Las células vGPCR se trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o Actinomicina-D (Act-D, 10  $\mu\text{g/L}$ ) o vehículo (0,01% de etanol) por 24 h. Los niveles proteicos de  $\beta$ -catenina se analizaron por Western blot. Se muestran blots representativos y en el gráfico de barras la cuantificación de las bandas de  $\beta$ -catenina, normalizadas con Tubulina. El análisis estadístico de los resultados en tres grupos (ctrl vs 1,25D, ctrl vs Act-D o Act-D vs 1,25D) se realizó por la prueba t de Student (\*\* $p < 0,01$ ;  $n = 3$ ).

## **El aumento en los niveles de $\beta$ -catenina inducidos por $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o TX 527 dependen de la expresión del VDR**

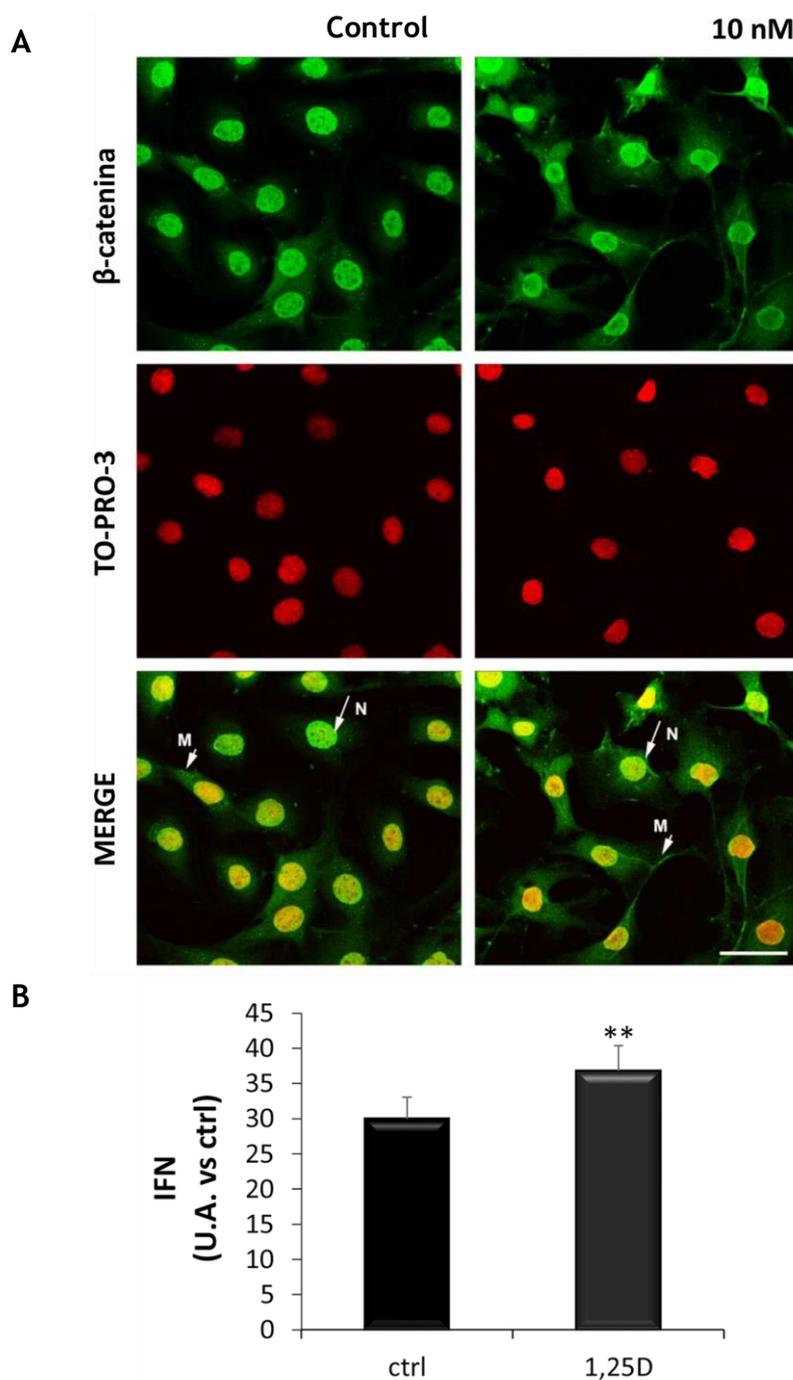
Anteriormente, se demostró en nuestro grupo que el tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 induce arresto del ciclo celular con la consecuente apoptosis en células vGPCR por un mecanismo que involucra el VDR (González Pardo et al., 2014, 2010). Por tal motivo, se examinó si la expresión del VDR participa en el aumento de los niveles proteicos de  $\beta$ -catenina usando una línea estable con el VDR silenciado (-shVDR) o control (-shctrl). Para ello, las células vGPCR-shVDR, y vGPCR-shctrl se sembraron y trataron con 10 nM de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) por 48 horas. Los lisados se prepararon para el análisis por Western blot con los anticuerpos VDR,  $\beta$ -catenina y tubulina. El silenciamiento del VDR fue monitoreado como se reportó anteriormente (González Pardo et al., 2014, 2010). Los resultados en la **Figura II.7** indican que los niveles de  $\beta$ -catenina aumentaron significativamente con el tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527 en la línea control (vGPCR-shctrl). Sin embargo, cuando el VDR se encuentra silenciado (vGPCR-shVDR), el aumento fue significativamente menor al comparar las condiciones tratadas de vGPCR-shctrl/shVDR, lo que sugiere que el aumento de  $\beta$ -catenina depende de la expresión de VDR.



**Figura II.7. Dependencia del VDR en la inducción de  $\beta$ -catenina por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y TX 527.** Las líneas vGPCR-shctrl (shctrl) y vGPCR-shVDR (shVDR) fueron cultivadas y tratadas 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 h. Se analizaron los niveles proteicos de  $\beta$ -catenina. Se muestra un blot representativo y la cuantificación 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  $p < 0,01$  para el grupo vGPCR-shctrl y con un  $p < 0,05$  para vGPCR-shVDR. Diferencias entre los tratamientos de vGPCR-shctrl y vGPCR-shVDR se analizaron por la prueba  $t$  de Student (\*\* $p < 0.01$ ) ( $n = 3$ ).

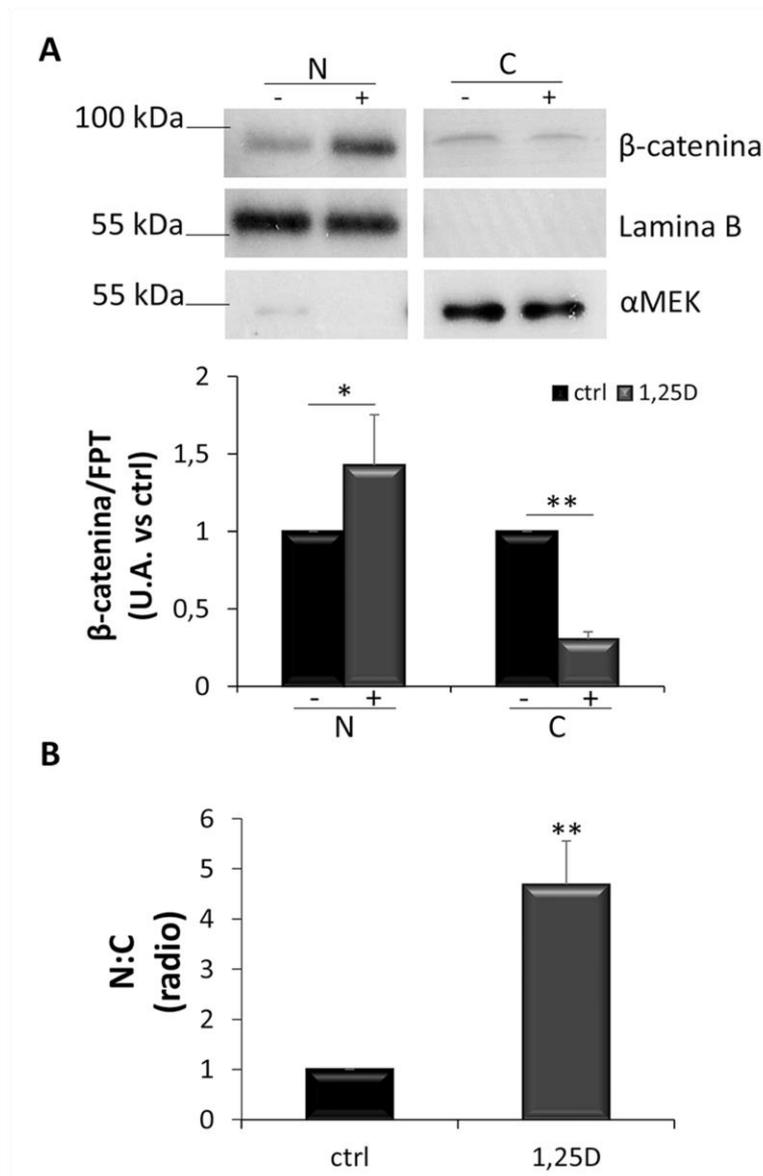
## **$\beta$ -catenina se acumula en el núcleo y en la membrana luego del tratamiento con $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$**

Anteriormente se mencionó como varía la localización intracelular de  $\beta$ -catenina dependiendo del estado de activación de la vía Wnt. Su acumulación en el núcleo está asociada al aumento de la proliferación celular en tumores relacionados con el sistema endocrino, el tracto digestivo y glándulas suprarrenales, contribuyendo a la tumorigénesis con un mal pronóstico (Semba et al., 2000). Asimismo, el incremento de los niveles de  $\beta$ -catenina acompañado de la disminución de la asociación E-cadherina/ $\beta$ -catenina conlleva también a la translocación al núcleo, ya que en condiciones normales la expresión de  $\beta$ -catenina es inducida para establecer las adhesiones célula-célula y mantener el fenotipo epitelial (Tafrihi and Nakhaei Sistani, 2017). A raíz de estos precedentes en este trabajo de tesis se investigó la localización de  $\beta$ -catenina en células vGPCR por dos enfoques diferentes. Las células vGPCR se cultivaron como se mencionó previamente, seguidamente se realizó el tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  10 nM o vehículo (0,01% de etanol) por 48 horas. Primero se investigó la localización de  $\beta$ -catenina por microscopia confocal como se describió en los métodos. Como se indica en el panel izquierdo de la **Figura II.8A**  $\beta$ -catenina se observó mayormente en el núcleo, en el citosol y en menor medida en la membrana plasmática de las células en la condición control (vehículo), mientras que  $\beta$ -catenina se encontró más concentrada en el núcleo y en la membrana plasmática luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  como se indica con flechas en las imágenes del panel derecho de la **Figura II.8A**. Para corroborar la acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina, se cuantificó la intensidad de fluorescencia nuclear (**Figura II.8B**).



**Figura II.8.** El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induce la translocación de  $\beta$ -catenina al núcleo y a la membrana plasmática. Las células vGPCR se sembraron en cubreobjetos y se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) 10 nM o vehículo (0,01% de etanol) por 24 h. Las micrografías se obtuvieron con microscopía confocal y son representativas de dos experimentos. Las flechas indican la localización de  $\beta$ -catenina en el núcleo y en la membrana plasmática. Magnificación total 630x, barra = 50  $\mu\text{m}$  (A). Se cuantificó la Intensidad de Fluorescencia Nuclear (IFN) de dos experimentos (media  $\pm$  SEM) y se analizó por la prueba t de Student (\*\* $p < 0.01$ ) (B).

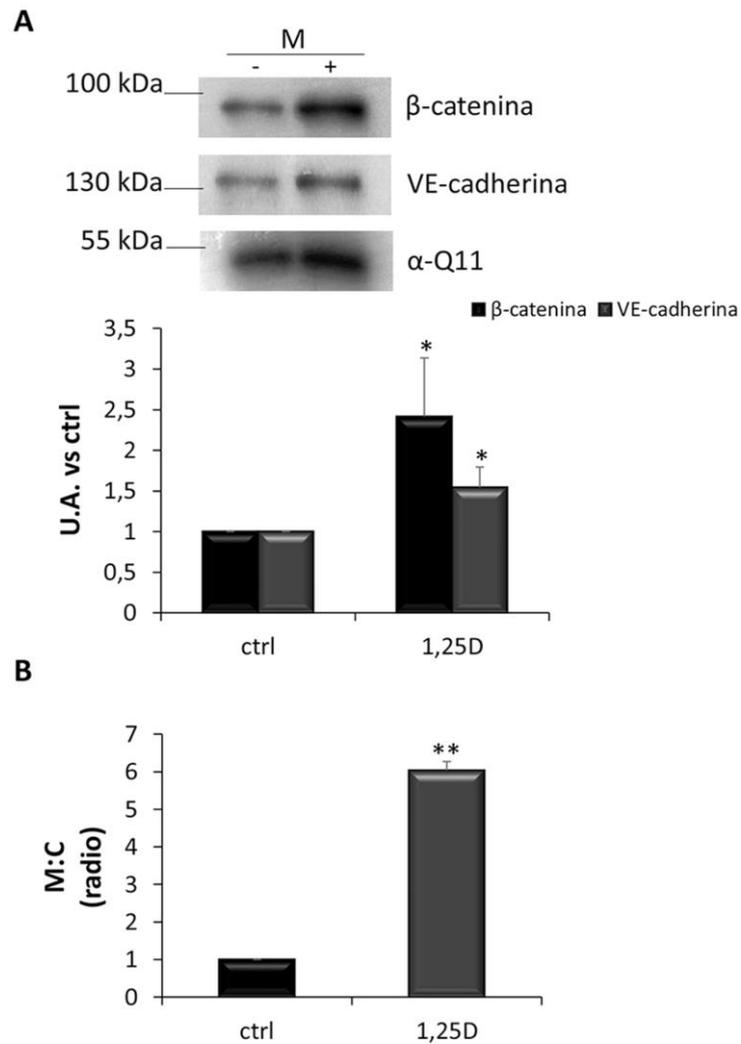
En segundo lugar, se determinaron los niveles proteicos de  $\beta$ -catenina en cada compartimento celular por análisis de Western blot, utilizando fracciones enriquecidas de núcleo, citosol y membrana. Como se describió en los métodos las células se colectaron en buffer TES y se sometieron a centrifugación diferencial para obtener las fracciones celulares enriquecidas. Se realizó el análisis por Western blot con anticuerpo anti- $\beta$ -catenina y con anticuerpos Lamin B,  $\alpha$ -MEK and  $\alpha$ -Q11 como marcadores de núcleo, citosol y membrana plasmática respectivamente. Los resultados en las **Figuras II.9A** y **II.10A** confirman que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aumenta significativamente  $\beta$ -catenina en el núcleo y en la membrana. Para determinar si  $\beta$ -catenina se desplaza de un compartimento a otro, se calculó el radio entre el núcleo y el citosol, y entre la membrana y el citosol. Como indican los radios en las **Figuras II.9B** y **II.10B** el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  indujo la translocación al núcleo y a la membrana de  $\beta$ -catenina.



**Figura II.9. El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induce la acumulación de  $\beta$ -catenina en núcleo.** Las células vGPCR se cultivaron y se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) 10 nM o vehículo (0,01% de etanol) por 48 h. Luego de colectar los lisados en buffer TES, por centrifugación diferencial se obtuvieron las fracciones enriquecidas del núcleo y del citosol. Se analizaron por Western blot los niveles de  $\beta$ -catenina y se evaluó la pureza de las fracciones a través de marcadores específicos de núcleo y citosol, Lamin B y  $\alpha$ -MEK respectivamente. Se muestran blots representativos y la cuantificación por ImageJ en gráficos de barras de  $\beta$ -catenina con respecto a la Fracción Proteica Total (FPT) (A). Radios Núcleo:Citosol (N:C) (B). La significancia estadística se evaluó por la prueba t de Student (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ) ( $n = 5$ ).

## El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aumenta VE-cadherina en la membrana plasmática

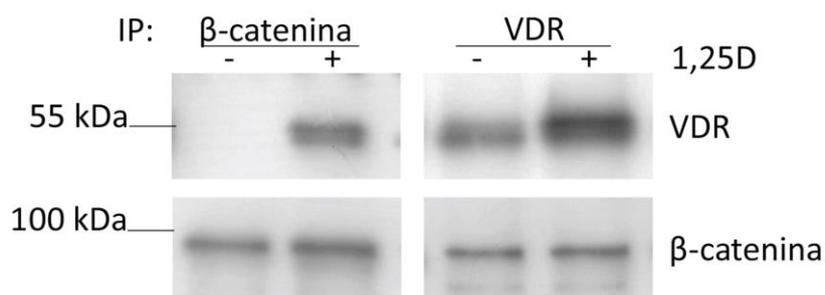
La cadherina E es una proteína transmembrana encargada de conservar las uniones adherentes intercelulares con un rol principal en el mantenimiento del fenotipo adhesivo y polarizado de las células epiteliales (Takeichi, 1995). Por medio de su dominio intracelular interactúa con  $\beta$ -catenina, esta con  $\alpha$ -catenina y ambas con  $\alpha$ -actina conectando así la unión adherente con el citoesqueleto (Tafrihi and Nakhaei Sistani, 2017). Existen evidencias de que el tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  favorece la expresión de E-cadherina promocionando un cambio fenotípico de células malignas a un tipo epitelial normal en una línea celular derivada de tumor mamario de rata (Rama 37 cells) (Xu et al., 2009) y en células de carcinoma de colon (Pálmer et al., 2001). Debido a que E-cadherina induce el cambio fenotípico desde la malignidad a un epitelio normal (Pálmer et al., 2001), se investigó si el aumento de  $\beta$ -catenina por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en la membrana plasmática se correlaciona con el aumento de la expresión de VE-cadherina. Por lo tanto, las células vGPCR se sembraron como se describió antes y trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o vehículo (0,01% de etanol) por 48 horas. Las células se colectaron en buffer TES y se sometieron a centrifugación diferencial para obtener la fracción de membrana enriquecida. Se realizaron análisis por Western blot con anticuerpos anti- $\beta$ -catenina y anti-VE-cadherina, el anticuerpo  $\alpha$ -Q11 se utilizó como marcador específico de membrana para evaluar la pureza de la fracción obtenida. Los resultados de la **Figura II.10A** indican que la proteína VE-cadherina está presente en la fracción microsomal y que aumentó significativamente luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  como  $\beta$ -catenina.



**Figura II.10.  $\beta$ -catenina y VE-cadherina aumentan en la membrana plasmática por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Las células vGPCR se cultivaron y se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) 10 nM o vehículo (0,01% de etanol) por 48 h. Luego de colectar los lisados en buffer TES, por centrifugación diferencial se obtuvo la fracción microsomal. Se analizaron por Western blot los niveles de  $\beta$ -catenina y VE-cadherina, se utilizó  $\alpha$ -Q11 como marcador específico de membrana para evaluar la pureza de la fracción microsomal. Se muestran blots representativos y la cuantificación por ImageJ en gráficos de barras (A). Radios Membrana:Citosol (M:C) (B). La significancia estadística se evaluó por la prueba t de Student (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ) ( $n = 3$ ).

## El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce la asociación de $\beta$ -catenina con el VDR

Existen reportes que indican la promoción por parte de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  de una interacción directa entre VDR y  $\beta$ -catenina que resulta en una disminución de los complejos TCF/ $\beta$ -catenina por acumulación nuclear no transcripcional en cáncer de colon (Larriba et al., 2013, 2011; Pálmer et al., 2001). La interacción entre el dominio AF-2 del VDR, que sufre un cambio conformacional por unión del ligando, y el extremo C-terminal de  $\beta$ -catenina logra reprimir la activación de la señalización oncogénica de  $\beta$ -catenina por acción de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  según estudios de Shah y colaboradores en líneas celulares de cáncer de colon y mama y embrionaria de riñón (Shah et al., 2006). Sin embargo, se desconoce la existencia de esta interacción en otros tipos de células neoplásicas. Para elucidar en mayor profundidad el efecto del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, se investigó la posible asociación del VDR con  $\beta$ -catenina en células vGPCR. Para ello, las células vGPCR se cultivaron como se describió anteriormente y se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o vehículo (0,01% de etanol). Luego, las células se colectaron en buffer de co-inmunoprecipitación (Co-IP) y se realizó la inmunoprecipitación de  $\beta$ -catenina o de VDR como se describió en Métodos. Posteriormente, se analizó la presencia del VDR en los inmunoprecipitados de  $\beta$ -catenina o viceversa por Western blot. Como se muestra en la **Figura II.11**, el VDR se detectó en los inmunoprecipitados de  $\beta$ -catenina y cuando se realizó la inmunoprecipitación reversa con VDR,  $\beta$ -catenina se reveló en los inmunoprecipitados de VDR, revelando la asociación entre VDR y  $\beta$ -catenina inducida por el tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

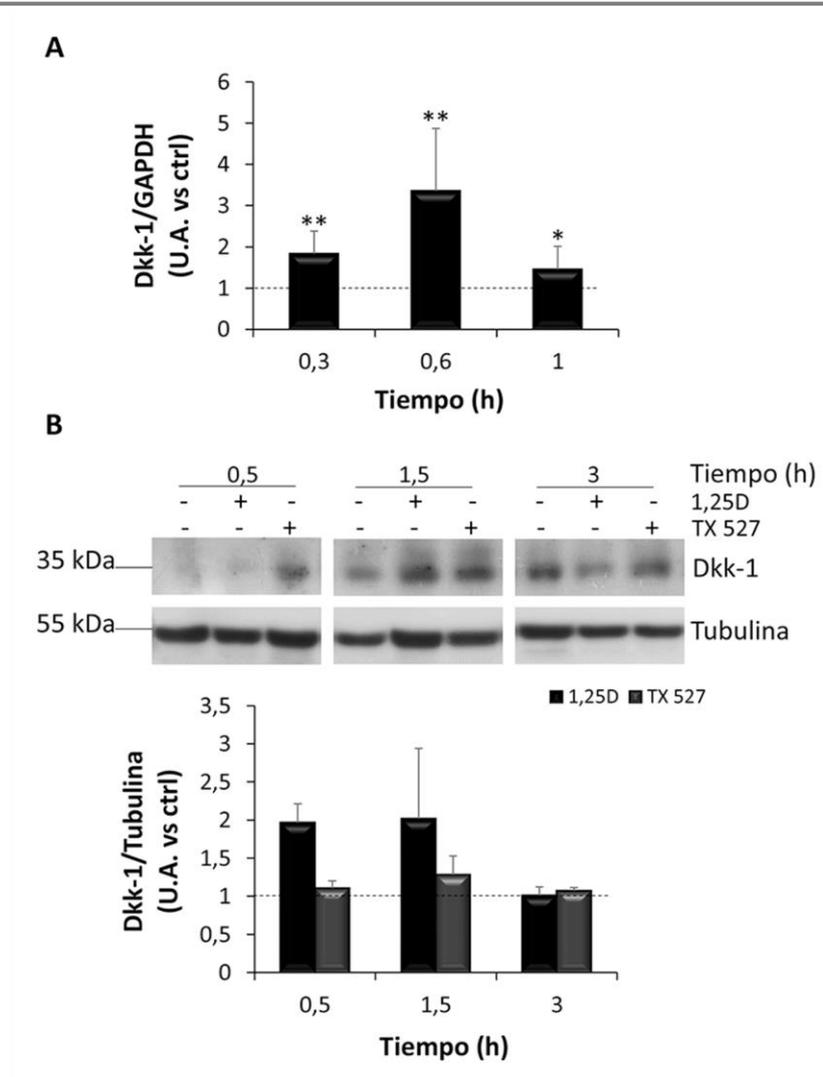


**Figura II.11. Asociación  $\beta$ -catenina/VDR.** Las células vGPCR se cultivaron y se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) 10 nM o vehículo (0,01% de etanol) por 24 h. Se colectaron los lisados en buffer Co-IP, y las muestras de las condiciones control (-) y tratado (+) se incubaron con anticuerpo anti-VDR (rata) o anti- $\beta$ -catenina (conejo) por 5 h en agitación fría, seguido de la incubación con la proteína A/G toda la noche. Se analizaron por Western blot con anticuerpos anti-VDR (conejo) y anti- $\beta$ -catenina (conejo). Se muestran blots representativos de tres experimentos independientes.

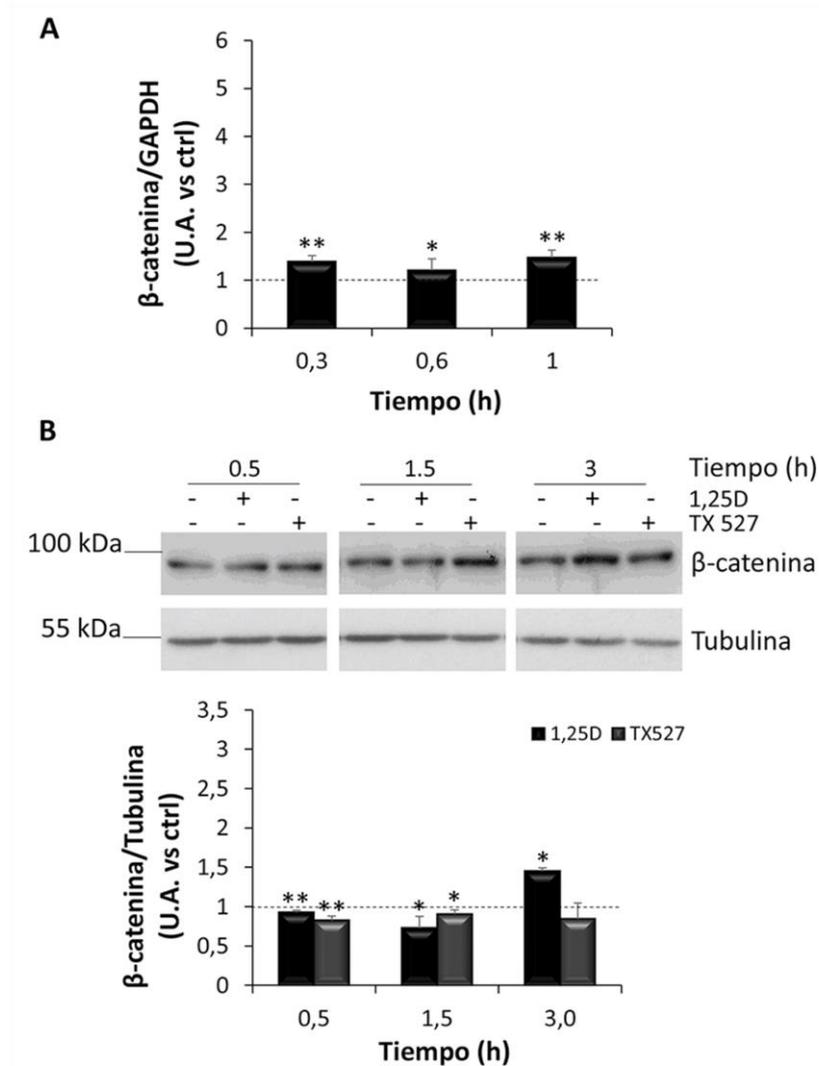
### Dkk-1 aumenta su expresión tempranamente por $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

La familia de genes Dickkopf (Dkk) codifica proteínas que al ser secretadas se unen a LRP5/6 actuando como un inhibidor extracelular de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina (Mao et al., 2002). Hay evidencias de que el aumento del ARNm y el nivel proteico de Dkk-1 por parte de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en células de cáncer de colon se encuentra asociado a la inducción de un fenotipo epitelial adhesivo (Aguilera et al., 2007). Como consecuencia, se analizaron los cambios en el ARNm de Dkk-1 y de  $\beta$ -catenina. Las células vGPCR se cultivaron y se incubaron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o vehículo (0,01% de etanol) por 0,3-1 horas luego de la sincronización con medio sin suero. Se aisló el ARN total de la condición control (vehículo) y tratadas. Luego, el ARN se retrotranscribió y el ARNm de Dkk-1 y  $\beta$ -catenina se detectó por qRT-PCR usando *primers* específicos. Para normalizar la expresión génica se utilizó GAPDH. Los resultados en las **Figuras II.12A** y **II.13A** revelan que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aumentó

significativamente los niveles de ARNm de Dkk-1 durante tratamientos menores de 1 hora, mientras que  $\beta$ -catenina mostró un leve aumento, aunque significativo (alrededor de un 20% con respecto al control). Luego para evaluar si estas variaciones en el ARNm se reflejan en los niveles proteicos, las células se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , TX 527 o vehículo (0,01% de etanol) en estudios tiempo respuesta (0,5-3 h). Las proteínas de interés se analizaron a partir de lisados celulares por Western blot. Las **Figuras II.12B** y **II.13B** muestran que al tiempo que los niveles proteicos de Dkk-1 aumentaron significativamente, los niveles de  $\beta$ -catenina decrecieron significativamente por el tratamiento con ambos agonistas tempranamente en el rango de tiempo 0,5-1,5 horas.



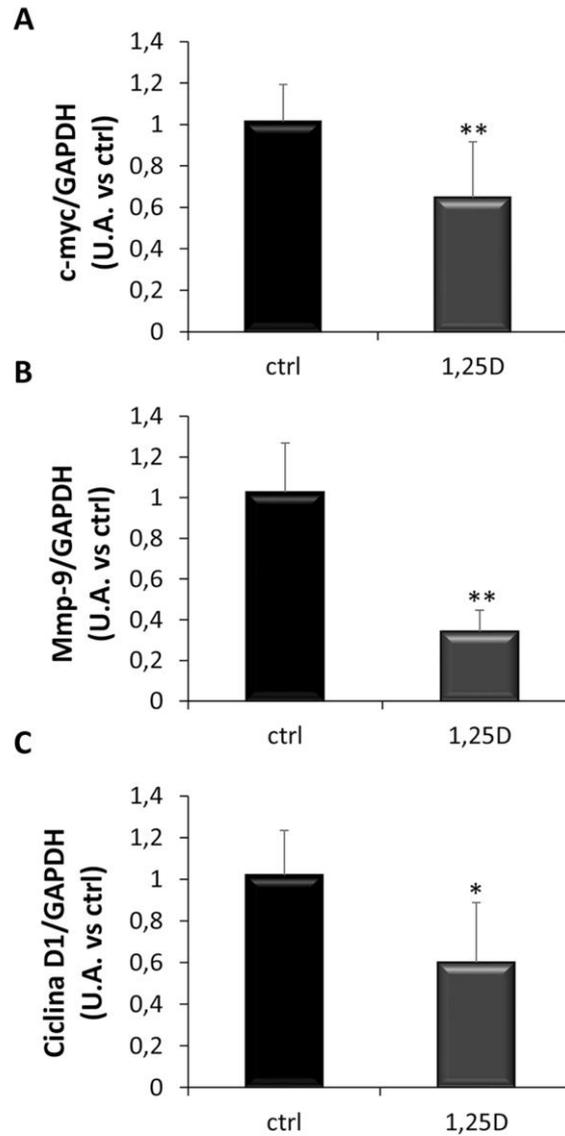
**Figura II.12. Aumento temprano de Dkk-1 luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527.** Las células vGPCR se cultivaron y se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o vehículo (0,01% de etanol) por 0,1-3 h o con TX 527 por 0,5-3 h a una concentración de 10 nM para ambos agonistas de VDR. Los niveles del mensajero de Dkk-1 se analizaron por qRT-PCR, se muestra el resultado de tres experimentos independientes. Los datos están expresados como el radio entre las condiciones tratadas y los controles normalizados con el ARNm de GAPDH. El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba t de Student (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ) (A). Los niveles proteicos de Dkk-1 se analizaron por Western blot. Se muestran blots representativos de al menos dos experimentos independientes y la cuantificación de las bandas de Dkk-1, normalizadas con Tubulina, se presentan en gráficos de barras (B).



**Figura II.13. Disminución temprana de  $\beta$ -catenina luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o TX 527.** Las células vGPCR se cultivaron y se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o vehículo (0,01% de etanol) por 0,1-3 h o también con TX 527 por 0,5-3 h a una concentración de 10 nM para ambos agonistas de VDR. Los niveles del mensajero de  $\beta$ -catenina se analizaron por qRT-PCR, se muestra el resultado de tres experimentos independientes. Los datos están expresados como el radio entre las condiciones tratadas y los controles normalizados con el ARNm de GAPDH (A). Los niveles proteicos de  $\beta$ -catenina se analizaron por Western blot. Se muestran blots representativos de al menos dos experimentos independientes y la cuantificación de las bandas de  $\beta$ -catenina, normalizadas con Tubulina, se presentan en gráficos de barras (B). El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba t de Student (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

## **El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regula negativamente la transcripción de genes dependientes de $\beta$ -catenina**

A priori se señaló que la acumulación de  $\beta$ -catenina estable e hipofosforilación en el citoplasma promueve su translocación al núcleo, donde por unión a TCF/LEF activa la transcripción de más de 50 genes diana involucrados en el mantenimiento celular, la proliferación y la supervivencia como ciclina D1, c-myc, VEGFA, MMP-2 y MMP-9 (Clevers and Nusse, 2012). Su expresión aumenta significativamente en células vGPCR endoteliales humanas (HUVEC) (Angelova et al., 2014) los cuales están implicados en la angiogénesis y en el desarrollo del sarcoma de Kaposi (Arasteh and Hannah, 2000; Hong et al., 2004; Qian et al., 2007). Existe evidencia de que la interacción de VDR/ $\beta$ -catenina reduce la cantidad de  $\beta$ -catenina unida a TCF, inhibiendo así la expresión de los genes blanco del complejo TCF/ $\beta$ -catenina como c-MYC en células de cáncer humanas (Larriba et al., 2011, 2007; Pálmer et al., 2001). Dados estos antecedentes se investigó la expresión del ARNm de c-myc, Mmp-9 y ciclina D1 en células vGPCR tratadas con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o vehículo (0,01% etanol) por 48 horas. El ARN total se aisló y retrotranscribió. La expresión del ARNm de c-myc, Mmp-9 y ciclina D1 se analizó por qRT-PCR usando *primers* específicos, y se empleó GAPDH para normalizar su expresión. Como se puede observar en la **Figura II.14**, el ARNm de c-myc, Mmp-9 y ciclina D1 disminuyó significativamente por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , luego de 48 horas de tratamiento sugiriendo la disminución de la actividad de  $\beta$ -catenina como factor de transcripción.



**Figura II.14.** El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  disminuye la expresión de *c-myc*, *Mmp-9* y *ciclina D1*. Las células vGPCR se cultivaron y se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o vehículo (0,01% de etanol) por 48 h a una concentración de 10 nM por 48 h. El ARN total se extrajo y se retrotranscribió a ADNc. Los niveles del mensajero de *c-myc*, *Mmp-9* y *ciclina D1* se analizaron por qRT-PCR, se muestra el resultado de al menos tres experimentos independientes. Los datos están expresados como el radio entre las condiciones tratadas y los controles normalizados con GAPDH. El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba *t* de Student (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

# Discusión

La cascada de transducción de señales Wnt es el principal regulador del desarrollo, por lo tanto, alteraciones en esta vía causan múltiples patologías relacionadas con el crecimiento y el cáncer. Mutaciones de sus componentes como los supresores tumorales APC y AXINA son frecuentemente observadas en varios tipos de carcinomas (Nusse and Clevers, 2017). La desregulación de la vía Wnt no solo afecta al epitelio, sino que también contribuye a la formación de tumores malignos hematológicos. Los progenitores de granulocitos y macrófagos de pacientes con leucemia mielógena crónica y células de crisis blástica de pacientes resistentes a la terapia muestran una señalización activa de Wnt con una acumulación de  $\beta$ -catenina nuclear (Jamieson et al., 2004). La interacción entre el ligando Wnt y su receptor en la membrana se comunica con sus genes blanco por la translocación de  $\beta$ -catenina, componente central de la cascada canónica Wnt. Esta se dirige al núcleo donde se asocia con proteínas de unión al ADN que reconocen motivos de secuencia específicos en promotores y potenciadores (Cadigan and Waterman, 2012).

Las mutaciones en la vía Wnt se observan frecuentemente en cáncer, sobre todo en tejidos que dependen de este mecanismo para autorrenovación o reparación celular (Clevers and Nusse, 2012). Existen evidencias de mutaciones inactivantes de APC en cáncer colorrectal que lleva a una estabilización inapropiada de  $\beta$ -catenina y a la formación de complejos constitutivos entre  $\beta$ -catenina y TCF4, miembro intestinal de la familia TCF (Korinek et al., 1997), mutaciones de AXINA con pérdida de su función en carcinomas hepatocelulares (Abitbol et al., 2018) y mutaciones oncogénicas de  $\beta$ -catenina en diversos tipos de tumores sólidos (Reya and Clevers, 2005). Estas mutaciones de diversa naturaleza resultan en la estabilización de  $\beta$ -catenina y la

activación continua del plan transcripcional de Wnt, aun en ausencia de ligando. Sin embargo, muchos tipos de canceres no contienen estas mutaciones (Rimm et al., 1999; Satoh et al., 2000), sino otros factores como oncogenes virales capaces de manipular la vía Wnt. El virus de la hepatitis C (VHC) activa la cascada Wnt/ $\beta$ -catenina en el proceso de transformación maligna de los hepatocitos que genera carcinoma hepatocelular (Higgs et al., 2013). La proteína latente (LMP2A) que codifica el virus Epstein Barr (EBV) provoca la estabilización de  $\beta$ -catenina por activación de PI3K/Akt e inactivación de GSK-3 $\beta$  (Morrison et al., 2003). La asociación entre el herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi y la vía Wnt/ $\beta$ -catenina fue observada en 2003 por Fujimuro y colaboradores en células B de linfoma primario de cavidades donde, para asegurar la replicación y la supervivencia en las células huésped hay una sobreexpresión de  $\beta$ -catenina que inducida por proteínas de fase latente como LANA (antígeno de latencia asociado al núcleo) (Fujimuro et al., 2003). Esta se une a GSK-3 $\beta$  y promueve su acumulación nuclear, reduciendo su disponibilidad en el citosol para participar del complejo de destrucción causando que  $\beta$ -catenina aumente (Zwezdaryk et al., 2016). En células endoteliales con una expresión no-lítica del vGPCR, por inserto de un vector retroviral,  $\beta$ -catenina se acumula en el núcleo estableciendo una de las causas del potencial angiogénico de vGPCR (Angelova et al., 2014).

La señalización vitamina D-VDR contribuye a controlar la proliferación e inmunosupresión inducida por alteraciones de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en melanoma, disminuyendo la metástasis y reforzando la respuesta inmune (Muralidhar et al., 2019). Existen varios datos de entrecruzamiento entre los receptores nucleares de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina, particularmente la interacción VDR/ $\beta$ -catenina (Beildeck et al., 2011; Pálmer et al., 2001; Shah et al., 2006). La evidencia

muestra que la vía Wnt/ $\beta$ -catenina está anormalmente activada en varios tipos de tumores y  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  antagoniza esta cascada. La asociación VDR/ $\beta$ -catenina disminuye la cantidad de  $\beta$ -catenina que se une a TCF, lo que imposibilita su actividad transcripcional en genes diana como c-MYC, TCF1, LEF1 y AXINA2 en células de cáncer de colon humano (Larriba et al., 2011, 2007). En células de cáncer de colon VDR negativas (SW480-R and SW620) o en células VDR- positivas (SW480-ADH), donde la expresión del VDR fue reprimida por sobreexpresión de SNAIL1 o SNAIL2 o por tecnología de shARN, los mecanismos antagonistas entre  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y la vía Wnt son dependientes del VDR (Larriba et al., 2009; Pálmer et al., 2004). En este trabajo de tesis se observó, contrario a lo esperado, que los niveles proteicos de  $\beta$ -catenina aumentaron dependiendo de la concentración y del tiempo, durante el tratamiento con agonistas del VDR en células vGPCR, a su vez este mecanismo resultó ser dependiente de la expresión del VDR. Como se mencionó previamente, los genes diana de Wnt tienen una participación activa en la proliferación. c-myc es un oncogén regulador de la progresión del ciclo celular y su expresión usualmente aumenta o es desregulada en cáncer humano (Morrish et al., 2009). Dentro de la familia de las ciclinas, la ciclina D1 es fundamental para conducir la progresión del ciclo celular desde G<sub>1</sub> a S. El promotor del gen CCND1 que la codifica es una de los objetivos del complejo  $\beta$ -catenina/LEF-1 (Qie and Diehl, 2016), necesario para el desarrollo del cáncer de colon (Tetsu and McCormick, 1999). Los resultados en este trabajo de tesis indican que si bien luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  los niveles de  $\beta$ -catenina aumentaron, ésta no solo se localizó en la membrana plasmática sino también en el núcleo, pero asociándose al VDR. Lo que sugiere como consecuencia la disminución de su actividad transcripcional en los genes diana de Wnt, ya que c-myc, Mmp-9 y ciclina D1 disminuyeron su expresión con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

Por otro lado, E-cadherina compone las uniones adherentes y juega un rol principal manteniendo el fenotipo adhesivo de células epiteliales (Fagotto and Gumbiner, 1996). La pérdida de su expresión involucra la obtención de un fenotipo invasivo (Christofori and Semb, 1999). Hay evidencias de que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aumenta los niveles proteicos de E-cadherina llevando a la relocalización de  $\beta$ -catenina a las uniones adherentes contribuyendo al efecto anti-angiogénico en células de cáncer de colon (Pálmer et al., 2001). Los resultados de este trabajo indican una acción anti-angiogénica en las células endoteliales vGPCR a través del aumento de los niveles de VE-cadherina y  $\beta$ -catenina en la fracción enriquecida en membrana luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , relocalizando así en la membrana plasmática a  $\beta$ -catenina. Otro evento que involucra la membrana plasmática ocurre a través del inhibidor extracelular Dkk-1, que bloquea la formación de los complejos de señalización de los receptores de Wnt/ $\beta$ -catenina (González-Sancho et al., 2005). Numerosos datos demuestran la coordinación entre la regulación de Dkk-1 y la inhibición de la señalización Wnt en diferentes tipos celulares (Kim et al., 2015). La expresión de Dkk-1 adenoviral inhibe la expresión de los genes diana de Wnt (Hoffman et al., 2004).

En cáncer de colon también disminuye Dkk-1, pero el tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induce su expresión lo que se encuentra asociado a la diferenciación de células de cáncer de colon humano (Aguilera et al., 2007; González-Sancho et al., 2005). Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , por menos de 3 horas, aumentó el ARNm y las proteínas de Dkk-1, correlacionándose con una baja expresión de  $\beta$ -catenina. Este resultado sugiere que como primera acción el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  disminuye los niveles de  $\beta$ -catenina a la vez que aumenta el inhibidor extracelular Dkk-1; cuando el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  se administra por periodos más

prolongados, se genera una acumulación no transcripcional de  $\beta$ -catenina dependiente del VDR en células endoteliales vGPCR.

## **Conclusión**

A pesar de que más investigaciones son necesarias para dilucidar el mecanismo implicado en la acción antiproliferativa del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y análogo TX 527, éste capítulo de tesis provee evidencia de la supresión de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en células vGPCR a través de tres enfoques diferentes: inicialmente el aumento del inhibidor extracelular Dkk-1 que disminuye los niveles de  $\beta$ -catenina; y posteriormente la asociación VDR- $\beta$ -catenina que reduce la actividad transcripcional de genes diana del ligando Wnt como c-myc, Mmp-9 y ciclina D1, y finalmente el aumento de VE-cadherina que provoca la relocalización de  $\beta$ -catenina en la membrana plasmática.

# CAPÍTULO III

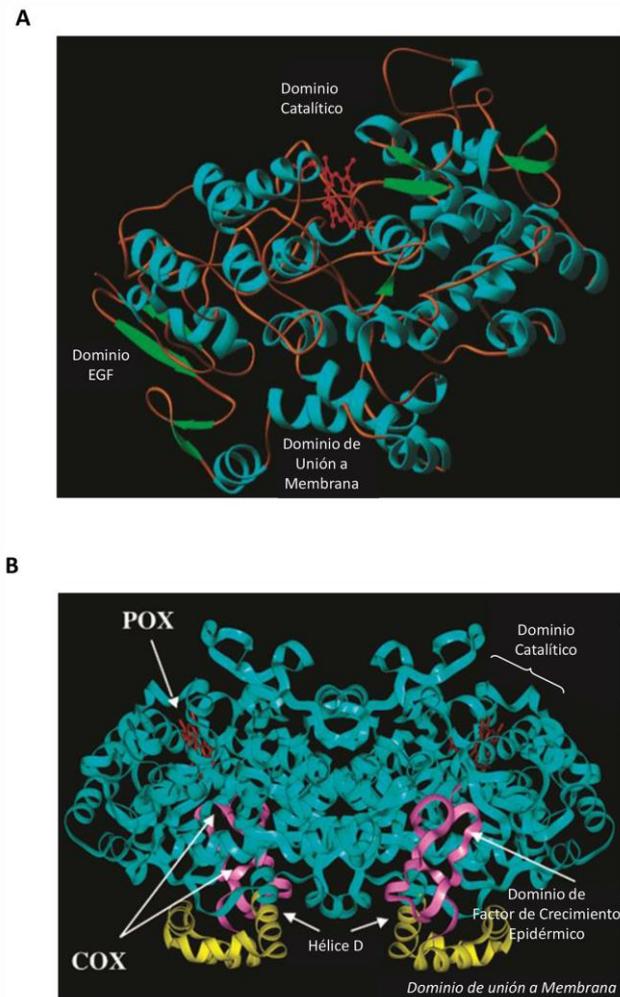
EFECTO DEL  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  EN LA  
REGULACIÓN DE COX-2 Y LOS  
RECEPTORES DE PROSTAGLANDINAS

# Introducción

Las ciclooxigenasas (COXs) o Prostaglandina H<sub>2</sub> sintasas (PGHSs) son las enzimas que catalizan la biosíntesis de prostaglandinas (PGs). En principio la actividad de COX se estudió en vesículas seminales de ovino y fue clonada por tres grupos diferentes en 1988 (DeWitt and Smith, 1988; Merlie et al., 1988; Yokoyama et al., 1988). Existen tres isoformas de la enzima COX-1, COX-2 y COX-3. COX-1 es constitutiva, se encuentra en la mayoría de las células del organismo y es responsable de las funciones basales dependientes de prostanoides. COX-2 es una enzima inducida por estímulos asociados a la activación celular y a la inflamación. El descubrimiento de COX-2 a principios de los 90' fue el evento más importante en la biología de los prostanoides en casi 20 años (Jouzeau et al., 1997). COX-3 es una variante de *splicing* de COX-1 y su actividad ciclooxigenasa es un 80% menor. Ha sido encontrada mayormente en caninos y en corteza cerebral humana (Cardillo et al., 2005).

Las enzimas COX-2 inducible y COX-1 constitutiva son similares en estructura y actividad catalítica. Son homodímeros de subunidades de 70 kDa, la respectiva dimerización es necesaria para la integridad estructural y la actividad catalítica (Smith et al., 2000; Xiao et al., 1998). Cada subunidad que conforma estos homodímeros contiene tres dominios extracelulares y estos son: un dominio de factor de crecimiento epidérmico N-terminal, un dominio de unión a membrana y un dominio catalítico C-terminal que comprende la mayor parte de la proteína y contiene los sitios activos ciclooxigenasa (COX) y peroxidasa (POX) localizados opuestamente en el dominio catalítico con el grupo prostético hemo en la base del sitio peroxidasa (**Figura III.1**)

(Blobaum and Marnett, 2007; Loll et al., 1995; Picot et al., 1994; Rouzer and Marnett, 2003).

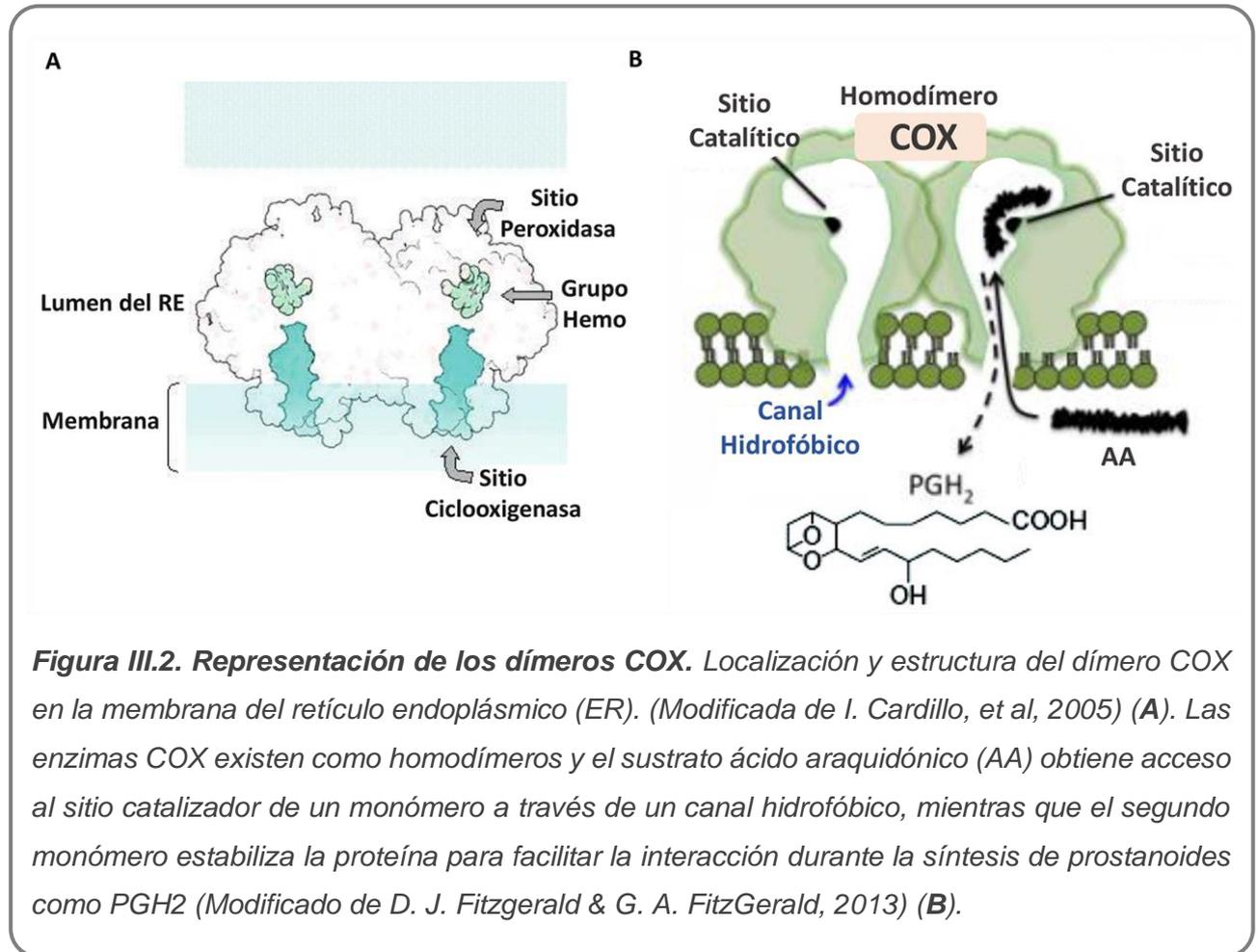


**Figura III.1. Representación de la estructura de los dominios de la proteína COX.** El N-terminal no es visible en la estructura cristalina, pero se conecta al dominio del factor de crecimiento epidérmico (EGF). El dominio de unión a membrana está conectado al extremo C-terminal del dominio del factor de crecimiento epidérmico y está compuesto por hélices A-D. La Hélice D conecta el dominio de unión a membrana con el dominio catalítico. En rojo el hemo prostético (Modificado de C. A. Rouzer & L. J. Marnett, 2003) (A). Dímero murino de COX-2: en rosa el dominio del factor de crecimiento epidérmico N-terminal, conduce a las cuatro hélices  $\alpha$  del dominio de unión a membrana en amarillo. La Hélice D se proyecta hacia arriba en el sitio activo en la base del dominio catalítico globular grande en celeste. En rojo el grupo prostético hemo en el sitio activo de POX (Modificado de A. L. Blobaum & L. J. Marnet, 2007) (B).

El dominio de factor de crecimiento epidérmico y el catalítico componen la interface del dímero y colocan los dos dominios de unión a membrana en la misma cara del homodímero (Garavito and Mulichak, 2003). Así las proteínas COX se encuentran unidas a las membranas localizadas en la luz del retículo endoplásmico y en las membranas internas y externas de la envoltura nuclear. No obstante, COX-2 parece encontrarse más concentrada en el interior de la envoltura nuclear (Morita et al., 1995; Smith et al., 2000). Insertas en las bicapas lipídicas, el dominio de unión a membrana de estas enzimas se encuentra relacionado a la asociación del sustrato y la actividad catalítica (Morita et al., 1995; Otto and Smith, 1995; Regier et al., 1992; Rouzer and Marnett, 2003). Se compone de cuatro hélices anfipáticas R con residuos hidrófobos y aromáticos que interactúan con la bicapa lipídica (Picot et al., 1994). Tres de las cuatro hélices se encuentran en el mismo plano y solo la hélice D se proyecta hacia el dominio catalítico. Este último constituye la mayor parte del monómero donde se encuentran el sitio de unión del sustrato y de acción de los AINEs (Antiinflamatorios No Esteroidales). El ácido araquidónico (AA) entra al sitio activo de COX por la base del dominio de unión a membrana, que lo conduce por un canal hidrofóbico al vestíbulo del sitio activo (Blobaum and Marnett, 2007; Picot et al., 1994). La estructura cristalina tridimensional de rayos X de COX-2 en humanos o murinos puede superponerse a la de COX-1 (Rouzer and Marnett, 2003; Smith et al., 2000), los residuos que conforman el canal de unión al sustrato, los sitios catalíticos y los residuos adyacentes son idénticos, excepto dos sustituciones aminoacídicas. En las posiciones 434 y 523 (los residuos en COX-2 reciben el mismo número que sus aminoácidos equivalentes en COX-1), Ile en COX-1 se intercambia por Val en COX-2. Esta sustitución hace que el sitio activo en COX-2 sea un 25% más grande que en COX-1, diferenciándose así el sitio activo en forma y tamaño (Blobaum and Marnett,

2007). Estas diferencias puntuales hacen a la selectividad de los respectivos inhibidores y la especificidad de sustrato, dado que COX-2 acepta un rango más amplio de sustratos o ácidos grasos que COX-1 (Otto and Smith, 1995; Rouzer and Marnett, 2009). Sin embargo, ambas utilizan el mismo sustrato endógeno y forman el mismo producto por el mismo mecanismo. La distinción principal entre si está relacionada a las funciones fisiopatológicas (Vane and Botting, 1998). La desactivación del sistema ciclooxigenasa se da por inactivación suicida. Un radical intermediario generado en la peroxidación inactiva la enzima bifuncional incluso en presencia de sustratos suficientes para luego ser degradada (Smith et al., 2000), evento acoplado a la tasa de renovación de sustrato. Pero la degradación de COX-2 basal sin exposición previa a AA, puede ocurrir vía proteasoma por glicosilación previa en el retículo endoplásmico (Mbonye et al., 2008; Saadi et al., 2018).

La función principal de las COXs es llevar a cabo los primeros pasos en la biosíntesis de PGs a partir del AA, ácido graso insaturado de 20 átomos de carbono. Para que esto suceda ocurren dos reacciones en distintos sitios, pero estructural y funcionalmente interconectados (**Figura III.2**) (Fitzgerald and FitzGerald, 2013). Cuando una molécula hidrófoba como el AA se libera de la membrana mediante fosfolipasas celulares (PLA2), ingresa al canal de la COX asistido por cadenas laterales hidrofóbicas que anclan la proteína en la membrana. Seguidamente, ocurre la oxidación cíclica del AA sin el requerimiento de cofactores en el sitio activo ciclooxigenasa, situado en el núcleo de la enzima. El producto de esta reacción difunde hacia el sitio activo peroxidasa que contiene un grupo hemo ubicado cerca de la superficie de la proteína, la reducción forma el endoperóxido cíclico PGH<sub>2</sub>.



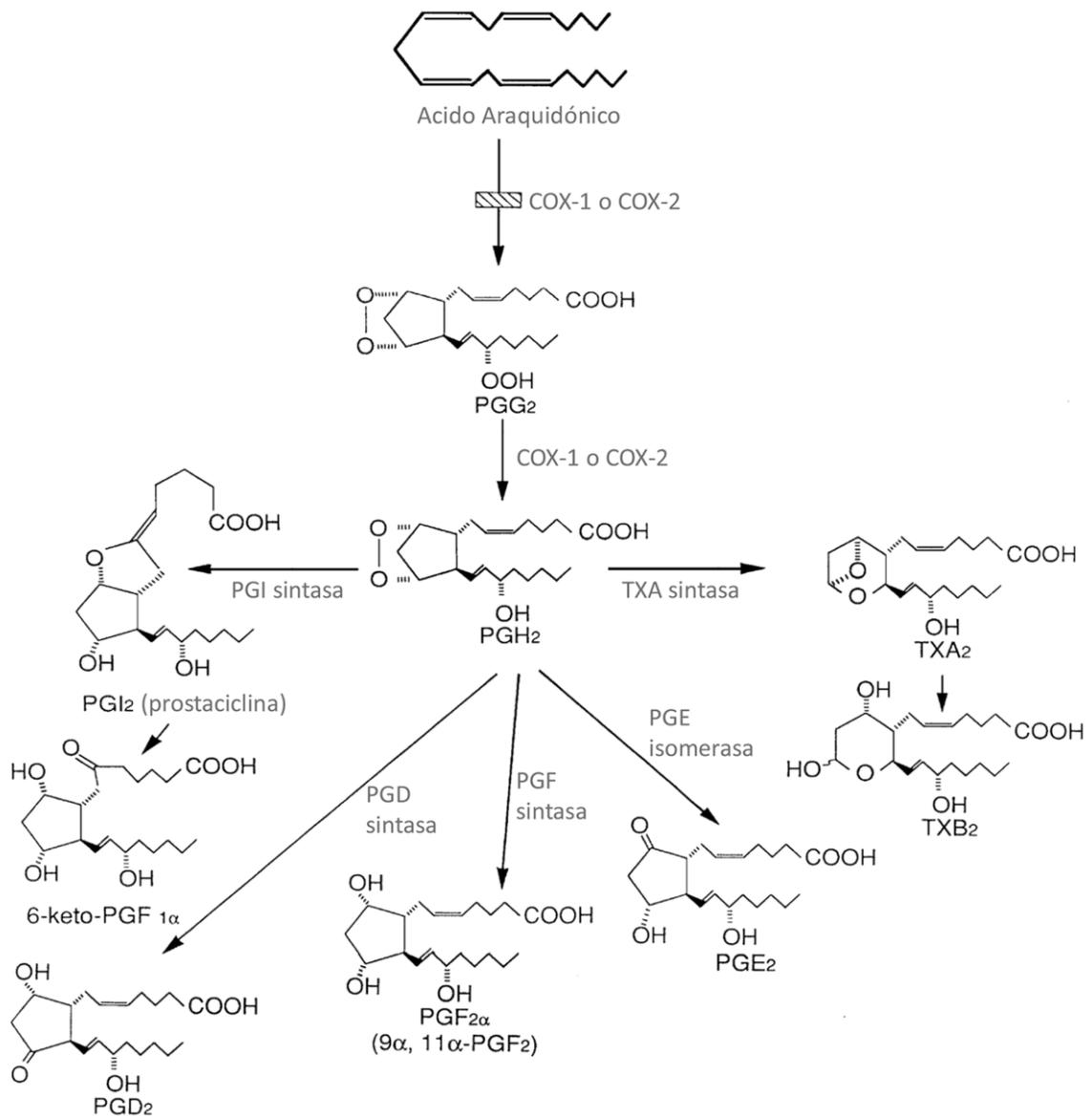
Este prostanoide es químicamente muy inestable, tiene una vida media corta y es lo suficientemente no polar para difundir a través de la membrana. Éste se isomeriza y es capturado por enzimas responsables de la producción de otros prostanoideos, que se encuentran en la superficie citosólica del retículo endoplásmico o en el citosol (Cardillo et al., 2005).

Los prostanoideos componen un gran grupo de ácidos grasos oxigenados C18, C20 y C22 o eicosanoides, son hormonas locales que derivan de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ 3 (n-3) y  $\omega$ 6 (n-6) e incluyen prostanoideos formados a través de las rutas de ciclooxigenasa, leucotrienos y lipoxinas (Smith et al., 2000). Ejercen diversas funciones biológicas como la regulación de la función inmune, el desarrollo renal, la biología reproductiva y la integridad gastrointestinal. Modulan la agregación plaquetaria, la homeostasis renal, la homeostasis vascular, la función uterina, la implantación de embriones y el parto, el ciclo de vigilia, la temperatura corporal, la protección de la mucosa gástrica y la regulación de la inflamación (Wang et al., 2007). Los prostanoideos primarios generados a partir de la ciclooxigenasa son PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub> (Dannenberg and Subbaramaiah, 2003; Vane et al., 1998) (**Figura III.3**). Estos ejercen sus acciones biológicas por medio de receptores acoplados a proteínas G que contienen siete dominios transmembrana. En particular PGE<sub>2</sub>, es un robusto agente activador de la proliferación e inflamación, capaz de estimular el crecimiento tumoral (Cordes et al., 2012; Dannenberg and Subbaramaiah, 2003; Rouzer and Marnett, 2003). PGE<sub>2</sub> abandona la célula luego de su síntesis, para actuar de forma autocrina o paracrina a través de los receptores EPs (*Prostaglandin E2 receptors*). Existen cuatro receptores de prostanoideos tipo E (EP1, EP2, EP3 y EP4) (Rundhaug et al., 2011). La interacción entre PGE<sub>2</sub> y sus receptores depende del tipo de célula, la expresión específica del receptor y la afinidad de unión (Narumiya

et al., 1999). EP3 y EP4 representan receptores de alta afinidad, mientras que EP1 y EP2 requieren niveles de PGE2 significativamente más elevados para su activación (O'Callaghan and Houston, 2015). El EP1 es el de menor afinidad con PGE2, este podría encontrarse activado durante la tumorigénesis cuando los niveles de COX-2 son elevados aumentando así síntesis de PGE2 (O'Callaghan and Houston, 2015). Acoplado a la subunidad Gαq activa la fosfolipasa C, lo que aumenta el Ca<sup>++</sup> intracelular y activa la PKC, induciendo la activación de NF-κB y la vía de las MAPK (Sugimoto and Narumiya, 2007). En cáncer, si bien al receptor EP2 se le atribuye comúnmente la inducción de angiogénesis regulando la motilidad y la supervivencia de células endoteliales (Kamiyama et al., 2006), EP4 es el mejor caracterizado. Éste promueve una respuesta inmune protumorigénica suprimiendo los linfocitos NK (Holt et al., 2012); el crecimiento, la invasión celular y el aumento de la expresión de VEGF en cáncer de colon (Dufour et al., 2014) y el silenciamiento de genes supresores tumorales por metilación del ADN en células de cáncer de colon (Xia et al., 2012). Tanto EP2 como EP4 están vinculados a la subunidad estimuladora Gαs, lo que provoca el incremento los niveles de AMPc y la activación de PKA la cual activa factores de transcripción como la proteína de unión al elemento sensible a AMPc (CREB). También pueden activar la ruta GSK-3β/β-catenina, que como se mencionó en el Capítulo II, aumenta la transcripción de muchos genes como c-myc y ciclina D1 implicados en cáncer (Fujino et al., 2002). Finalmente, no hay aun un rol claro en el proceso de tumorigénesis para el receptor EP3, variante de *splicing* alternativo que puede estar acoplado a distintas proteínas G (Namba et al., 1993).

Estímulos inflamatorios y miogénicos aumentan la expresión de enzima COX-2 (Sharma-Walia et al., 2010; Smith et al., 2000), lo que contribuye a la progresión de la angiogénesis en varios tipos de cáncer (Lin et al., 2002; Smith et al., 2000). Por lo

cual, es considerada un blanco terapéutico potencial para prevenir y tratar varios tipos de procesos tumorales (Dannenberg and Subbaramaiah, 2003; Lin et al., 2002). Existen reportes de células endoteliales microvasculares dérmicas humanas infectadas con el virus asociado al sarcoma de Kaposi que tienen una elevada expresión de COX-2 (Naranatt et al., 2004; Sharma-Walia et al., 2006). Shelby y colaboradores reportaron que el vGPCR aumenta la expresión de COX-2 en células endoteliales primarias (Shelby et al., 2007), evento asociado a niveles elevados de prostanoïdes en tumores (Dannenberg and Subbaramaiah, 2003). En base a estos antecedentes se estudió si en las células vGPCR existe una regulación de la COX-2 por el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  como parte del mecanismo de acción antiproliferativo/antiinflamatorio.



**Figura III.3. Cascada del ácido araquidónico.** La ciclooxigenasa (COX) o la prostaglandina H<sub>2</sub> sintasa (PGHS) es la enzima que cataliza los primeros dos pasos en la biosíntesis de las prostaglandinas (PG) a partir del sustrato ácido araquidónico (AA). Estas son la oxidación de AA al hidroperóxido endoperoxido PGG<sub>2</sub> y su posterior reducción al hidroxi endoperoxido PGH<sub>2</sub>. El PGH<sub>2</sub> se transforma mediante una gama de enzimas y mecanismos no enzimáticos en los prostanoides primarios, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub>. (Modificado de J. R. Vane, et al, 1998).

# Resultados

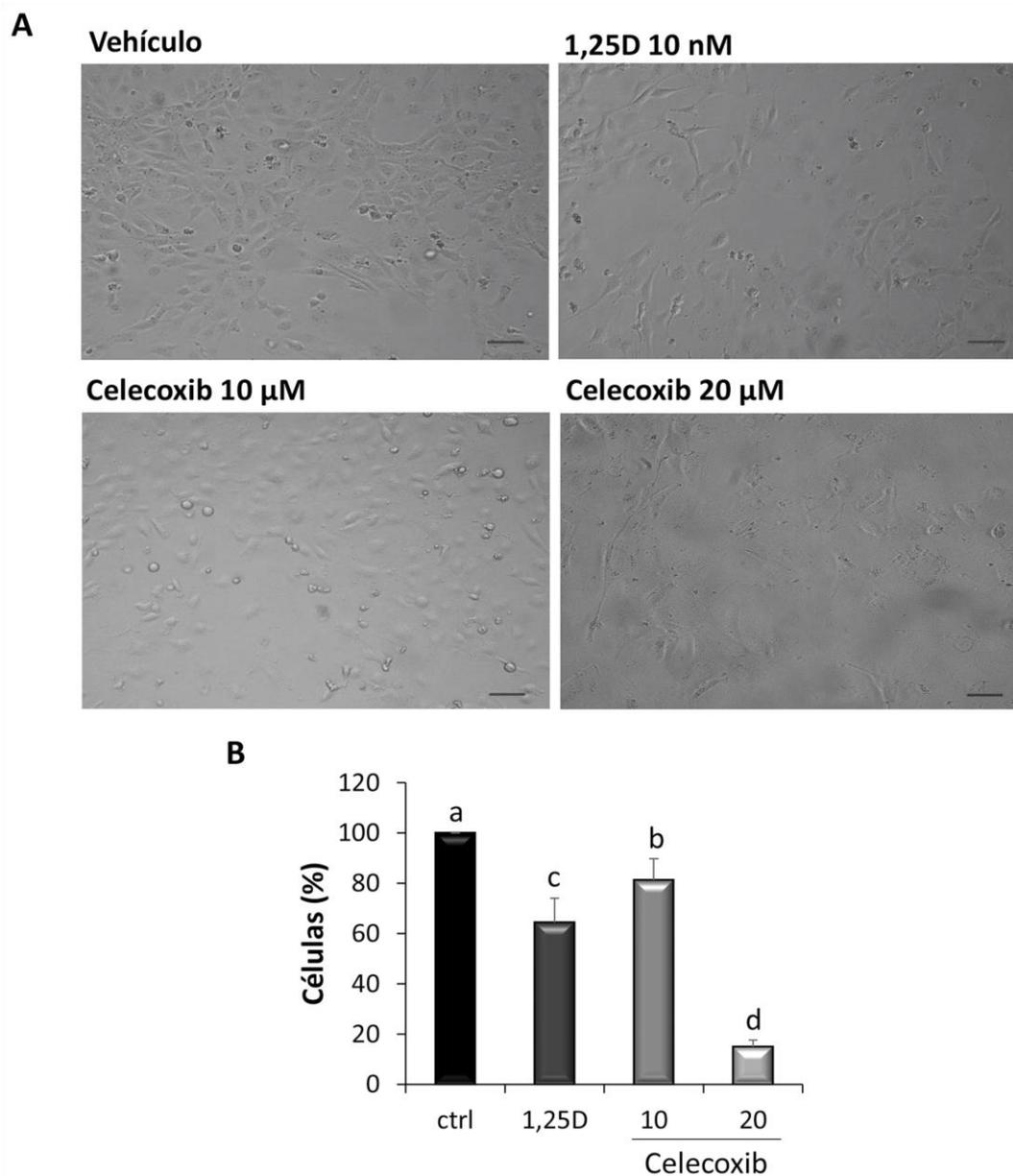
## **Celecoxib reduce el número y la viabilidad de las células vGPCR**

Inhibidores selectivos de COX-2 como celecoxib fueron desarrollados originalmente para disminuir las reacciones adversas causadas por los AINEs, pero a su vez son capaces de inducir la apoptosis (Egashira et al., 2017; Friedrich et al., 2018) y suprimir el crecimiento celular de diferentes tipos de cáncer *in vivo* e *in vitro* (Friedrich et al., 2018). Debido a que la expresión de COX-2 es inducida por vGPCR en células endoteliales como se mencionó anteriormente (Shelby et al., 2007), en este trabajo de tesis se investigó si la regulación de COX-2 contribuye al efecto antiproliferativo de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . En primer lugar, se realizaron ensayos de proliferación donde las células vGPCR se sembraron, se mantuvieron en cultivo durante 24 horas y luego, por el mismo periodo de tiempo, se privaron de suero para la sincronización del ciclo celular. Luego, se trataron con vehículo (0,01% de etanol) o  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  10 nM o celecoxib (10-20  $\mu\text{M}$ ) por 48 horas. Finalizado el tratamiento, se tomaron micrografías de cada condición en un microscopio de contraste de fases (**Figura III.4A**) y luego las células se tripsinizaron y contaron en una cámara de Neubauer (**Figura III.4B**). Los resultados muestran que el inhibidor de COX-2 celecoxib, disminuyó significativamente el número celular en forma dependiente de la concentración y en magnitud similar al  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , presentando cambios morfológicos típicos del proceso apoptótico como condensación del citoplasma y cambios en la forma y el tamaño celular. Seguidamente, para medir la viabilidad de las células vGPCR, éstas se trataron con vehículo (0,01% de etanol) o  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  10 nM y/o celecoxib (10  $\mu\text{M}$ ) por 48 horas. Finalizado el tratamiento, se incubaron con el reactivo MTS donde las células metabólicamente activas provocaron

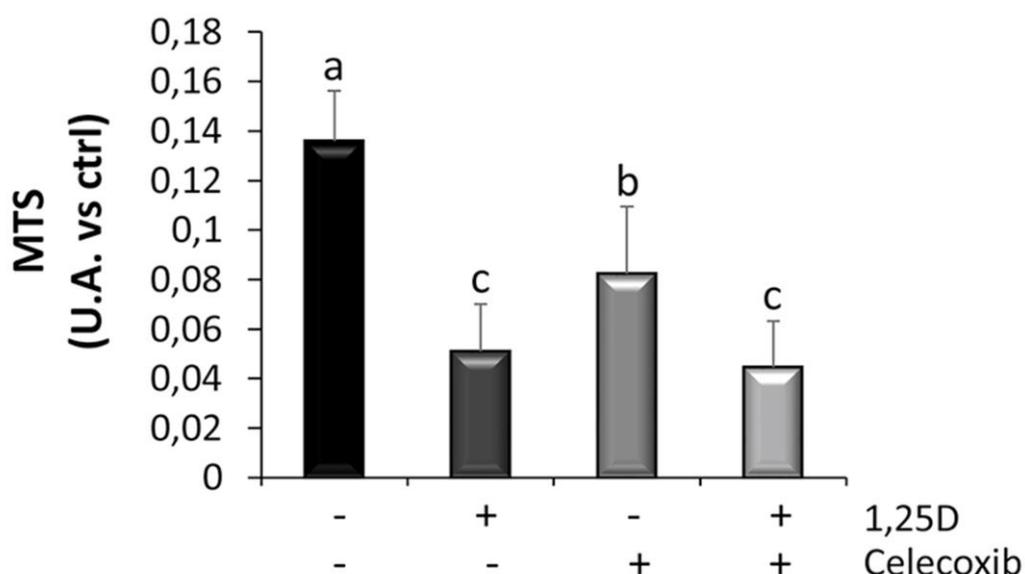
su bio-reducción colorimétrica, efecto que se utilizó como indicador de viabilidad celular. Los resultados en la **Figura III.5** indican que  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o celecoxib disminuyeron efectivamente la viabilidad celular, sin embargo, no se observó un efecto potenciado adicional cuando se usaron ambos agentes en forma combinada.

### **La expresión de COX-2 aumenta en presencia de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y es dependiente de la expresión del VDR**

Varios reportes demuestran la acción antiinflamatoria de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  a través de la inhibición de la expresión de COX-2 (Krishnan et al., 2010; Thill et al., 2015; Wang et al., 2014). No obstante, en células epidérmicas existe evidencia donde el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  presenta el efecto contrario, induciendo la expresión de COX-2 y actuando como promotor y atenuador de la inflamación cutánea (Ravid et al., 2016). En base a estos antecedentes, se evaluó la regulación de COX-2 por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en células endoteliales que expresan constitutivamente el vGPCR. En primer lugar, las células en monocapa se cultivaron como se mencionó previamente y trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (10 nM) vehículo (0,01% de etanol) a diferentes tiempos (0,3-48 h). Los esferoides, en cambio 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. Posteriormente, los niveles de ARNm de COX-2 se midieron en ambos casos por qRT-PCR utilizando *primers* específicos. Los resultados en la **Figura III.6A** muestran que el mensajero de COX-2 aumentó significativamente y en forma variable durante todo el período analizado luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Asimismo, se observaron mayores niveles de mensajero de COX-2 en esferoides en forma dependiente de la concentración de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (**Figura III.6B**).



**Figura III.4. Disminución de la proliferación en células vGPCR por celecoxib o  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Las células vGPCR se sembraron y se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o vehículo (0,01% de etanol) o celecoxib durante 48 h. Micrográficas representativas obtenidas por microscopía de contraste de fases, barra: 30  $\mu\text{m}$ , magnificación 200x (**A**). Las células se contaron en cámara de Neubauer y se representó el porcentaje de proliferación de cada condición con respecto al control en un gráfico de barras ( $n = 3$ ). El análisis estadístico de los resultados se realizó por ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni, en donde las diferencias significativas se representan con distintas letras ( $p < 0,01$ ) (**B**).

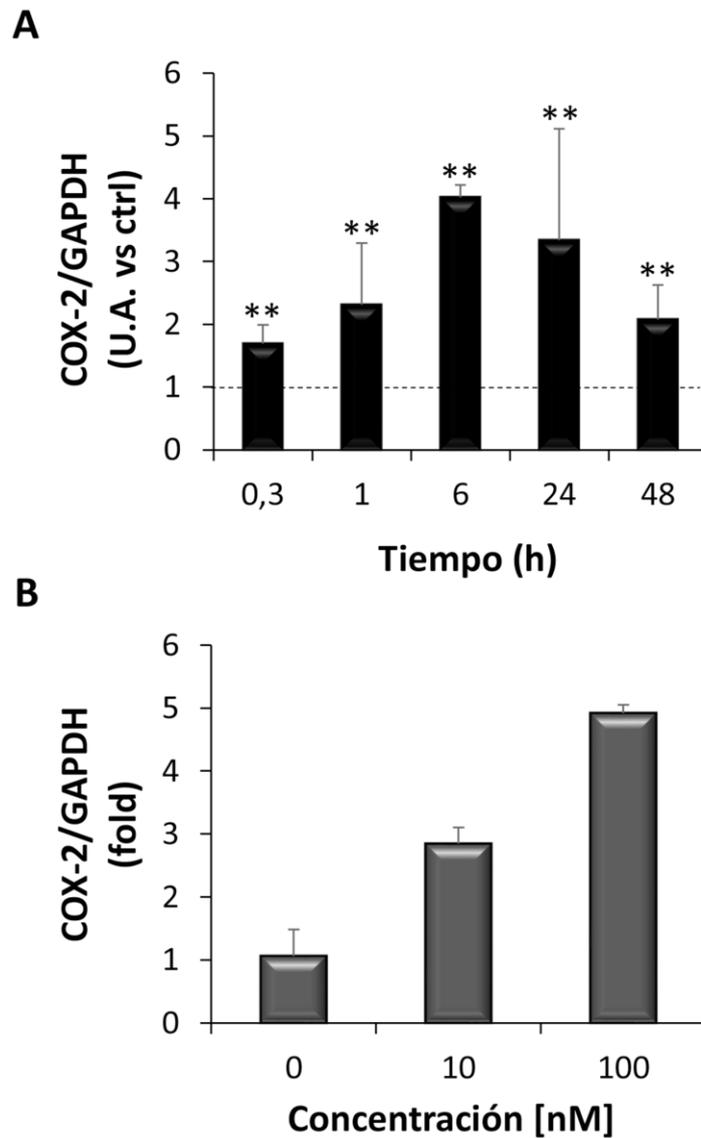


**Figura III.5.** Disminución de la viabilidad celular en células vGPCR por celecoxib o  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Las células vGPCR se sembraron y se trataron con vehículo (0,01% de etanol) o  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) y/o celecoxib durante 48 h. El número de células viables se determinó mediante el ensayo de MTS y se representó la absorbancia corregida de cada condición en un gráfico de barras. El análisis estadístico de los resultados se realizó por ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni, en donde las diferencias significativas se representan con distintas letras ( $p < 0,01$ ;  $n \geq 4$ ).

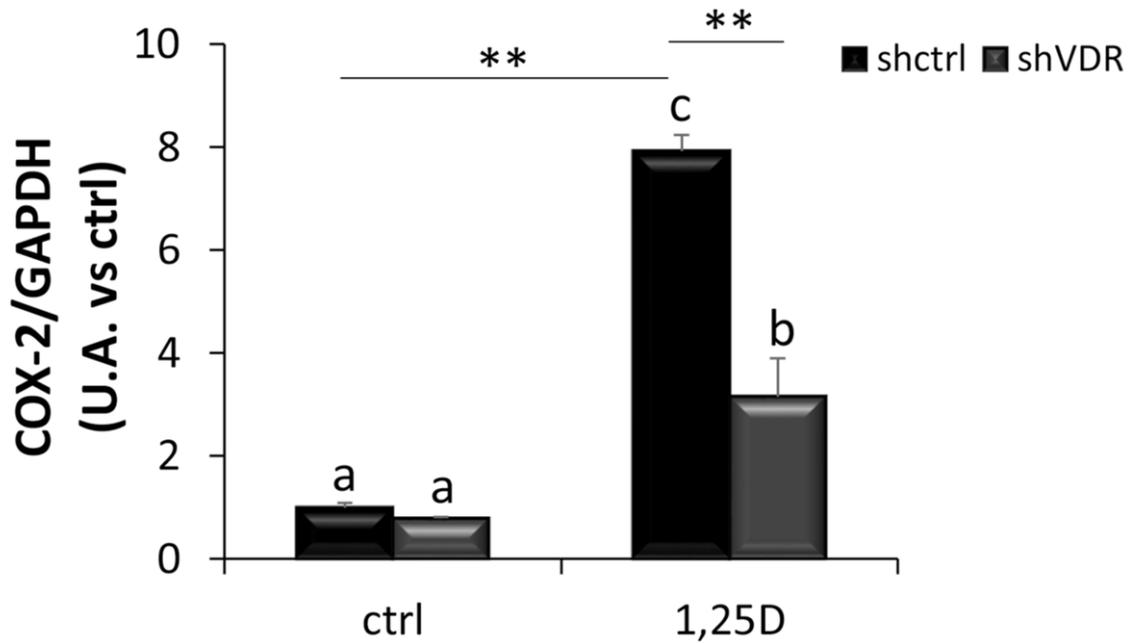
A continuación, se investigó si éste aumento en los niveles del ARNm de COX-2 dependen de la expresión del VDR. Para ello, se utilizó una línea estable con el VDR silenciado, vGPCR-shVDR o en ausencia (vGPCR-shctrl). Ambas, se cultivaron como se mencionó previamente, y se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (10 nM) o vehículo (0,01% de etanol) por 24 horas. Los resultados en la **Figura III. 7** indican que el aumento significativo de COX-2 inducido por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  fue suprimido significativamente cuando la expresión del VDR se encuentra silenciada.

Para determinar si el aumento del mensajero se traduce en un aumento en los niveles proteicos de COX-2, se realizaron experimentos en paralelo y se detectó la

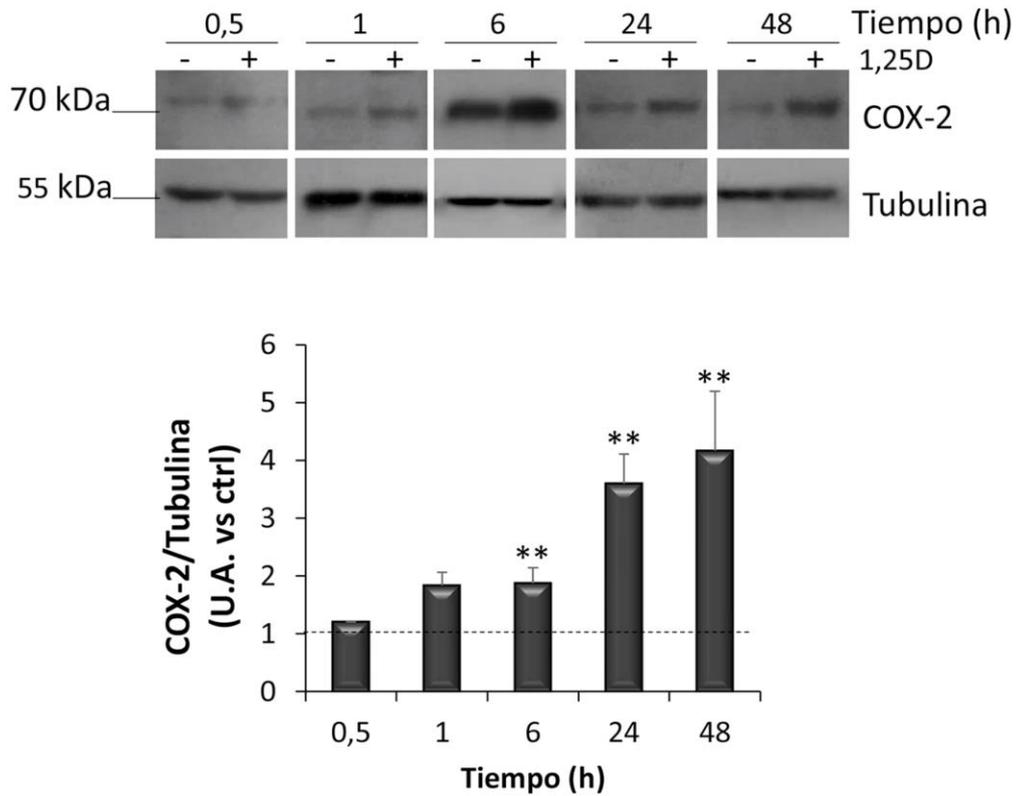
proteína por Western blot. Para ello, las células vGPCR se trataron como se comentó previamente durante diferentes periodos de tiempo (0,5-48 h). Los resultados que se muestran en la **Figura III.8** revelan que si bien los niveles proteicos de COX-2 aumentaron a partir de la media hora de tratamiento, éste aumento fue significativo a partir de las 6 horas y en forma dependiente del tiempo.



**Figura III.6.** El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aumenta el mensajero de COX-2. Las células vGPCR se sembraron creciendo en cultivo en monocapa y se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o vehículo (0,01% de etanol) por 0,3 a 48 h. El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba t de Student (\*\*  $p < 0,01$ ) ( $n \geq 3$ ) (A). Luego los esferoides de células vGPCR se trataron con concentraciones crecientes de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) de 0,1-100 nM o vehículo (0,01% de etanol) durante 48 h ( $n = 1$ ) (B). Los niveles del mensajero de COX-2 se analizaron por qRT-PCR. Los datos están expresados como el radio entre las condiciones tratadas y los controles normalizados con el ARNm de GAPDH.



**Figura III.7. El aumento del mensajero de COX-2 por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  depende del VDR.** Las líneas celulares vGPCR-shctrl (shctrl) y vGPCR-shVDR (shVDR) se sembraron y trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o vehículo (0,01% de etanol) por 24 h. Los niveles del mensajero de COX-2 se analizaron por qRT-PCR. Los datos están expresados como el ratio entre las condiciones tratadas y los controles normalizados con el ARNm de GAPDH. El análisis estadístico se realizó primeramente por ANOVA simple seguido de la prueba de Bonferroni. Las diferentes letras indican diferencias significativas con un  $p < 0,01$ . Diferencias entre los grupos vGPCR-shctrl control vs tratado, y los tratados vGPCR-shctrl vs vGPCR-shVDR se analizaron por la prueba  $t$  de Student (\*\* $p < 0,01$ ) ( $n = 2$ ).

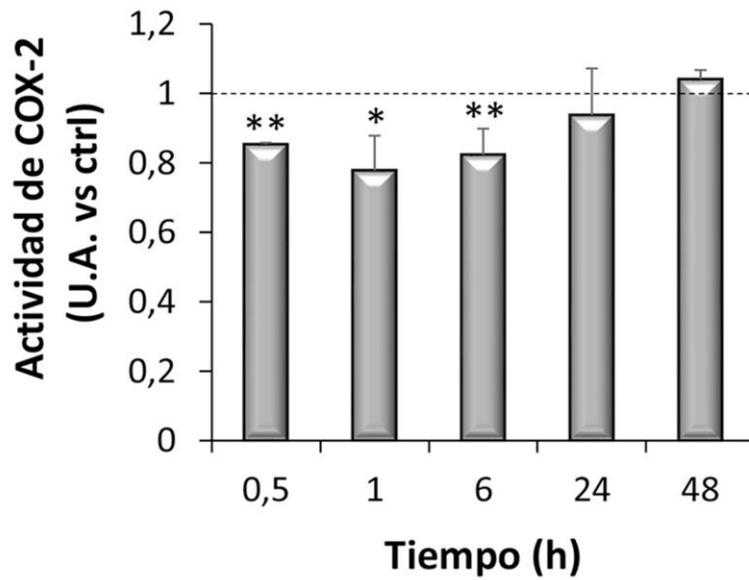


**Figura III.8. Aumento de los niveles proteicos de COX-2 por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Las células vGPCR se sembraron y se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o vehículo (0,01% de etanol) por 0,3 a 48 h. Los niveles proteicos de COX-2 se analizaron por Western blot. Se muestran los blots representativos y la cuantificación de las bandas de COX-2 normalizadas con Tubulina, se presenta en un gráfico de barras ( $n \geq 3$ ). El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba *t* de Student (\*\*  $p < 0,01$ ).

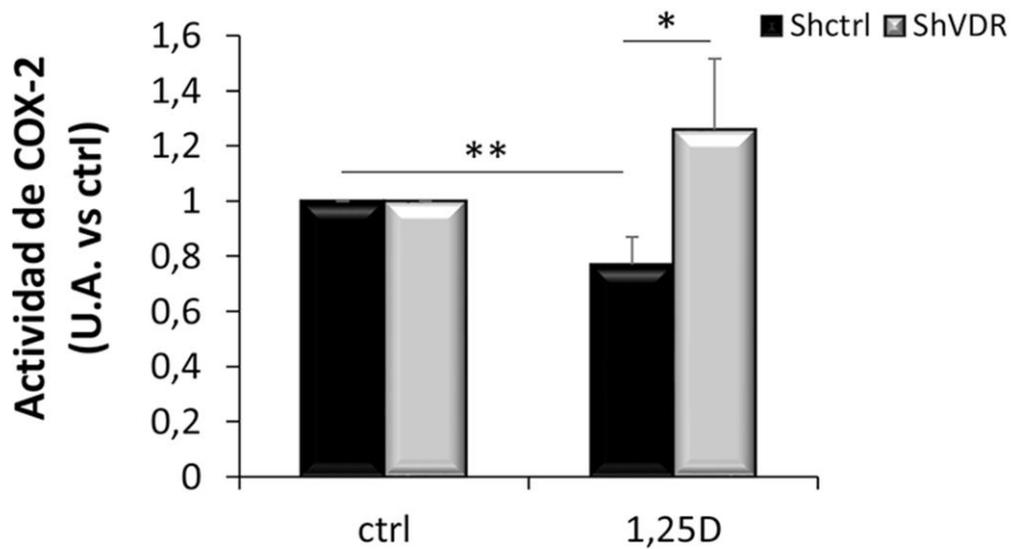
## El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ disminuye la actividad de COX-2

Dado que se evidenció que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aumenta la expresión de COX-2 y cuando se suprime su actividad por celecoxib disminuye la proliferación en forma similar al efecto del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , a continuación, se investigó si la hormona regula su actividad enzimática. Para tal fin, las células vGPCR se cultivaron como se describió previamente y se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (10 nM) o vehículo (0,01% de etanol) por diferentes periodos de tiempo (0,5-48 h). La actividad peroxidasa se midió colorimétricamente con un kit de ensayo de actividad como se describió en la metodología. Los resultados en la **Figura III.9** indican que la actividad de COX-2 en presencia de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , disminuyó significativamente durante períodos cortos de tiempo (0,5-6 h) para luego estabilizarse en periodos más prolongados de tratamiento (24-48 h).

Para ahondar en la conexión entre el VDR y la disminución de la actividad enzimática de COX-2, la actividad de la enzima se midió en la línea celular que presenta establemente el VDR silenciado (shVDR) o control (shctrl) en presencia o ausencia de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en uno de los tiempos donde se observó una disminución significativa. Las células vGPCR-shVDR y vGPCR-shctrl se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (10 nM) o vehículo (0,01% de etanol) por 30 minutos. Seguidamente, la actividad de la COX-2 se cuantificó colorimétricamente como se mencionó previamente. Los resultados presentados en la **Figura III.10** demuestran que la actividad de COX-2 disminuyó luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en la línea control; sin embargo, en la línea celular donde el VDR se encuentra silenciado, la actividad de la enzima aumentó significativamente con respecto a su control. Este efecto indica la dependencia del VDR para el descenso en la actividad enzimática de COX-2 por el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  a tiempos cortos de tratamiento.



**Figura III.9.**  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  disminuye la actividad de COX-2. Las células vGPCR se sembraron y trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o vehículo (0,01% de etanol) durante 0,5-48 h. Finalizado el tratamiento se midió la actividad peroxidasa coloriméricamente. El gráfico de barras muestra los niveles de actividad en unidades arbitrarias (U.A.) por  $\mu\text{g}$  de proteína con respecto al control de cada tiempo ( $n \geq 3$ ). La significancia estadística de los resultados se evaluó por la prueba  $t$  de Student (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

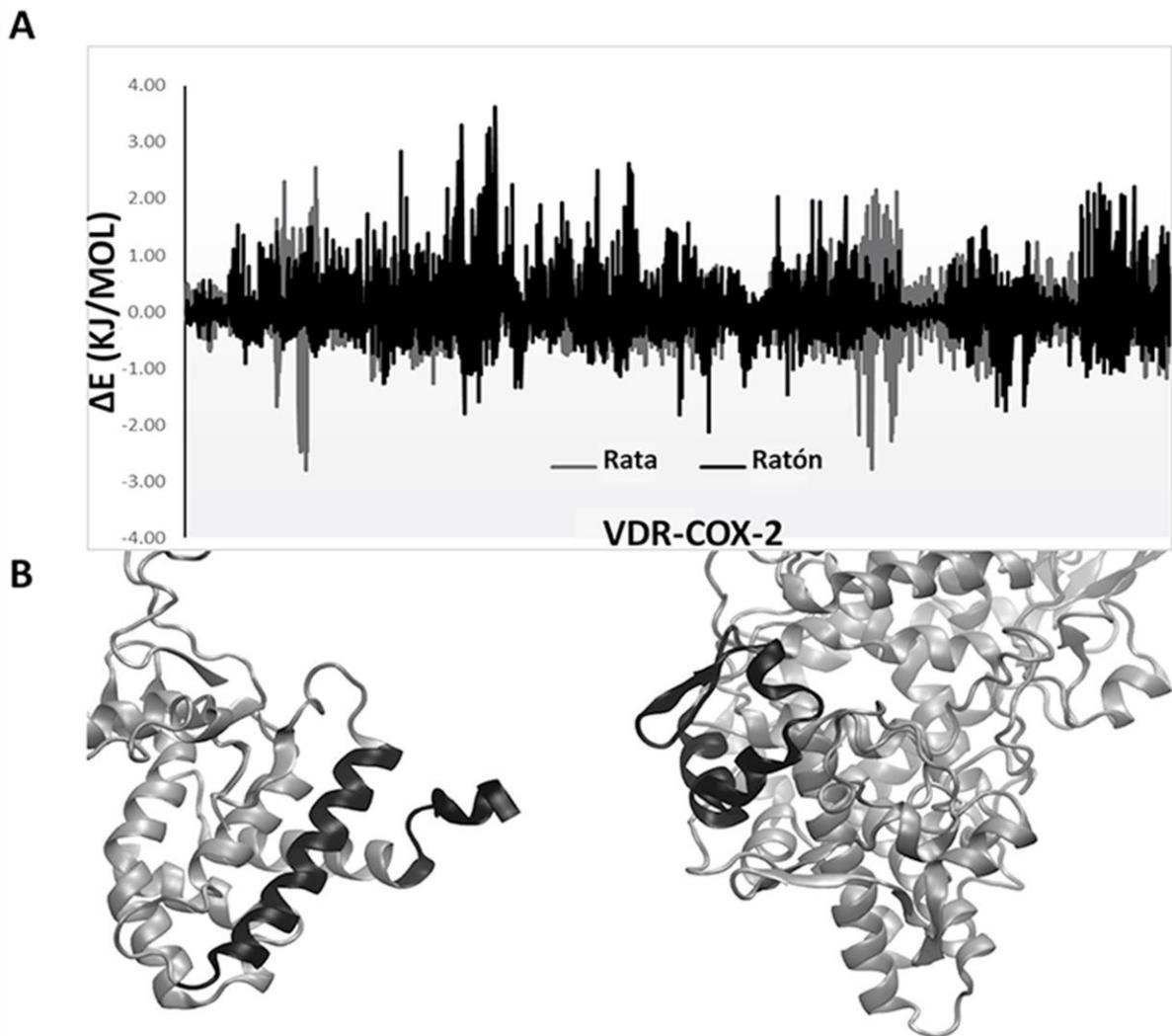


**Figura III.10. La disminución de la actividad de COX-2 por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  depende del VDR.** Las líneas celulares vGPCR-shctrl (shctrl) y vGPCR-shVDR (shVDR) se sembraron y trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o vehículo (0,01% de etanol) por 0,5 h. Finalizado el tratamiento se midió la actividad peroxidasa colorimétricamente. El gráfico de barras muestra los niveles de actividad en unidades arbitrarias (U.A.) por  $\mu\text{g}$  de proteína con respecto al control de cada tiempo ( $n \geq 3$ ). Las diferencias estadísticamente significativas entre control y tratado de vGPCR-shctrl, y entre los tratados de ambas líneas, se evaluaron por la prueba t de Student (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

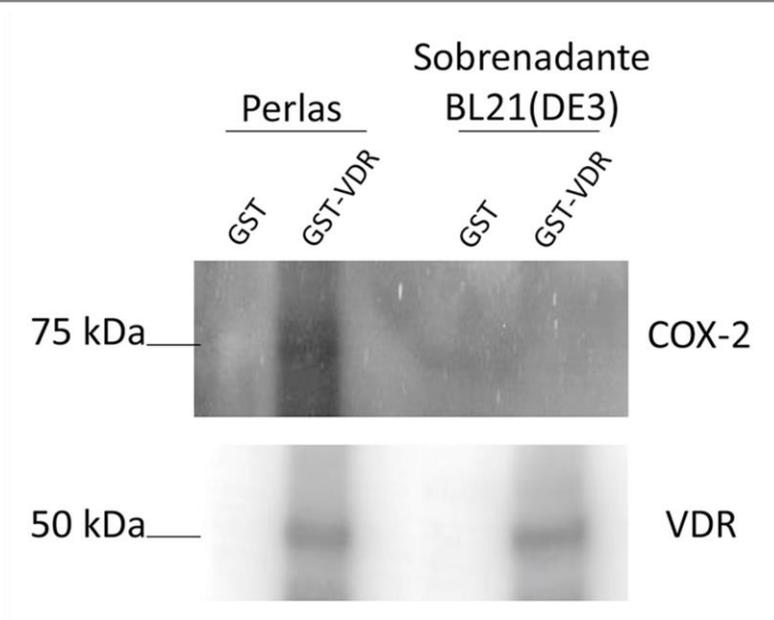
## Estudio de la posible interacción física entre COX-2 y el VDR

A pesar de que la expresión génica y proteica de COX-2 se encontró significativamente aumentada luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , la actividad enzimática disminuyó rápidamente y en forma significativa; efecto que demostró ser dependiente de la expresión del VDR. La supresión del VDR en presencia de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  provocó un aumento leve, si bien significativo, en la actividad de la COX-2. Este hecho podría sugerir una interacción física entre el VDR y COX-2 que regule su actividad. Para estudiar esta posibilidad, en primer lugar, se realizaron estudios *in silico* para examinar la energía electrostática de la potencial unión entre VDR y COX-2 en dos especies diferentes, rata y ratón. Las interacciones electrostáticas definen las propiedades estructurales y funcionales en sistemas biológicos, influyen en el plegamiento, la estabilidad conformacional, la actividad enzimática y las interacciones proteína-proteína. Para la interacción VDR-COX-2 se aplicaron los algoritmos que resuelven la ecuación de Poisson-Boltzmann (Vallejo et al., 2009). En rata, el perfil de energía electrostática mostró valores mínimos significativos agrupados como se esperaba en una interacción favorable para este método (Vallejo et al., 2009; Zamarreño et al., 2017, 2012). En este caso, los residuos Lys123-GLU127 y ALA345-PRO368 del VDR parecían liderar la orientación en la interacción apuntando hacia las regiones GLU402-ARG414 y SER552-GLN569 de COX-2. Para la interacción VDR-COX-2 en ratón, se encontraron algunos valores mínimos apreciables, aunque no estaban tan agrupados ni tan marcados como para la interacción VDR-COX-2 de rata. Similar al perfil de interacción electrostática de rata, se produjeron valores mínimos para posiciones relativas en las que los residuos LEU116-GLU127 y ASP343-ARG365 del VDR aparentemente dirigen la orientación en la interacción apuntando hacia la región THR394-GLN429 de COX-2 (**Figura**

**III.11A).** Para confirmar estos estudios, se evaluó la posible interacción entre VDR y COX-2 por el ensayo de GST *Pull-down*. Para ello, los lisados totales de las células vGPCR se incubaron con perlas de Glutación-Sefarosa acopladas a las proteínas de fusión GST o GST-VDR, estas últimas obtenidas mediante la sobreexpresión de los respectivos vectores en *E. coli* BL21 previamente transformadas. Luego del *Pull-down*, la elución de las perlas permitió verificar la presencia de COX-2 y de VDR por Western blot. Como se muestra en la **Figura III.12**, la proteína COX-2 presente en el lisado proveniente de células vGPCR, co-precipitó con el VDR- GST obtenido del lisado bacteriano de *E. coli* BL21. De esta forma los resultados obtenidos sustentan una interacción entre las proteínas COX-2 y VDR.



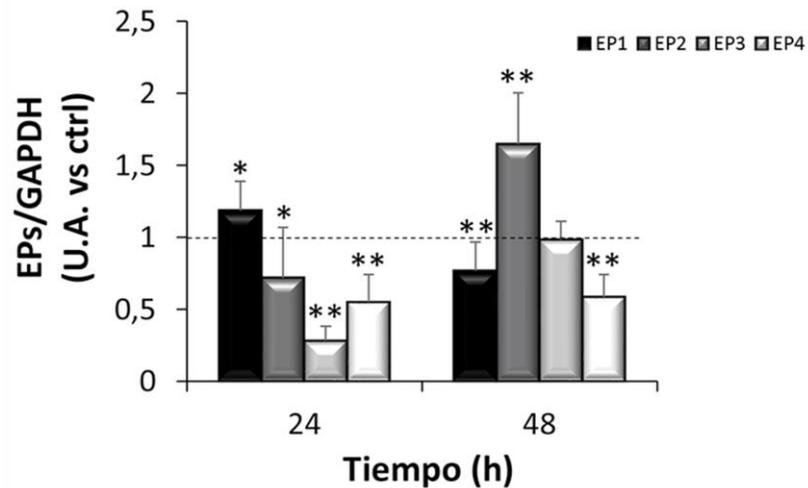
**Figura III.11. Se muestra el análisis computacional de la interacción proteína-proteína. Energía electrostática versus diferentes configuraciones del complejo VDR-COX-2. Se evaluaron 3872 posiciones relativas. El punto de partida es una posición aleatoria, pero siempre la misma. Para mayor claridad, las variaciones en los grados de los ángulos no fueron etiquetadas. Las curvas con diferentes colores indican el complejo VDR-COX-2 de diferentes especies. En gris rata y en negro ratón (A). Vista del complejo Mouse VDR-COX-2 en la configuración de energía mínima. Izquierda en negro: regiones líderes supuestas de VDR de ratón. Derecha en negro: regiones principales supuestas de COX-2 de ratón (B).**



**Figura III.12. Interacción proteína-proteína in vitro.** El lisado bacteriano BL21 que expresaba las proteínas de fusión GST o GST-VDR se acopló a perlas de glutatión-Sefarosa, luego el contenido proteico de los lisados de células vGPCR se incubó con las mismas. Mediante el Pull-down de los lisados y la elución de las perlas, se detectó la presencia de la interacción COX-2-VDR por Western blot con anticuerpos anti-COX-2 y anti-VDR. Se muestran blots representativos que incluyen como control negativo, el sobrenadante bacteriano BL21(DE3) ( $n = 3$ ).

### **El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regula la expresión de los receptores de prostanoïdes**

La desregulación de COX-2 lleva a un aumento de los niveles de prostanoïdes como PGE2 (O'Callaghan and Houston, 2015). Existen datos que indican la reducción de la producción de PGE2 por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en fibroblastos de pulmón humano como parte de un mecanismo de reparación tisular mediada por fibroblastos (X. Liu et al., 2014). PGE2 actúa en forma autocrina o paracrina a través de cuatro receptores EP1, EP2, EP3 y EP4, capaces de activar diferentes cascadas de señalización (O'Callaghan and Houston, 2015). Por consiguiente, se examinaron posibles cambios en la expresión de los EPs cuando la actividad de COX-2 se estabiliza luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Las células vGPCR se incubaron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (10 nM) o vehículo (0,01% de etanol) por 24 y 48 horas. El ARN total se aisló y retrotranscribió a ADNc. La expresión del ARNm de EP1, EP2, EP3 y EP4 se analizó por qRT-PCR utilizando *primers* específicos, para normalizar la expresión del mensajero correspondiente se empleó GAPDH. Los resultados presentados en la **Figura III.13** revelan que los receptores de alta afinidad, EP3 y EP4 disminuyeron significativamente su expresión luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , en cambio, los receptores de baja afinidad EP1 y EP2 se comportaron de forma diferente. EP1 fluctuó aumentando a las 24 horas y luego disminuyó a las 48 horas, mientras que EP2 aumentó significativamente su expresión a 48 horas, tiempo donde se correlaciona con la disminución significativa en la proliferación de las células vGPCR. Las variaciones en la expresión de los EPs sugieren una supresión diferencial de la actividad biológica de PGE2 por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .



**Figura III.13.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  regula la expresión de los EPs.** Las células vGPCR se sembraron y se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o vehículo (0,01% de etanol) por 24 y 48 h. Los niveles del mensajero de cada receptor (EP1-4) se analizaron por qRT-PCR. Los datos están expresados como el radio entre las condiciones tratadas versus su control a cada tiempo normalizados con el ARNm de GAPDH ( $n \geq 3$ ). La significancia estadística de las variaciones de los EPs a cada tiempo entre el control y tratado se evaluó por la prueba *t* de Student (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

# Discusión

Diversos mecanismos moleculares son capaces de generar procesos tumorales a partir de la cronicidad en la inflamación, entre ellos se encuentra la inducción de COX-2 (Hussain and Harris, 2007). En células normales los niveles de COX-2 son despreciables (Gurram et al., 2018), basalmente se expresa en el estómago, los riñones, el sistema nervioso central y los órganos reproductivos femeninos (Obermoser et al., 2018; Su et al., 2016). Sin embargo, esta enzima es inducible por estimulación de citocinas, endotoxinas y mitógenos en procesos fisiopatológicos (Obermoser et al., 2018). Se han detectado niveles elevados en el foco tumorigénico de cánceres como adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas (SCC), colangiocarcinomas, carcinomas de células de transición, carcinomas endometriales (Dannenberget al., 2005), carcinomas hepatocelulares (Mortezaee, 2018) y de ovario (Rask et al., 2006). Con frecuencia se encuentra tanto en las células epiteliales como en el estroma del tumor (Hussain and Harris, 2007). Inclusive el mismo microambiente tumoral puede llegar a estimular su sobreexpresión (Hashemi Goradel et al., 2019; Ohtsuka et al., 2018). Existen algunas excepciones donde a la inhibición de COX-2 se la considera como una desventaja en la quimioterapia. Como es el caso de células de osteosarcoma, donde la activación de la señalización de COX-2 induce la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), generando un grado de estrés oxidativo intolerable para la célula que provoca la apoptosis (Baek et al., 2018; Xu et al., 2006). No obstante, en la mayoría de las patologías tumorales COX-2 es capaz de promover la resistencia a la apoptosis, estimular la proliferación, la angiogénesis, la inflamación, la invasión y la metástasis de las células cancerosas (Goradel et al., 2018). Efectos que pueden ser contrarrestados por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

mediante la inhibición de COX-2 (Cordes et al., 2012; Coşkun et al., 2018; Krishnan et al., 2010; Wang et al., 2014).

El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  es esencial para las funciones fisiológicas humanas siendo capaz de controlar la inflamación sistémica (Wimalawansa, 2019). Su insuficiencia aumenta el riesgo de padecer enfermedades inflamatorias crónicas como artritis reumatoide, enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer (Glade, 2013; Wang et al., 2014). La mayoría de sus acciones dependen del VDR (Krishnan and Feldman, 2011). Existen reportes de un efecto protector del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ante un proceso tumoral, dado que ciertas líneas de cáncer de mama presentan una desregulación de las enzimas que metabolizan la vitamina D y una menor expresión del VDR en comparación con líneas normales (Thill et al., 2012). Además, ejerce una acción antiinflamatoria por medio de la disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias y de la expresión de COX-2 en macrófagos murinos *in vivo* por modulación de las vías Akt/NF- $\kappa$ B (Wang et al., 2014). En líneas celulares humanas de cáncer de próstata,  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  disminuye el mensajero y las proteínas de COX-2 como también la secreción de la PGE2 al medio (Moreno et al., 2005). Debido a que COX-2 ejerce un rol clave en la producción de PGs y el consecuente proceso inflamatorio, y a su vez se encuentra activada por vGPCR en el sarcoma de Kaposi (Shelby et al., 2007), en este trabajo de tesis se investigó si la regulación de COX-2 por el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  contribuye a su mecanismo de acción antiproliferativo en células vGPCR.

Los resultados obtenidos indican que la proliferación y la viabilidad de células endoteliales transformadas por vGPCR en presencia del inhibidor de COX-2, celecoxib, disminuyó en forma similar al tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . No obstante, no se observó efecto aditivo cuando ambos agentes se incorporaron de manera

conjunta lo que sugiere que celecoxib y el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  actúan bajo el mismo mecanismo. A su vez, ensayos tiempo-respuesta en cultivo en monocapa y concentración-respuesta en esferoides, para analizar la expresión de COX-2 en función del tratamiento hormonal, indicó, contrario a lo esperado, que tanto el mensajero como los niveles proteicos de COX-2 aumentaron significativamente luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , efecto que fue dependiente de la expresión del VDR. Diversos reportes indican que la sobreexpresión de COX-2 en cáncer es proporcional a la agresividad y la metástasis. Motivo por el cual la inhibición de la actividad COX-2 se la puede considerar un buen blanco terapéutico (Goradel et al., 2018). Se exploró entonces, si el aumento de expresión se encuentra asociado a una enzima biológicamente activa. Se midió la actividad peroxidasa de COX-2 en células vGPCR y el resultado demostró una disminución a tiempos cortos de tratamiento para luego estabilizarse. Como se mencionó previamente en la introducción del capítulo, COX-2 es una enzima bifuncional enzimáticamente con dos sitios activos que se encuentran estructuralmente y funcionalmente conectados. La actividad peroxidasa ocurre en el sitio activo que contiene hemo ubicado cerca de la superficie de la proteína, en cambio, la actividad ciclooxigenasa sucede en el canal hidrofóbico dentro del núcleo de la enzima (Smith et al., 2000). En estudios *in vitro* se ha demostrado que la reacción de peroxidación puede ocurrir independientemente de la ciclooxigenación, como en el caso de la catálisis de COX (Koshkin and Dunford, 1999) o de la ocupación del sitio activo por AINEs (Picot et al., 1994), pero no a la inversa. Como la reacción ciclooxigenasa depende de la peroxidasa (Smith and Lands, 1972), la disminución de actividad detectada advertiría una baja en la síntesis de prostanoïdes que, a su vez, demostró ser dependiente de la expresión del VDR. Esto sugiere una conexión entre el VDR y la enzima COX-2. Mientras que COX-2 se

encuentra generalmente en el citosol, existen reportes de una localización perinuclear (Thanan et al., 2012) y un tráfico entre el núcleo y el citoplasma en células endoteliales (Parfenova et al., 2001) capaz de influir en los eventos nucleares. En base a esta evidencia y a los resultados obtenidos en este trabajo se investigó una posible interacción entre las proteínas VDR-COX-2 responsable de la elevada expresión de COX-2 asociada a una baja actividad enzimática. Si bien al momento no se encuentra disponible la estructura tridimensional completa de algunas de las proteínas estudiadas, el análisis de interacción electrostática reveló que regiones similares de VDR y COX-2 en rata y ratón podrían estar involucradas en liderar la interacción. Para la confirmación experimental se utilizó la técnica de *GST-Pull-down*. Los resultados obtenidos respaldaron la posibilidad de una interacción entre VDR y COX-2

Por otro lado, uno de los principales productos de las reacciones catalizadas por COX-2 es PGE<sub>2</sub>, prostanoide que posee una alta capacidad de promoción tumoral (Nakanishi and Rosenberg, 2013). La PGE<sub>2</sub> ejerce acciones inflamatorias mediante cuatro receptores acoplados a proteína G. Cada uno de estos receptores o EPs puede activar diferentes vías de señalización, lo que hace que PGE<sub>2</sub> tenga efectos muy variados según el tipo de celular (O'Callaghan and Houston, 2015). En cáncer de próstata uno de los mecanismos antineoplásicos de 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> es la inhibición de la acción de la PGE<sub>2</sub> por medio de la disminución de la expresión de los EPs (Moreno et al., 2005). Teniendo en cuenta estos datos, en este trabajo de tesis se evaluó la expresión de los distintos EPs luego del tratamiento con 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Los resultados demostraron que los receptores de alta afinidad EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub> disminuyeron su expresión luego del tratamiento a diferentes tiempos, sin embargo, los receptores de baja afinidad EP<sub>1</sub> y EP<sub>2</sub> que requieren niveles significativamente mayores de PGE<sub>2</sub> para activarse se comportaron de forma diferente. Ambos EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> se encuentran

conectados con proteínas estimuladoras  $G\alpha$ , las cuales a través de la activación del adenilato ciclasa aumentan los niveles de AMPc lo que lleva a la activación de PKA o de la vía GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenina. Consecuentemente, a pesar de estar unidos a la misma proteína G, la diferente afinidad a PGE2 expone una supresión diferencial por parte de  $1\alpha,25(OH)_2D_3$ , a través de la regulación de la expresión de los receptores EPs. Existen reportes de una retroalimentación autocrina positiva entre PGE2 y los receptores EP2 y EP4 para inducir la producción de COX-2 (Bradbury et al., 2003; Díaz-Muñoz et al., 2012), este mecanismo reforzado debido a la disminución de la producción de PGE2 podría explicar la baja actividad de COX-2 con una alta expresión. Sin embargo, se necesitan más estudios para esclarecer el efecto de  $1\alpha,25(OH)_2D_3$  en la actividad biológica de PGE2.

## **Conclusión**

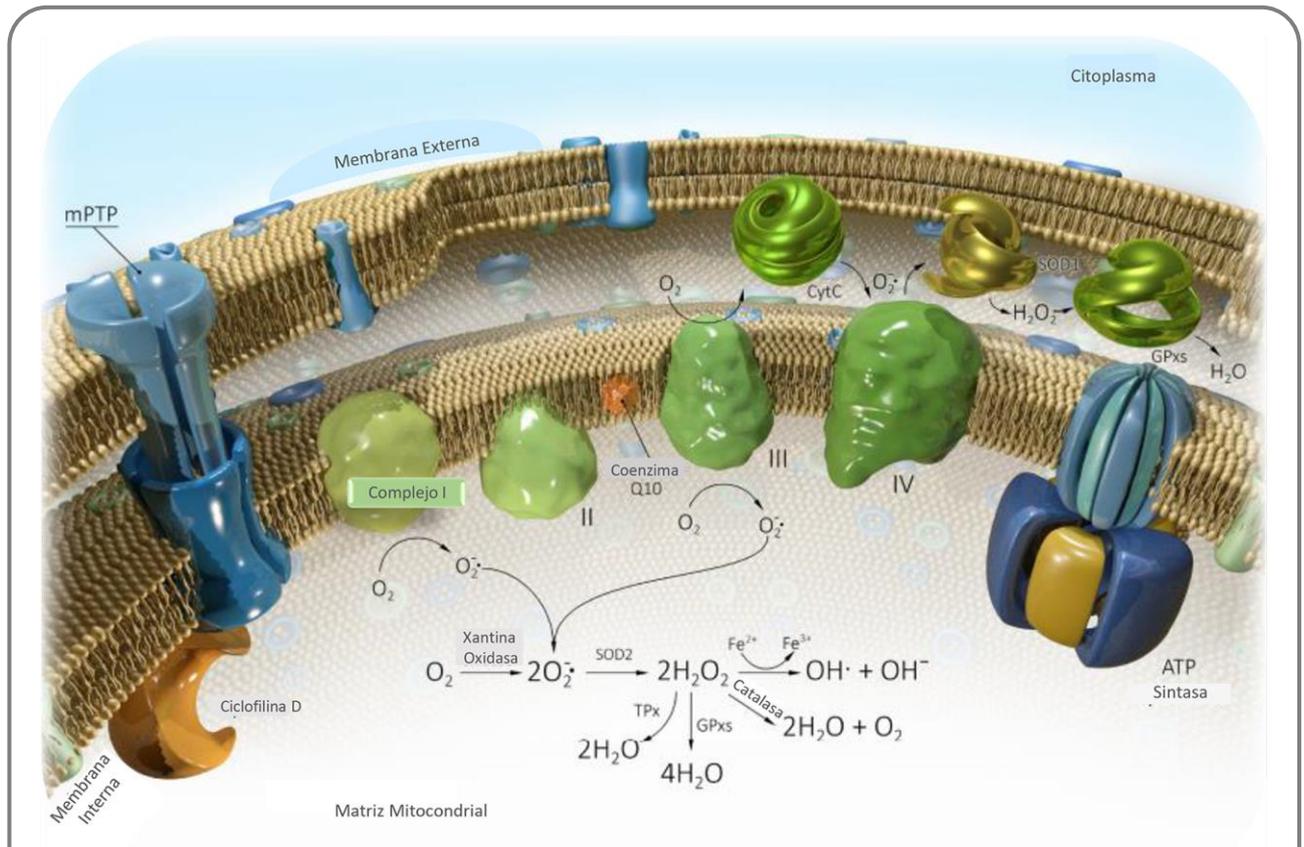
En éste capítulo de tesis, se obtuvo evidencia que demuestra que el  $1\alpha,25(OH)_2D_3$  ejerce su efecto antiproliferativo en células vGPCR a través de la modulación de la vía de señalización inflamatoria de COX-2 por un mecanismo que involucra dos acciones dependientes del tiempo de exposición. Tempranamente, disminuye la actividad enzimática de COX-2 por medio de la interacción entre VDR y COX-2 que consecuentemente disminuye la síntesis de PGs; más tardíamente, suprime de manera diferencial la expresión de los receptores EPs.

# CAPÍTULO IV

EFECTO DEL  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  EN EL  
ESTRÉS OXIDATIVO: REGULACIÓN Y  
CONTRIBUCIÓN AL EFECTO  
ANTINEOPLÁSICO

# Introducción

La investigación de especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*: ROS) en sistemas biológicos es uno de los campos más dinámicos y complicados debido en parte a la dependencia fisiológica del estado del organismo y a la ausencia de herramientas técnicas confiables para la evaluación de los niveles absolutos y relativos (Lushchak, 2014). Los ROS son especies químicas con un electrón no apareado derivado del metabolismo del oxígeno molecular que, en estado fundamental, es biradical. Como contiene dos electrones desapareados en la capa externa con el mismo *spin*, el oxígeno sólo puede reaccionar con un electrón a la vez, por lo tanto, no es muy reactivo con los dos electrones en un enlace químico. Pero si uno de los dos electrones desapareados es excitado y cambia su *spin*, cambia el estado fundamental. La especie formada es un oxidante poderoso porque los dos electrones con *spines* opuestos pueden reaccionar rápidamente con otros pares de electrones, especialmente dobles enlaces (Slimen et al., 2014; Turrens, 2003). El anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), producto de la reducción del oxígeno en un electrón, es el precursor de la mayoría de los ROS y un mediador en reacciones en cadena oxidativas (Turrens, 2003). Más del 90% del oxígeno consumido en eucariotas es reducido en la respiración aeróbica directamente a agua a través de la cadena transportadora de electrones acoplada a la fosforilación oxidativa. Para esto la mitocondria contiene varios centros redox capaces de filtrar electrones al oxígeno, constituyendo la fuente primaria de  $O_2^{\bullet-}$  en la mayoría de los tejidos. El gradiente de protones generado produce ATP (**Figura IV.1**) (Kudryavtseva et al., 2016; Skulachev, 2012).



**Figura IV.1. Generación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria (mitROS).** Inicialmente el  $O_2$  se convierte a  $O_2^{\bullet-}$  por los complejos I y III. El complejo III genera  $O_2^{\bullet-}$  en la matriz y el espacio intermembrana. La concentración de estos complejos en la membrana mitocondrial interna depende del tejido, de la edad y el estado hormonal. Luego el anión  $O_2^{\bullet-}$  se convierte a  $H_2O_2$  por SOD. El  $H_2O_2$  también puede detoxificarse por GPxs, TPx y catalasa. **Complejo I**-NADH deshidrogenasa; **II**-Succinato deshidrogenasa; **III**-bc1; **IV**-Citocromo C oxidasa; **V**-ATP sintasa; Q-Ubiquinona, Cyt C-Citocromo C, Ciclofilina D, mPTP-Poro de transición de permeabilidad mitocondrial, SOD-Superóxido dismutasa, GPxs-Glutación peroxidasa, TPx-Tiorredoxina peroxidasa (Modificado de A. V. Kudryavtseva, et al, 2016).

En menor proporción pueden generarse por cadenas transportadoras en retículo endoplásmico y en la membrana nuclear, y por algunas oxidasas, entre éstas, la más estudiada es el complejo NADPH oxidasa (Skulachev, 2012). Éste, a su vez, es una de las principales fuentes de ROS en la vasculatura (Harrison et al., 2000), donde puede estimular diversas vías de señalización redox vinculadas a la angiogénesis (Ushio-Fukai, 2006). Dentro de los ROS se incluyen el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y los radicales hidroxilos ( $OH^{\bullet}$ ) entre otros (Winterbourn et al., 2016), además del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Éste último, no es un radical libre, es decir, una especie química independiente con uno o más electrones no apareados (Li et al., 2016). No obstante, es una molécula químicamente más reactiva que el oxígeno molecular, por lo que se la considera también como ROS.

Durante condiciones fisiológicas normales, los ROS son producidos principalmente por las mitocondrias y las NADPH oxidasas (Shehat and Tigno-Aranjuez, 2019). Pueden desempeñar un papel en la señalización intracelular redox de respuestas celulares fisiológicas como la regulación del metabolismo celular, proliferación, supervivencia, señalización inflamatoria y envejecimiento (Schieber and Chandel, 2014). De lo contrario, rápidamente varias enzimas y proteínas como la superóxido dismutasa y el glutatión se encargan de su remoción (Shehat and Tigno-Aranjuez, 2019). Cuando se generan ROS en exceso, provenientes de fuentes exógenas o endógenas, y los sistemas de defensa antioxidante son inadecuados para eliminarlos o el sistema de defensa antioxidante deteriorado es incapaz de competir con los niveles fisiológicos de ROS, el balance entre los prooxidantes y los antioxidantes se ve afectado a favor del primero, lo que se denomina estrés oxidativo (Gurer-Orhan et al., 2017; Shehat and Tigno-Aranjuez, 2019) (**Figura IV.2**). El término, estrés oxidativo fue inicialmente acuñado en 1985 por Helmut Sies, se refiere

a la condición donde los niveles de ROS abruma significativamente la capacidad de defensa antioxidante, capaz de generar un daño significativo en un sistema biológico (Li et al., 2016). El estrés oxidativo puede resultar en adaptación o lesión celular. La adaptación ocurre generalmente a través de la estimulación de los sistemas de defensa antioxidante para restablecer el equilibrio prooxidante/antioxidante. La lesión en cambio, ocurre cuando las células no pueden eliminar el exceso de ROS (Gurer-Orhan et al., 2017), de la magnitud de este aumento depende el efecto. Fluctuaciones moderadas pueden causar disfunción celular y un comportamiento alterado, pero aumentos descontrolados de éstos oxidantes llevan a reacciones en cadena mediadas por radicales libres que se dirigen indiscriminadamente a atacar moléculas nucleofílicas cercanas como proteínas, lípidos y ADN, provocando estados patológicos e inclusive la muerte celular (Li et al., 2016; Turrens, 2003).

El estrés oxidativo también es una característica común en muchos tipos de células cancerosas (Poprac et al., 2017), varias investigaciones han definido a los ROS como agentes promotores o supresores de tumores, con abundante evidencia para ambos argumentos (Wang and Yi, 2008) dado que participan en la regulación del ciclo celular y la angiogénesis. Sin embargo, los eventos moleculares específicos que los vinculan con el desarrollo del cáncer no han sido esclarecidos por completo. Existen reportes que indican altos niveles de ROS en células que expresan vGPCR producto de la acción de Rac1, cuyo rol es importante en la angiogénesis (Ma et al., 2013). Consecuentemente, se estudió si en las células endoteliales que expresan vGPCR existe una regulación de los niveles de ROS por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  como parte del mecanismo de acción antiproliferativo.



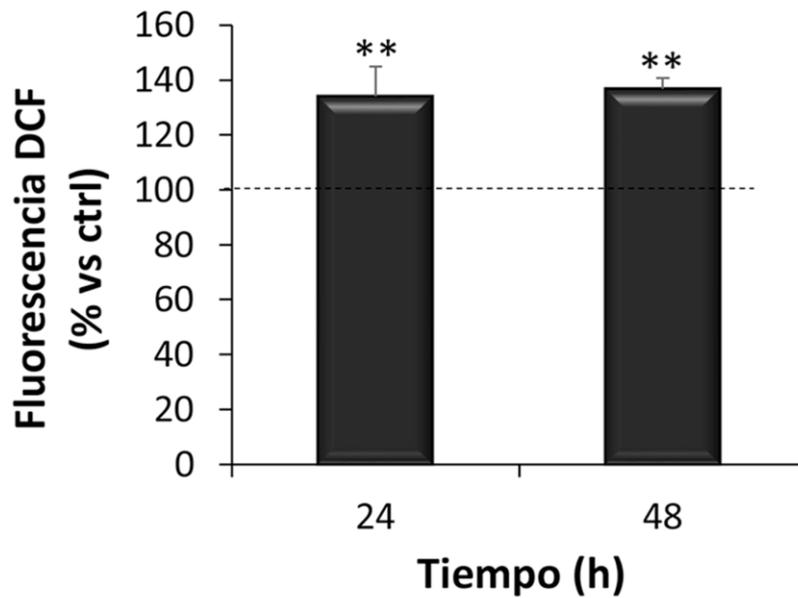
**Figura IV.2. Esquema de la generación de estrés oxidativo.** El estrés oxidativo es causado por una mayor formación de ROS o una disminución de las defensas antioxidantes o ambos. Es importante distinguir el estrés oxidativo de la señalización redox. El estrés oxidativo enfatiza el efecto potencial perjudicial del aumento de ROS, mientras que la señalización redox conlleva la participación de ROS en la transducción de señalización de la célula que produce respuestas fisiológicas (Modificado de R. Li, et al, 2016).

# Resultados

## **La generación de ROS por $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aumenta en forma dependiente del del VDR**

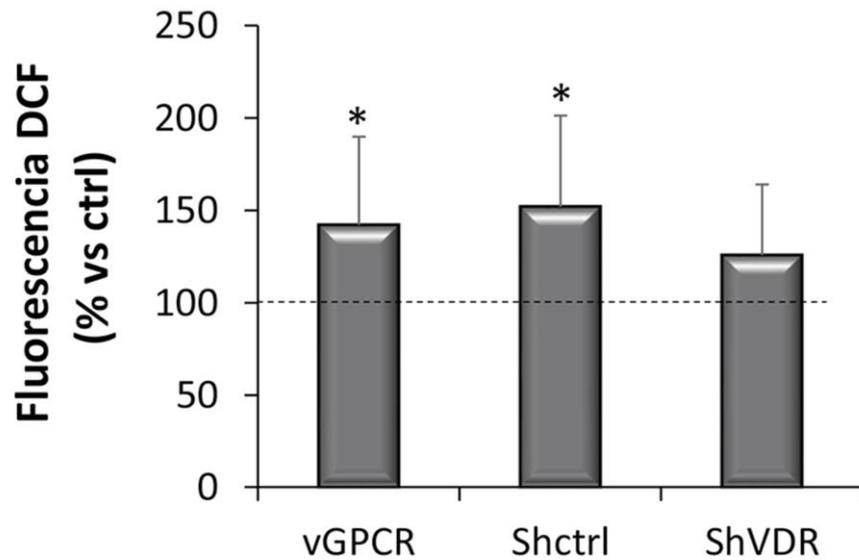
Varios reportes demuestran que la producción de ROS disminuye luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . En queratinocitos humanos, el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y análogos aumentan la expresión de proteínas encargadas de la remoción de ROS, como superóxidos dismutasa 1 y 2 (SOD1 y 2) y catalasa, inducidas previamente por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , desempeñando así un rol protector frente al estrés oxidativo (P. Anna, et al, 2016). En ratones que no expresan la enzima  $1\alpha(\text{OH})\text{asa}/-$ , tejidos tumorales contienen niveles de SOD2 reducidos y biomarcadores de daño celular aumentados; para aloinjertos tumorales, los niveles de ROS son elevados y la expresión de proteínas antioxidantes como SOD2 se encuentra disminuida (Chen et al., 2018). Estos reportes indican los efectos preventivo y protector del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  frente a la tumorigenesis mediante la inhibición del estrés oxidativo y del daño al ADN. No obstante, existe evidencia donde el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o análogos aumentan el estrés oxidativo en osteoblastos humanos, en parte, a través de la inducción de la expresión y actividad de la lipooxigenasa, enzima productora de leucotrienos por oxidación del ácido araquidónico (Somjen et al., 2011). Diversos ensayos clínicos de pacientes suplementados con Vitamina D no han sido capaces de demostrar unánimemente su capacidad antioxidante. Dado que resulta controversial la evidencia actual sobre su habilidad para prevenir o disminuir biomarcadores de estrés oxidativo (Tagliaferri et al., 2019). En base a estos antecedentes, se evaluó la generación de especies oxidantes luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en células endoteliales que expresan constitutivamente el vGPCR. En primer lugar, las células se cultivaron y

trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (10 nM) o vehículo (0,01% de etanol) por 24 y 48 horas. Posteriormente, se cuantificaron los niveles de ROS por espectrofluorimetría mediante el monitoreo de la oxidación de la sonda H<sub>2</sub>-DCF-DA como se describió previamente en Materiales y Métodos. Los resultados en la **Figura IV.3** muestran que los niveles de ROS aumentaron por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en ambos periodos de tiempo.



**Figura IV.3.** El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aumenta los niveles de ROS en células vGPCR. Las células vGPCR se sembraron y se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D, 10 nM) o vehículo (0,01% de etanol) por 24 y 48 h. Finalizado el tratamiento se cuantificaron los niveles de ROS por espectrofluorimetría. El gráfico de barras muestra los niveles de oxidantes celulares en porcentaje con respecto al control por  $\mu\text{g}$  de proteínas. La significancia estadística de los resultados se evaluó por la prueba *t* de Student (\*\* $p < 0,01$ ) ( $n \geq 3$ ).

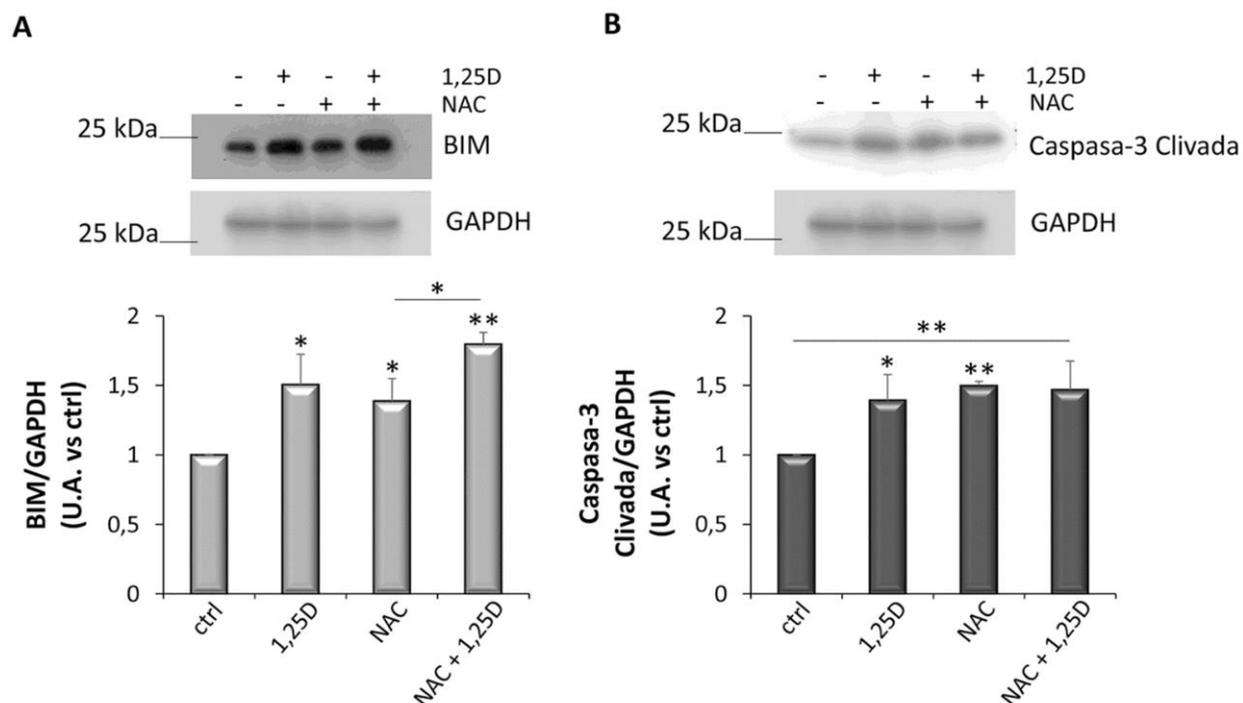
A continuación, se investigó si éste aumento en la producción de ROS es dependiente del VDR. Para ello, se empleó la línea celular vGPCR que presenta el VDR silenciado (-shVDR) establemente o su control (-shctrl) adicionalmente a la línea vGPCR, debido a la variabilidad propia del ensayo que afecta su cuantificación (Shehat and Tigno-Aranjuez, 2019). Las células se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (10 nM) o vehículo (0,01% de etanol) por 48 horas. Luego, los niveles de especies reactivas se midieron por espectrofluorimetría (**Figura IV.4**). En primer lugar, se observó que el aumento de ROS por el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en las células vGPCR es similar a las células vGPCR-shctrl, corroborando que la presencia del shARN control no afecta la producción de ROS. En segundo lugar, en la línea celular con el VDR silenciado (vGPCR -shVDR) no se observó un aumento significativo en los niveles de ROS comparado con el control, efecto que indica la dependencia del VDR.



**Figura IV.4. El Aumento de ROS por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  es dependiente del VDR.** Las células vGPCR, vGPCR-shctrl (shctrl) y vGPCR-shVDR (shVDR) se sembraron y se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D, 10 nM) o vehículo (0,01% de etanol) por 48 h. Finalizado el tratamiento se cuantificaron los niveles de ROS por espectrofluorimetría. El gráfico de barras muestra los niveles de oxidantes celulares en porcentaje con respecto al control por  $\mu\text{g}$  de proteínas. La significancia estadística de los resultados se evaluó por la prueba t de Student (\* $p < 0,05$ ) ( $n \geq 5$ ).

## **El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce la apoptosis mediante la producción de ROS**

La vitamina D y sus derivados presentan un mecanismo complejo para efectuar acciones protectoras frente al estrés oxidativo. En la epidermis humana, una vez que los niveles de ROS exceden la capacidad del sistema de defensa celular, formas activas de la vitamina D incrementan el efecto de los prooxidantes llevando a la apoptosis, lo que resulta efectivo a la hora de eliminar células malignas (Piotrowska et al., 2016). En base a estos datos preexistentes, se estudió la posible relación entre los dos efectos del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , el incremento de ROS y la apoptosis. Las células vGPCR se cultivaron y trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (10 nM), NAC (N-acetil cisteína) (1 mM) o vehículo (0,01% de etanol) por 48 horas, tiempo dónde previamente se observó arresto del ciclo celular e inducción de la apoptosis por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en las células vGPCR (González Pardo et al., 2014). Los niveles de las proteínas proapoptóticas BIM y caspasa-3 clivada se analizaron a partir de lisados celulares por Western blot. El análisis de la cuantificación de los inmunoblots en la **Figura IV.5** muestra que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aumentó significativamente los niveles proteicos de BIM y provocó el clivaje de caspasa-3 como previamente fue reportado por el grupo, y éste aumento fue comparable al producido por el antioxidante NAC. Sin embargo, el tratamiento combinado de NAC con la hormona, no reveló un efecto preventivo, por el contrario, potenció el aumento en los niveles proteicos de BIM, mientras que se observó similar efecto para caspasa-3 clivada cuando los compuestos se adicionaron individualmente.



**Figura IV.5. El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y NAC inducen la expresión de BIM y clivaje de caspasa-3.**

Las células vGPCR se sembraron y se trataron con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D) o NAC (1 Mm) o vehículo (0,01% de etanol) por 48 h. Los niveles proteicos de BIM (A) y caspasa-3 clivada (B) se analizaron por Western blot, se muestran blots representativos. Los gráficos de barras indican la cuantificación de las bandas normalizadas con GAPDH. El análisis estadístico de los resultados para cada condición con respecto al control y, para los grupos (NAC vs NAC + 1,25D; ctrl vs NAC + 1,25D) se realizó por la prueba *t* de Student (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ;  $n = 3$ ).

# Discusión

Durante varias décadas, se asumió que la transformación de células normales en cancerosas dependía de la activación de un oncogén o la inactivación de un gen supresor tumoral, hipótesis conocida como adicción oncogénica (Weinstein and Joe, 2008), a raíz de la cual se desarrollaron medicamentos dirigidos contra oncogenes y/o genes supresores tumorales. Sin embargo, las células cancerosas pueden adaptarse a una homeostasis redox alterada debido al rápido crecimiento y, pueden desarrollar vías metabólicas alternativas desensibilizándose a estresores exógenos como la quimioterapia y la radiación (Jones and Thompson, 2009). La plasticidad metabólica de las células cancerosas permite cambios dinámicos en la función mitocondrial para hacer frente al estrés energético y oxidativo. Procesos como la glucólisis o la fosforilación oxidativa pueden ser utilizados para superar las modificaciones por el ambiente tumoral o la demanda energética (Gill et al., 2016). Elevados niveles de ROS se consideran oncogénicos, dado que pueden activar la señalización protumorigénica, mejorar la supervivencia y la proliferación celular, impulsar el daño del ADN y la inestabilidad genética, estimular un crecimiento anormal, metástasis y angiogénesis (Moloney and Cotter, 2018).

El linfoma de efusión primaria (PEL) presenta células infectadas con el KSHV en estado latente, lo que actúa como barrera para la eliminación total de las células tumorales. El estrés oxidativo generado por el aumento de ROS induce la reactivación del KSHV y la consecuente apoptosis causada por el ingreso a fase lítica (Li et al., 2011). Estudios *in vitro* del SK asociado a SIDA ha demostrado que las células tumorales presentan una capacidad de eliminación de oxidantes debilitada por expresar niveles significativamente más bajos de glutatión (GSH) y NADPH. Esto las

hace inherentemente susceptibles a las consecuencias nocivos y tumorigénicas del estrés oxidativo (Mallery et al., 2004). En células que expresan el vGPCR la inducción de ROS por KSHV es una de las causas que promueve la oncogénesis del SK, estimulando la proliferación y la angiogénesis (Ma et al., 2013). En este sentido, enfoques terapéuticos mas prometedores dirigidos a modular el estrés oxidativo han sido reportados (Halliwell, 2007; Poprac et al., 2017). Los efectos de ROS parecen depender de la etapa en la que se encuentre el desarrollo del tumor. En estadios precancerosos, existe un decaimiento en el nivel de defensa antioxidante. La posterior acumulación de ROS intracelular conduce al daño oxidativo del ADN y a mutaciones en oncogenes y genes supresores tumorales, que promueven el desarrollo cancerígeno. Posteriormente, al adquirir un fenotipo maligno, la actividad de las enzimas antioxidantes y el conjunto intracelular de NADPH y GSH aumentan su actividad para tratar de limitar el daño oxidativo causado por la generación excesiva de ROS (Assi, 2017).

Varios estudios indican que la vitamina D actúa como agente antioxidante. En ratones que carecen de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o son deficientes en la expresión del VDR, la aparición de tumores espontáneos tiene una incidencia mayor (Chen et al., 2018). En queratinocitos, el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibe la activación de quinasas activadas por estrés como JNK y p38, determinantes para el destino celular en diferenciación o apoptosis (Ravid et al., 2002). En células de cordón umbilical humano (HUVEC), el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o análogos ejercen una acción protectora frente al estrés oxidativo cuando se administran en bajas concentraciones (Haas et al., 2016). Sin embargo, varios reportes denotan lo contrario. En osteoblastos, la vitamina D aumenta la producción de ROS resultando en un aumento de la proliferación celular y el metabolismo energético (Somjen et al., 2011). Diversos estudios clínicos

epidemiológicos en humanos demuestran que el rol de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  como antioxidante es controversial según la dosis del suplemento administrado (Tagliaferri et al., 2019). Los resultados en este trabajo de tesis revelaron que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aumentó la producción de ROS más del 40% luego de 48 horas de tratamiento. Asimismo, la inducción de estrés oxidativo resultó ser dependiente del VDR. En el tiempo de tratamiento evaluado, reportes previos de nuestro grupo indican que la proliferación de células vGPCR disminuye en un 80% por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , a su vez, se induce el arresto del ciclo celular y apoptosis por un mecanismo dependiente del clivaje de caspasa-3 (González Pardo et al., 2014, 2010). En este sentido, se encontró que la inducción de la apoptosis involucra el aumento de ROS por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  analizando la expresión de proteínas pro-apoptótica BIM y caspasa-3 clivada. En los resultados obtenidos se observó que el antioxidante NAC no tuvo la capacidad de revertir el efecto del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , probablemente el mecanismo de detoxificación no dependa exclusivamente de la síntesis de GSH. Sin embargo, aunque los antioxidantes ayudan a las células tumorales a escapar de las lesiones oxidativas inducidas por ROS (Assi, 2017), cuando su acción es insuficiente y los niveles de ROS resultan tóxicos, la célula tumoral recurre a la apoptosis (Moloney and Cotter, 2018). Estos datos sugieren que una de las vías del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  para inducir la apoptosis, a la concentración empleada, es la promoción de especies reactivas de oxígeno.

## **Conclusión**

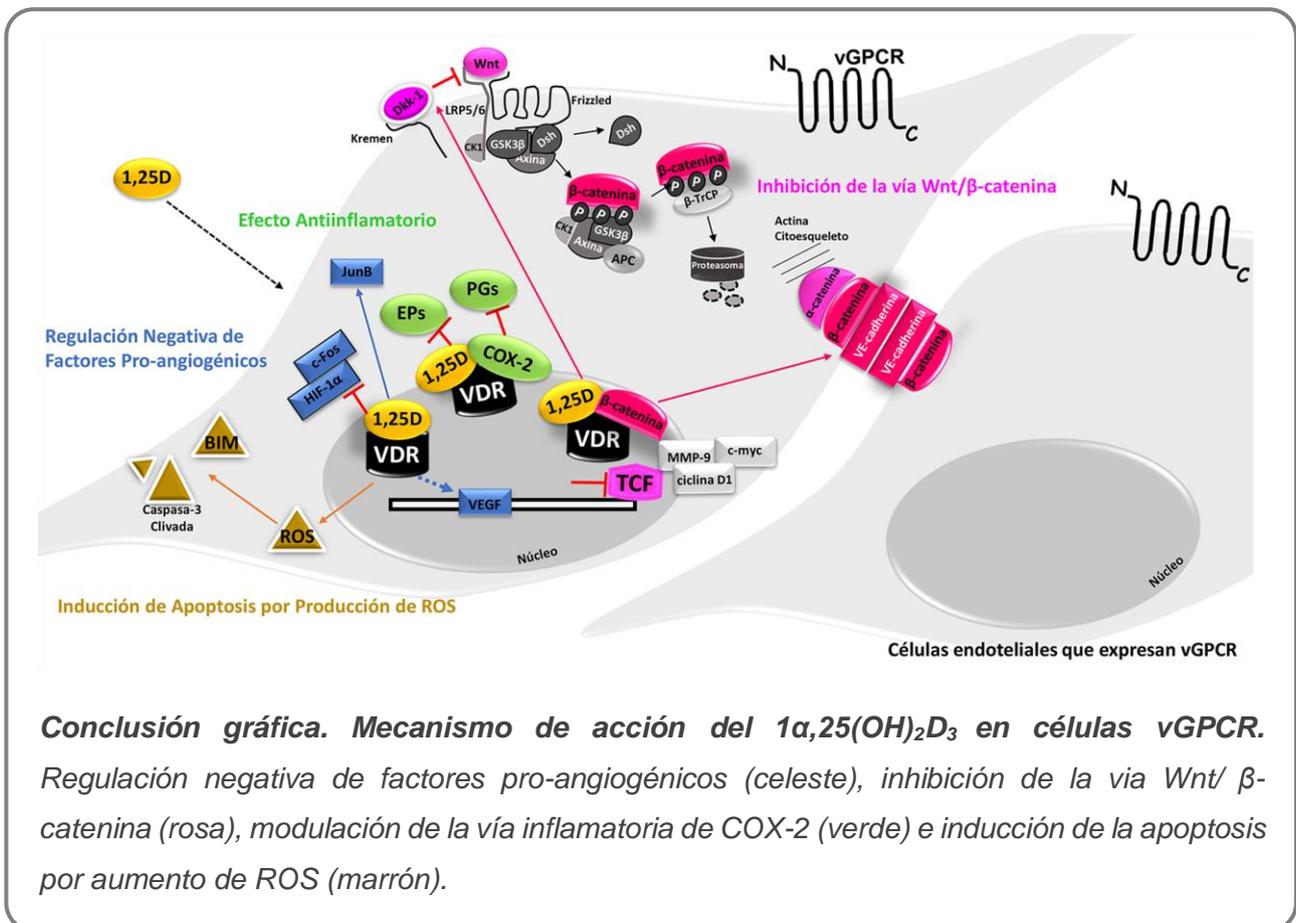
Éste capítulo de tesis proporciona evidencia que indica que el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induce la apoptosis mediante el aumento de la producción de ROS como parte de su efecto anti-proliferativo en células que expresan el vGPCR.

# CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos de este trabajo de tesis doctoral aportan conocimiento sobre el mecanismo de acción anti-angiogénico y antiinflamatorio del  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en un modelo celular murino de sarcoma de Kaposi. Simultáneamente, sustenta el fundamento para la continuidad en estudios con modelos *in vivo* y para la valoración del uso de análogos de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  menos calcemiantes en el tratamiento de esta patología (**Conclusión gráfica**).

1. En condiciones de estrés celular como la hipoxia, el  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  regula negativamente factores pro-angiogénicos activados:
  - 1.1.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aumentó la expresión del mensajero del factor anti-oncogénico JunB. Asimismo, provocó una disminución el mensajero del factor pro-oncogénico c-Fos pero solo durante cortos periodos de tiempo.
  - 1.2. HIF-1 $\alpha$  disminuyó su expresión en forma dependiente del VDR luego del tratamiento con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , no así VEGF. Contrario a lo esperado, aumentó independientemente de la disminución de HIF-1 $\alpha$  y EGR-1. Esta diferencia pudo deberse a una regulación directa del promotor de VEGF por parte del VDR.
2. La vía Wnt/  $\beta$ -catenina es suprimida por  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  o análogo TX 527 en células vGPCR a través de tres mecanismos diferentes:
  - 2.1. El inhibidor extracelular Dkk-1 aumentó inicialmente lo que que disminuyó los niveles de  $\beta$ -catenina.
  - 2.2. La asociación VDR- $\beta$ -catenina redujo la actividad transcripcional de genes diana del ligando Wnt como c-myc, Mmp-9 y ciclina D1.
  - 2.3. El aumento de VE-cadherina indujo la relocalización de  $\beta$ -catenina en la membrana plasmática.

3. El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  modula la vía de señalización inflamatoria de COX-2 en células vGPCR, por un mecanismo que involucra dos acciones dependientes del tiempo de exposición:
  - 3.1. Tempranamente, la interacción entre VDR y COX-2 disminuyó la actividad enzimática de COX-2 y consecuentemente la síntesis de PGs.
  - 3.2. Tardíamente, suprimió de manera diferencial la expresión de los receptores EPs.
4. El  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  indujo la apoptosis por un aumento de la producción de ROS como parte de su efecto anti-proliferativo en células que expresan el vGPCR.



# BIBLIOGRAFÍA

- Abitbol, S., Dahmani, R., Coulouarn, C., Ragazzon, B., Mlecnik, B., Senni, N., Savall, M., Bossard, P., Sohier, P., Drouet, V., Tournier, E., Dumont, F., Sanson, R., Calderaro, J., Zucman-Rossi, J., Vasseur-Cognet, M., Just, P.A., Terris, B., Perret, C., Gilgenkrantz, H., 2018. AXIN deficiency in human and mouse hepatocytes induces hepatocellular carcinoma in the absence of  $\beta$ -catenin activation. *J. Hepatol.* 68, 1203–1213. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.12.018>
- Aggarwal, B.B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R.S., Seeram, N.P., Shishodia, S., Takada, Y., 2004. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies, *Anticancer Research.*
- Aguilera, O., Peña, C., García, J.M., Larriba, M.J., Ordóñez-Morán, P., Navarro, D., Barbáchano, A., López de Silanes, I., Ballestar, E., Fraga, M.F., Esteller, M., Gamallo, C., Bonilla, F., González-Sancho, J.M., Muñoz, A., 2007. The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is induced by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 associated to the differentiation of human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 28, 1877–84. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm094>
- 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>
- Anderson, P.H., Turner, A.G., Morris, H.A., 2012. Vitamin D actions to regulate calcium and skeletal homeostasis. *Clin. Biochem.* 45, 880–886. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.02.020>
- 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* 11, 218. <https://doi.org/10.1186/s12985-014-0218-8>
- Arasteh, K., Hannah, A., 2000. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Restenosis. *Oncologist* 5, 28–31. [https://doi.org/https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-suppl\\_1-28](https://doi.org/https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-suppl_1-28)
- Assi, M., 2017. The differential role of reactive oxygen species in early and late stages of cancer. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 313, R646–R653. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00247.2017>
- 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>
- Baek, J.H., Yim, J.H., Song, J.Y., Um, H.D., Park, J.K., Park, I.C., Kim, J.S., Lee, C.W., Hong, E.H., Kim, E.H., Hwang, S.G., 2018. Knockdown of end-binding protein 1 induces apoptosis in radioresistant A549 lung cancer cells via p38 kinase-dependent COX-2 upregulation. *Oncol. Rep.* 39, 1565–1572. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6278>
- Bais, C., Van Geelen, A., Eroles, P., Mutlu, A., Chiozzini, C., Dias, S., Silverstein, R.L., Rafii, S., Mesri, E.A., 2003. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus G protein-coupled receptor immortalizes human endothelial cells by activation of the VEGF receptor-2/KDR. *Cancer Cell* 3, 131–143. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00024-2](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00024-2)
- Beildeck, M.E., Gelmann, E.P., Byers, S.W., 2011. Cross-regulation of signaling pathways: an example of nuclear hormone receptors and the canonical Wnt pathway. *Cell* 146, 1763–1772. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.001>. Cross-regulation
- Ben-Shoshan, M., Amir, S., Dang, D.T., Dang, L.H., Weisman, Y., Majeesh, N.J., 2007. 1,25-dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol) inhibits hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway in human cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 6, 1433–1439. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0677>
- Benkert, P., Biasini, M., Schwede, T., 2011. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* 27, 343–350. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>

- Berman, H.M., Westbrook, J.D., Feng, Z., Gilliland, G.L., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E., 2000. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235–242. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., Schwede, T., 2017. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Sci. Rep.* 7, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09654-8>
- Bienert, S., Waterhouse, A., De Beer, T.A.P., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., Schwede, T., 2017. The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality. *Nucleic Acids Res.* 45, D313–D319. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1132>
- 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>. Vitamin
- Bikle, D.D., 2012. Vitamin D and bone. *Curr. Osteoporos. Rep.* 10, 151–159. <https://doi.org/10.1007/s11914-012-0098-z>
- Bikle, D.D., 2010. VITAMIN D: Newly Discovered Actions Require Reconsideration of Physiologic Requirements Vitamin D production Two forms of vitamin D exist: vitamin D 3 (cholecalciferol) and vitamin D 2 (ergocalciferol). *Trends Endocrinol Metab* 21, 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.01.003>
- Bivins, R., 2014. Ideology and disease identity: The politics of rickets, 1929-1982. *Med. Humanit.* 40, 3–10. <https://doi.org/10.1136/medhum-2013-010400>
- Blobaum, A.L., Marnett, L.J., 2007. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *J. Med. Chem.* 50, 1425–1441. <https://doi.org/10.1021/jm0613166>
- Bouillon, R., Verlinden, L., Eelen, G., De Clercq, P., Vandewalle, M., Mathieu, C., Verstuyf, A., 2005. Mechanisms for the selective action of Vitamin D analogs. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 97, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2005.06.013>
- Bover, J., Egido, J., Fernández-Giráldez, E., Praga, M., Solozábal-Campos, C., Torregrosa, J. V., Martínez-Castelao, A., 2015. Vitamina D, receptor de la vitamina D e importancia de su activación en el paciente con enfermedad renal crónica. *Nefrología* 35, 28–41. <https://doi.org/10.3265/Nefrologia.pre2014.Sep.11796>
- Bradbury, D.A., Newton, R., Zhu, Y.M., El-Haroun, H., Corbett, L., Knox, A.J., 2003. Cyclooxygenase-2 Induction by Bradykinin in Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells Is Mediated by the Cyclic AMP Response Element through a Novel Autocrine Loop Involving Endogenous Prostaglandin E<sub>2</sub>, E-prostanoid 2 (EP<sub>2</sub>), and EP<sub>4</sub> Receptors. *J. Biol. Chem.* 278, 49954–49964. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307964200>
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Brown, J.M., Wilson, W.R., 2004. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer* 4, 437–447. <https://doi.org/10.1038/nrc1367>
- Brown, L.F., Berse, B., Jackman, R.W., Tognazzi, K., Guidi, A.J., Dvorak, H.F., Senger, D.R., Connolly, J.L., Stuart J. Schnitt, M., 1995. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum. Pathol.* 26, 86–91. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0046-8177\(95\)90119-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0046-8177(95)90119-1)
- Butt, A.Q., Miggin, S.M., 2012. Cancer and viruses: A double-edged sword. *Proteomics* 12, 2127–2138. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100526>
- Cadigan, K.M., Waterman, M.L., 2012. TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, 1–22. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007906>
- Callo, R.C., 1998. The Enigmas of Kaposi ' s Sarcoma. *Science* 282, 1837–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/science.282.5395.1837>
- Cancian, L., Hansen, A., Boshoff, C., 2013. Cellular origin of Kaposi's sarcoma and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-induced cell reprogramming. *Trends Cell Biol.* 23, 421–432. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.04.001>
- Candelieri, G.A., Prud, J., St-arnaud, R., 1991. Differential Stimulation of Fos and Jun Family Members by Calcitriol in Osteoblastic Cells. *Mol. Endocrinol.* 5, 1780–1788.
- Cardillo, I., Spugnini, E.P., Verdina, A., Galati, R., Citro, G., Baldi, A., 2005. Cox and mesothelioma: An overview. *Histol. Histopathol.* 20, 1267–1274.

- <https://doi.org/10.14670/HH-20.1267>
- Cardus, A., Panizo, S., Encinas, M., Dolcet, X., Gallego, C., Aldea, M., Fernandez, E., Valdivielso, J.M., 2009. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> regulates VEGF production through a vitamin D response element in the VEGF promoter. *Atherosclerosis* 204, 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.08.020>
- Carlberg, C., Molnar, F., 2012. Current Status of Vitamin D Signaling and Its Therapeutic Applications. *Curr. Top. Med. Chem.* 12, 528–547. <https://doi.org/10.2174/156802612799436623>
- Carlberg, C., Seuter, S., 2007. The Vitamin D Receptor. *Dermatol. Clin.* 25, 515–523. <https://doi.org/10.1016/j.det.2007.06.004>
- Carroll, V.A., Ashcroft, M., 2005. Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert Rev. Mol. Med.* 7, 1–16. <https://doi.org/10.1017/S1462399405009117>
- 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, 5–8. <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>
- Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M.S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D.M., Moore, P.S., 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* (80-. ). 266, 1865–1869. <https://doi.org/10.1126/science.7997879>
- Cheadle, W.B., 1888. A Discussion on Rickets, INTRODUCTORY REMARKS ON ETIOLOGY; PREVENTION; CONNECTION WITH SYPHILIS AND SCURVY; NATURE OF THE ENLARGEMENT OF THE LIVER AND SPLEEN; TREATMENT. *Br. Med. J.* 2, 1145–1148.
- Chen, L., Yang, R., Qiao, W., Yuan, X., Wang, S., Goltzman, D., Miao, D., 2018. 1,25-Dihydroxy vitamin D prevents tumorigenesis by inhibiting oxidative stress and inducing tumor cellular senescence in mice. *Int. J. Cancer* 143, 368–382. <https://doi.org/10.1002/ijc.31317>
- Chick, H., Dalyell, E.J., Hume, M., Smith, H.H., Mackay, H.M.M., 1922. the  $\text{\AA}$ etiology of Rickets in Infants : Prophylactic and Curative Observations At the Vienna University Kinderklinik. *Lancet* 200, 7–11. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)00835-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)00835-2)
- Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., Verlinden, L., Carmeliet, G., 2015. Vitamin D: Metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiol. Rev.* 96, 365–408. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2015>
- Christofori, G., Semb, H., 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* 24, 73–6. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01343-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01343-7)
- Clevers, H., Nusse, R., 2012. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell* 149, 1192–205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.012>
- Cordes, T., Hoellen, F., Dittmer, C., Salehin, D., Kümmel, S., Friedrich, M., Köster, F., Becker, S., Diedrich, K., Thill, M., 2012. Correlation of prostaglandin metabolizing enzymes and serum PGE<sub>2</sub> levels with vitamin D receptor and serum 25(OH) D<sub>3</sub> levels in breast and ovarian cancer. *Anticancer Res.* 32, 351–357. <https://doi.org/10.3233/153113121200000000> [pii]
- Coşkun, G.P., Djikic, T., Hayal, T.B., Türkel, N., Yelekçi, K., Şahin, F., Küçükgülzel, G., 2018. Synthesis, molecular docking and anticancer activity of diflunisal derivatives as cyclooxygenase enzyme inhibitors. *Molecules* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23081969>
- Curran, T., MacConnell, W.P., van Straaten, F., Verma, I.M., 1983. Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the v-fos gene from mouse and human cells. *Mol. Cell. Biol.* 3, 914–921. <https://doi.org/10.1128/mcb.3.5.914>
- Dang, C. V., O'Donnell, K.A., Zeller, K.I., Nguyen, T., Osthus, R.C., Li, F., 2006. The c-Myc target gene network. *Semin. Cancer Biol.* 16, 253–264.

- <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.07.014>
- Dannenber, A.J., Lippman, S.M., Mann, J.R., Subbaramaiah, K., DuBois, R.N., 2005. Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: Pharmacologic targets for chemoprevention. *J. Clin. Oncol.* 23, 254–266. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.09.112>
- Dannenber, A.J., Subbaramaiah, K., 2003. Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: Rationale and promise. *Cancer Cell* 4, 431–436. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00310-6](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00310-6)
- 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>
- 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>
- DeWitt, D.L., Smith, W.L., 1988. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 1412–1416. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.5.1412>
- Díaz-Muñoz, M.D., Osma-García, I.C., Fresno, M., Iñiguez, M.A., 2012. Involvement of PGE2 and the cAMP signalling pathway in the up-regulation of COX-2 and mPGES-1 expression in LPS-activated macrophages. *Biochem. J.* 443, 451–461. <https://doi.org/10.1042/BJ20111052>
- Dixon, K.M., Mason, R.S., 2008. Vitamin D. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 982–985. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.06.016>
- Dolinsky, T.J., Czodrowski, P., Li, H., Nielsen, J.E., Jensen, J.H., Klebe, G., Baker, N.A., 2007. PDB2PQR: Expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic Acids Res.* 35, 522–525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm276>
- Dorland, Y.L., Huveneers, S., 2016. Cell–cell junctional mechanotransduction in endothelial remodeling. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 279–292. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2325-8>
- Dufour, M., Faes, S., Dormond-Meuwly, A., Demartines, N., Dormond, O., 2014. PGE2-induced colon cancer growth is mediated by mTORC1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451, 587–591. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.032>
- Dusso, A.S., Brown, A.J., Slatopolsky, E., 2005. Vitamin D. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 289, 8–28. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00336.2004>
- Dvorak, H.F., 2002. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J. Clin. Oncol.* 20, 4368–4380. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.10.088>
- Eelen, G., Gysemans, C., Verlinden, L., Vanoirbeek, E., De Clercq, P., Van Haver, D., Mathieu, C., Bouillon, R., Verstuyf, A., 2007. Mechanism and potential of the growth-inhibitory actions of vitamin D and analogs. *Curr. Med. Chem.* 14, 1893–910. <https://doi.org/10.2174/092986707781058823>
- Eelen, G., Verlinden, L., Van Camp, M., Claessens, F., De Clercq, P., Vandewalle, M., Bouillon, R., Verstuyf, A., 2005. Altered Vitamin D receptor-coactivator interactions reflect superagonism of Vitamin D analogs. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 97, 65–8. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2005.06.009>
- Eferl, R., Wagner, E.F., 2003. AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 3, 859–868. <https://doi.org/10.1038/nrc1209>
- Egashira, I., Takahashi-Yanaga, F., Nishida, R., Arioka, M., Igawa, K., Tomooka, K., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T., Nakabeppu, Y., Kitazono, T., Sasaguri, T., 2017. Celecoxib and 2,5-dimethylcelecoxib inhibit intestinal cancer growth by suppressing the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Cancer Sci.* 108, 108–115. <https://doi.org/10.1111/cas.13106>
- Engelsen, O., 2010. The relationship between ultraviolet radiation exposure and vitamin D status. *Nutrients* 2, 482–495. <https://doi.org/10.3390/nu2050482>
- Epstein, A.C.R., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y.M., Masson, N., Hamilton, D.L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield, C.J., Ratcliffe, P.J., 2001. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of

- dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107, 43–54. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00507-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00507-4)
- Fagotto, F., Gumbiner, B.M., 1996. Cell contact-dependent signaling. *Dev. Biol.* 180, 445–54. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0318>
- Farin, H.F., Jordens, I., Mosa, M.H., Basak, O., Korving, J., Tauriello, D.V.F., De Punder, K., Angers, S., Peters, P.J., Maurice, M.M., Clevers, H., 2016. Visualization of a short-range Wnt gradient in the intestinal stem-cell niche. *Nature* 530, 340–343. <https://doi.org/10.1038/nature16937>
- 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>
- Fitzgerald, D.J., FitzGerald, G.A., 2013. Historical Lessons in Translational Medicine: Cyclooxygenase Inhibition and P2Y12 Antagonism. *Circ Res.* 112, 174–194. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300271>
- 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 *James* 441, 61–76. <https://doi.org/10.1042/BJ20110744>
- Foletta, V.C., Segal, D.H., Cohen, D.R., 1998. Transcriptional regulation in the immune system: All roads lead to AP-1. *J. Leukoc. Biol.* 63, 139–152. <https://doi.org/10.1002/jlb.63.2.139>
- Folkman, J., 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1, 27–30. <https://doi.org/10.1038/nm0195-27>
- Francés, C., Lebbé, C., 2009. Kaposi ' S Sarcoma. *Ski. Cancer after Organ Transplantation*, 1–9. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-78574-5\\_24](https://doi.org/10.1007/978-0-387-78574-5_24)
- Friedrich, M., Reichert, K., Woeste, A., Polack, S., Fischer, D., Hoellen, F., Rody, A., Köster, F., Thill, M., 2018. Effects of combined treatment with Vitamin D and COX2 inhibitors on breast cancer cell lines. *Anticancer Res.* 38, 1201–1207. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12340>
- Fujimuro, M., Wu, F.Y., Aprhys, C., Kajumbula, H., Young, D.B., Hayward, G.S., Hayward, S.D., 2003. A novel viral mechanism for dysregulation of  $\beta$ -catenin in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency. *Nat. Med.* 9, 300–306. <https://doi.org/10.1038/nm829>
- Fujino, H., West, K.A., Regan, J.W., 2002. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 and stimulation of T-cell factor signaling following activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E2. *J. Biol. Chem.* 277, 2614–2619. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109440200>
- Fukuda, R., Kelly, B., Semenza, G.L., 2003. Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression in Colon Cancer Cells Exposed to Prostaglandin E(2) Is Mediated by Hypoxia-inducible Factor 1. *Cancer Res.* 63, 2330–2334.
- Garavito, R.M., Mulichak, A.M., 2003. The structure of mammalian cyclooxygenases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32, 183–206. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.141906>
- Giaccia, A., Siim, B.G., Johnson, R.S., 2003. HIF-1 as a target for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 803–811. <https://doi.org/10.1038/nrd1199>
- Gilaberte, Y., Aguilera, J., Carrascosa, J.M., Figueroa, F.L., Romaní De Gabriel, J., Nagore, E., 2011. Vitamin D: Evidence and controversies. *Actas Dermosifiliogr.* 102, 572–588. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2011.03.015>
- Gill, J.G., Piskounova, E., Morrison, S.J., 2016. Cancer, oxidative stress, and metastasis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 81, 163–175. <https://doi.org/10.1101/sqb.2016.81.030791>
- Gill, P.S., Tsai, Y.C., Rao, A.P., Spruck, C.H., Zheng, T., Harrington, W.A., Cheung, T., Nathwani, B., Jones, P.A., 1998. Evidence for multiclonality in multicentric Kaposi's sarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 8257–8261. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8257>

- Gilley, R., March, H.N., Cook, S.J., 2009. ERK1/2, but not ERK5, is necessary and sufficient for phosphorylation and activation of c-Fos. *Cell. Signal.* 21, 969–977. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.02.006>
- 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/https://doi.org/10.1006/meth.2001.1261>
- Glade, M.J., 2013. Vitamin D: Health panacea or false prophet? *Nutrition* 29, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.05.010>
- González-Sancho, J.M., Aguilera, O., García, J.M., Pendás-Franco, N., Peña, C., Cal, S., García de Herreros, A., Bonilla, F., Muñoz, A., 2005. The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* 24, 1098–1103. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208303>
- González Pardo, V., Boland, R., de Boland, A.R., 2008. Vitamin D receptor levels and binding are reduced in aged rat intestinal subcellular fractions. *Biogerontology* 9, 109–118. <https://doi.org/10.1007/s10522-007-9118-2>
- González Pardo, V., Boland, R., Russo de Boland, A., 2012a. Vitamina D y cáncer: acción antineoplásica de la 1 $\alpha$ , 25(OH) $_2$  -vitamina D3. *Rev. Med. (Buenos Aires)* 72, 143–149.
- González Pardo, V., D'Elia, N., Verstuyf, A., Boland, R., Russo de Boland, A., 2012b. NF $\kappa$ B pathway is down-regulated by 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ -vitamin D(3) 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>
- González Pardo, V., Martin, D., Gutkind, J.S., Verstuyf, A., Bouillon, R., de Boland, A.R., Boland, R.L., 2010. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 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 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D3 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>
- Goradel, N.H., Mohammadi, N., Haghi-Aminjan, H., Farhood, B., Negahdari, B., Sahebkar, A., 2018. Regulation of tumor angiogenesis by microRNAs: State of the art. *J. Cell. Physiol.* 1–12. <https://doi.org/10.1002/jcp.27051>
- Gulich, A.E., van Leeuwen, M.T., Falster, M.O., Vajdic, C.M., 2007. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* 370, 59–67. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61050-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61050-2)
- Guex, N., Peitsch, M.C., Schwede, T., 2009. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis* 30, 162–173. <https://doi.org/10.1002/elps.200900140>
- Gurer-Orhan, H., Ince, E., Konyar, D., Saso, L., Suzen, S., 2017. The Role of Oxidative Stress Modulators in Breast Cancer. *Curr. Med. Chem.* 25, 4084–4101. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170711114336>
- Gurram, B., Zhang, S., Li, M., Li, H., Xie, Y., Cui, H., Du, J., Fan, J., Wang, J., Peng, X., 2018. Celecoxib Conjugated Fluorescent Probe for Identification and Discrimination of Cyclooxygenase-2 Enzyme in Cancer Cells. *Anal. Chem.* 90, 5187–5193. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05337>
- Haas, M.J., Jafri, M., Wehmeier, K.R., Onstead-Haas, L.M., Mooradian, A.D., 2016. Inhibition of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress by vitamin D in endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 99, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.07.020>
- Halliwell, B., 2007. Oxidative stress and cancer: Have we moved forward? *Biochem. J.* 401,

- 1–11. <https://doi.org/10.1042/BJ20061131>
- 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>
- Harris, A.L., 2002. Hypoxia - A key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* 2, 38–47. <https://doi.org/10.1038/nrc704>
- Harrison, D.G., Editor, G., Oxidase, N.A.D.P.H., Griendling, K.K., Sorescu, D., Ushio-fukai, M., 2000. NAD(P)H Oxidase 494–501.
- Hashemi Goradel, N., Najafi, M., Salehi, E., Farhood, B., Mortezaee, K., 2019. Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. *J. Cell. Physiol.* 234, 5683–5699. <https://doi.org/10.1002/jcp.27411>
- 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>
- Hess, J., Angel, P., Schorpp-Kistner, M., 2004. AP-1 subunits: Quarrel and harmony among siblings. *J. Cell Sci.* 117, 5965–5973. <https://doi.org/10.1242/jcs.01589>
- Hickey, M.M., Simon, M.C., 2006. Regulation of Angiogenesis by Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors. *Curr. Top. Dev. Biol.* 76, 217–257. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(06\)76007-0](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(06)76007-0)
- Higgs, M.R., Lerat, H., Pawlotsky, J.M., 2013. Hepatitis C virus-induced activation of  $\beta$ -catenin promotes c-Myc expression and a cascade of pro-carcinogenic events. *Oncogene* 32, 4683–4693. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.484>
- Hii, C., Ferrante, A., 2016. The non-genomic actions of vitamin D. *Nutrients* 8, 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu8030135>
- Hirota, K., Semenza, G.L., 2006. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 59, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2005.12.003>
- Hlaing, S.M., Garcia, L.A., Contreras, J.R., Norris, K.C., Ferrini, M.G., Artaza, J.N., 2014. 1,25-vitamin D<sub>3</sub> promotes cardiac differentiation through modulation of the WNT signaling pathway. *J. Mol. Endocrinol.* 53, 303–317. <https://doi.org/10.1530/JME-14-0168>
- Hoffman, J., Kuhnert, F., Davis, C.R., Kuo, C.J., 2004. Wnts as essential growth factors for the adult small intestine and colon. *Cell Cycle* 3, 554–7.
- Holick, M.F., 2011. VITAMIN D: A D-LIGHTFUL SOLUTION FOR HEALTH Michael. *J Investig Med.* 59, 872–880. <https://doi.org/https://doi.org/10.2310/jim.0b013e318214ea2d>
- Holick, M.F., 2007. Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* 357, 266–281. <https://doi.org/https://doi.org/10.1056/nejmra070553>
- Holt, D., Ma, X., Kundu, N., Collin, P.D., Fulton, A.M., 2012. Modulation of host natural killer cell functions in breast cancer via prostaglandin E<sub>2</sub> receptors EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub>. *J Immunother.* 35, 179–188. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e318247a5e9>
- Hong, A., Davies, S., Stevens, G., Lee, S., 2004. Cyclin D1 Overexpression in AIDS-related and Classic Kaposi Sarcoma. *Dermatological Cryosurgery and Cryotherapy* 12, 26–30. [https://doi.org/10.1007/978-1-4471-6765-5\\_133](https://doi.org/10.1007/978-1-4471-6765-5_133)
- Huang, H., 2018. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: Recent advances. *Sensors (Switzerland)* 18, 5–7. <https://doi.org/10.3390/s18103249>
- Hussain, S.P., Harris, C.C., 2007. Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials. *Int. J. Cancer* 121, 2373–2380. <https://doi.org/10.1002/ijc.23173>
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Von Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., 2001. Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science (80-. )*. 292, 468–472. <https://doi.org/10.1126/science.1059796>
- Jamali, N., Song, Y., Sorenson, C.M., Sheibani, N., 2019. 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> regulates the proangiogenic activity of pericyte through VDR-mediated modulation of VEGF production and signaling of VEGF and PDGF receptors. *FASEB BioAdvances* 1, 415–434. <https://doi.org/10.1096/fba.2018-00067>

- Jamieson, C.H.M., Ailles, L.E., Dylla, S.J., Muijtjens, M., Jones, C., Zehnder, J.L., Gotlib, J., Li, K., Manz, M.G., Keating, A., Sawyers, C.L., Weissman, I.L., 2004. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N. Engl. J. Med.* 351, 657–667. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040258>
- Jiang, B.H., Semenza, G.L., Bauer, C., Marti, H.H., 1996. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 271, C1172–C1180. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.271.4.c1172>
- Jochum, W., Passequé, E., Wagner, E.F., 2001. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* 20, 2401–2412. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204389>
- Johnson, A.L., Zinser, G.M., Waltz, S.E., 2015. Vitamin D3-dependent VDR signaling delays estrogen-mediated breast tumorigenesis through suppression of  $\beta$ -catenin activity. *Oncotarget* 6, 16304–20. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4059>
- Jones, R.G., Thompson, C.B., 2009. Tumor suppressors and cell metabolism. *Genes Dev.* 23, 537–548. <https://doi.org/10.1101/gad.1756509.GENES>
- Jouzeau, J.Y., Terlain, B., Abid, A., Nédélec, E., Netter, P., 1997. Cyclo-oxygenase isoenzymes. How recent findings affect thinking about nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs* 53, 563–582. <https://doi.org/10.2165/00003495-199753040-00003>
- Judde, J.G., Lacoste, V., Brière, J., Kassa-Kelembho, E., Clyti, E., Couppié, P., Buchrieser, C., Tulliez, M., Morvan, J., Gessain, A., 2000. Monoclonality or oligoclonality of human herpesvirus 8 terminal repeat sequences in Kaposi's sarcoma and other diseases. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 729–736. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.9.729>
- Jurus, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L.E., Brookes, D.H., Wilson, L., Chen, J., Liles, K., Chun, M., Li, P., Gohara, D.W., Dolinsky, T., Konecny, R., Koes, D.R., Nielsen, J.E., Head-Gordon, T., Geng, W., Krasny, R., Wei, G.W., Holst, M.J., McCammon, J.A., Baker, N.A., 2018. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Sci.* 27, 112–128. <https://doi.org/10.1002/pro.3280>
- Kamiyama, M., Pozzi, A., Yang, L., DeBusk, L.M., Breyer, R.M., Lin, P.C., 2006. EP2, a receptor for PGE<sub>2</sub>, regulates tumor angiogenesis through direct effects on endothelial cell motility and survival. *Oncogene* 25, 7019–7028. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209694>
- Keifer, O.P., O'Connor, D.M., Boulis, N.M., 2014. Gene and protein therapies utilizing VEGF for ALS. *Pharmacol. Ther.* 141, 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.10.009>
- Kim, H.Y., Park, J.H., Won, H.Y., Lee, J.Y., Kong, G., 2015. CBX7 inhibits breast tumorigenicity through DKK-1-mediated suppression of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *FASEB J.* 29, 300–313. <https://doi.org/10.1096/fj.14-253997>
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., Van Wichen, D., De Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Clevers, H., 1997. Constitutive transcriptional activation by a  $\beta$ -catenin-Tcf complex in APC(-/-) colon carcinoma. *Science* (80- ). 275, 1784–1787. <https://doi.org/10.1126/science.275.5307.1784>
- Koshkin, V., Dunford, H.B., 1999. Coupling of the peroxidase and cyclooxygenase reactions of prostaglandin H synthase. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1430, 341–348. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00016-3](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00016-3)
- Kovary, K., Bravo, R., 1991. Expression of different Jun and Fos proteins during the G<sub>0</sub>-to-G<sub>1</sub> transition in mouse fibroblasts: in vitro and in vivo associations. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2451–2459. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.5.2451>
- 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., Swami, S., Feldman, D., 2010. Vitamin D and breast cancer: Inhibition of estrogen synthesis and signaling. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 121, 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.02.009>
- Kudryavtseva, A. V., Krasnov, G.S., Dmitriev, A.A., Alekseev, B.Y., Kardymon, O.L., Sadritdinova, A.F., Fedorova, M.S., Pokrovsky, A. V., Melnikova, N. V., Kaprin, A.D., Moskalev, A.A., Snezhkina, A. V., 2016. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress

- in aging and cancer. *Oncotarget* 7, 44879–44905. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9821>
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nat. Publ. Gr.* 227, 680–685. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lampugnani, M.G., Dejana, E., Giampietro, C., 2018. Vascular endothelial (VE)-cadherin, endothelial adherens junctions, and vascular disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029322>
- Larriba, M.J., González-Sancho, J.M., Barbáchano, A., Niell, N., Ferrer-Mayorga, G., Muñoz, A., 2013. Vitamin D Is a Multilevel Repressor of Wnt/b-Catenin Signaling in Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 5, 1242–60. <https://doi.org/10.3390/cancers5041242>
- Larriba, M.J., Martín-Villar, E., García, J.M., Pereira, F., Peña, C., de Herreros, A.G., Bonilla, F., Muñoz, A., 2009. Snail2 cooperates with Snail1 in the repression of vitamin D receptor in colon cancer. *Carcinogenesis* 30, 1459–68. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp140>
- Larriba, M.J., Ordóñez-Morán, P., Chicote, I., Martín-Fernández, G., Puig, I., Muñoz, A., Pálmer, H.G., 2011. Vitamin D receptor deficiency enhances Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and tumor burden in colon cancer. *PLoS One* 6, e23524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023524>
- Larriba, M.J., Valle, N., Pálmer, H.G., Ordóñez-Morán, P., Alvarez-Díaz, S., Becker, K.-F., Gamallo, C., de Herreros, A.G., González-Sancho, J.M., Muñoz, A., 2007. The inhibition of Wnt/beta-catenin signalling by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 is abrogated by Snail1 in human colon cancer cells. *Endocr. Relat. Cancer* 14, 141–51. <https://doi.org/10.1677/ERC-06-0028>
- Lee, W., Haslinger, A., Karin, M., Tjian, R., 1987. Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/325368a0>
- Levin, E.R., 2008. Rapid signaling by steroid receptors. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90605.2008>
- Li, R., Jia, Z., Trush, M.A., 2016. Defining ROS in Biology and Medicine. *React Oxyg Species (Apex)*. 1, 9–21. <https://doi.org/10.20455/ros.2016.803>
- Li, T. tong, Liu, M. ru, Pei, D. sheng, 2020. Friend or foe, the role of EGR-1 in cancer. *Med. Oncol.* 37, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s12032-019-1333-6>
- Li, X., Feng, J., Sun, R., 2011. Oxidative Stress Induces Reactivation of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus and Death of Primary Effusion Lymphoma Cells. *J. Virol.* 85, 715–724. <https://doi.org/10.1128/JVI.01742-10>
- Lin, D.T., Subbaramaiah, K., Shah, J.P., Dannenberg, A.J., Boyle, J.O., 2002. Cyclooxygenase-2: A novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer. *Head Neck* 24, 792–799. <https://doi.org/10.1002/hed.10108>
- Liu, G., Yu, F.X., Kim, Y.C., Meng, Z., Naipauer, J., Looney, D.J., Liu, X., Gutkind, J.S., Mesri, E.A., Guan, K.L., 2014. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus promotes tumorigenesis by modulating the Hippo pathway. *Oncogene* 34, 3536–3546. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.281>
- Liu, X., Nelson, A., Wang, X., Farid, M., Gunji, Y., Ikari, J., Iwasawa, S., Basma, H., Feghali-Bostwick, C., Rennard, S.I., 2014. Vitamin D modulates prostaglandin E2 synthesis and degradation in human lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 50, 40–50. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0211OC>
- 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>
- Loh, K.M., van Amerongen, R., Nusse, R., 2016. Generating Cellular Diversity and Spatial Form: Wnt Signaling and the Evolution of Multicellular Animals. *Dev. Cell* 38, 643–655. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.08.011>
- Loll, P.J., Picot, D., Garavito, R.M., 1995. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nature* 2, 637–643.
- Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its

- classification. *Chem. Biol. Interact.* 224, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>
- Ma, Q., Cavallin, L.E., Leung, H.J., Chiozzini, C., Goldschmidt-Clermont, P.J., Mesri, E.A., 2013. A Role for Virally Induced Reactive Oxygen Species in Kaposi's Sarcoma Herpesvirus Tumorigenesis. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 80–90. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4584>
- Maestro, M.A., Molnár, F., Mouriño, A., Carlberg, C., 2016. Vitamin D receptor 2016: novel ligands and structural insights. *Expert Opin. Ther. Pat.* 26, 1291–1306. <https://doi.org/10.1080/13543776.2016.1216547>
- Mallery, S.R., Pei, P., Clark, D.J.L.C.M., Bradburn, J.E., Ness, G.M., Robertson, F.M., 2004. Implications for oxidative and nitrative stress in the pathogenesis of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Carcinogenesis* 25, 597–603. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/carcin/bgh042>
- Mallet, E., 2010. Vitamine D. *J. Pédiatrie* 1–10. [https://doi.org/10.1016/S1245-1789\(10\)70168-2](https://doi.org/10.1016/S1245-1789(10)70168-2)
- Mantell, D.J., Owens, P.E., Bundred, N.J., Mawer, E.B., Canfield, A.E., 2000.  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circ. Res.* 87, 214–220. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.3.214>
- Mantilla, C., Mellado, I.S., Jaramillo, A.D., Navas, M.-C.N., 2015. Mecanismos de señalización por  $\beta$ -catenina y su papel en la carcinogénesis. *CES Med.* 29, 128.
- Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B.M., Delius, H., Hoppe, D., Stannek, P., Walter, C., Glinka, A., Niehrs, C., 2002. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 417, 664–7. <https://doi.org/10.1038/nature756>
- Martin, D., Gutkind, J.S., 2009. 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>
- Masood, R., Nagpal, S., Zheng, T., Cai, J., Tulpule, A., Smith, D.L., Gill, P.S., 2000. Kaposi sarcoma is a therapeutic target for vitamin D<sub>3</sub> receptor agonist. *Blood* 96, 3188–3194. [https://doi.org/10.1182/blood.v96.9.3188.h8003188\\_3188\\_3194](https://doi.org/10.1182/blood.v96.9.3188.h8003188_3188_3194)
- Mbonye, U.R., Yuan, C., Harris, C.E., Sidhu, R.S., Song, I., Arakawa, T., Smith, W.L., 2008. Two distinct pathways for cyclooxygenase-2 protein degradation. *J. Biol. Chem.* 283, 8611–8623. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710137200>
- McCollum, E. V., Simmonds, N., Becker, J.E., Shipley, P.G., 1922. Studies on Experimental Rickets. *Nutr. Rev.* LIII, 293–312. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1975.tb07097.x>
- Merlie, J.P., Fagan, D., Mudd, J., Needleman, P., 1988. Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J. Biol. Chem.* 263, 3550–3553.
- Mesri, E.A., Cesarman, E., 2014. Kaposi's sarcoma herpesvirus oncogenesis is a Notch better in 3D. *Cell Host Microbe* 10, 1–23. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/15/1/015008>. Fluid
- Mesri, E.A., Cesarman, E., Boshoff, C., 2010. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. *Nat. Rev. Cancer* 10, 707–719. <https://doi.org/10.1038/nrc2888>
- Meyer, M.B., Goetsch, P.D., Pike, J.W., 2012. VDR/RXR and TCF4/ $\beta$ -catenin cistromes in colonic cells of colorectal tumor origin: Impact on c-FOS and c-MYC gene expression. *Mol. Endocrinol.* 26, 37–51. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1109>
- Mizwicki, M.T., Norman, A.W., 2009. The vitamin D sterol-vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. *Sci. Signal.* 2, 1–15. <https://doi.org/10.1126/scisignal.275re4>
- Moloney, J.N., Cotter, T.G., 2018. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 80, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>
- Montaner, S., Sodhi, A., Molinolo, A., Bugge, T.H., Sawai, E.T., He, Y., Li, Y., Ray, P.E., Gutkind, J.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/10.1016/S1535-6108\(02\)00237-4](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00237-4)
- 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>
- Montaner, S., Sodhi, A., Servitja, J.M., Ramsdell, A.K., Barac, A., Sawai, E.T., Gutkind, J.S., 2004. The small GTPase Rac1 links the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus vGPCR to cytokine secretion and paracrine neoplasia. *Blood* 104, 2903–2911. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4436>
- 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/https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-05-1435>
- Morita, I., Schindler, M., Regier, M.K., Otto, J.C., Hori, T., Dewitt, D.L., Smith, W.L., 1995. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and-2. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.270.18.10902>
- Morrish, F., Isern, N., Sadilek, M., Jeffrey, M., David, M., 2009. c-Myc activates multiple metabolic networks to generate substrates for cell cycle entry Hockenbery1. *Oncogene* 28, 2485–2491. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.112.c-Myc>
- Morrison, J.A., Klingelhutz, A.J., Raab-Traub, N., 2003. Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 2A Activates  $\beta$ -Catenin Signaling in Epithelial Cells. *J. Virol.* 77, 12276–12284. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.22.12276-12284.2003>
- Mortezaee, K., 2018. Human hepatocellular carcinoma: Protection by melatonin. *J. Cell. Physiol.* 233, 6486–6508. <https://doi.org/10.1002/jcp.26586>
- 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/https://doi.org/10.1016/j.jare.2014.01.011>
- Muralidhar, S., Filia, A., Nsengimana, J., Poźniak, J., O'Shea, S.J., Diaz, J.M., Harland, M., Randerson-Moor, J.A., Reichrath, J., Laye, J.P., Weyden, L. van der, Adams, D.J., Bishop, D.T., Newton-Bishop, J., 2019. Vitamin D-VDR signaling inhibits Wnt/beta-catenin-mediated melanoma progression and promotes anti-tumor immunity. *Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0668>
- Murata, M., 2018. Inflammation and cancer. *Environ. Health Prev. Med.* 23, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12199-018-0740-1>
- Naipauer, J., Cavallin, L., Mesri, E., 2019a. Unbiased Screening of Activated Receptor Tyrosine Kinases (RTKs) in Tumor Extracts Using a Mouse Phospho-RTK Array Kit. *Bio-Protocol* 9, 1–13. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3216>
- Naipauer, J., Rosario, S., Gupta, S., Premer, C., Méndez-Solís, O., Schlesinger, M., Ponzinibbio, V., Jain, V., Gay, L., Renne, R., Chan, H.L., Morey, L., Salyakina, D., Abba, M., Williams, S., Hare, J.M., Goldschmidt-Clermont, P.J., Mesri, E.A., 2019b. PDGFRA defines the mesenchymal stem cell Kaposi's sarcoma progenitors by enabling KSHV oncogenesis in an angiogenic environment, *PLoS Pathogens.* <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008221>
- Naipauer, J., Salyakina, D., Journo, G., Rosario, S., Williams, S., Abba, M., Shamay, M., Mesri, E.A., 2020. High-throughput sequencing analysis of a “hit and run” cell and animal model of KSHV tumorigenesis. *PLoS Pathog.* 16, 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008589>
- Nakanishi, M., Rosenberg, D.W., 2013. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Semin. Immunopathol.* 35, 123–137. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0342-8>
- Namba, T., Sugimoto, Y., Negishi, M., Irie, A., Ushikubi, F., Kakizuka, A., Ito, S., Ichikawa, A., Narumiya, S., 1993. Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin e receptor subtype EP3 determines G-protein specificity. *Nature* 365, 166–170. <https://doi.org/10.1038/365166a0>
- Naranatt, P.P., Krishnan, H.H., Svojanovsky, S.R., Bloomer, C., Mathur, S., Chandran, B., 2004. Host Gene Induction and Transcriptional Reprogramming in Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV/HHV-8)-Infected Endothelial, Fibroblast, and B Cells: Insights into Modulation Events Early during Infection. *Cancer Res.* 64, 72–84.

- <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2767>
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., 1999. Prostanoid receptors: Structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 79, 1193–1226. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1193>
- Nezbedova, P., Brtko, J., 2004.  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 inducible transcription factor and its role in the vitamin D action. *Endocr. Regul.* 38, 29–38.
- Niehrs, C., 2012. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 767–79. <https://doi.org/10.1038/nrm3470>
- 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/10.1093/ajcn/88.2.491s>
- 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>
- Nusse, R., Clevers, H., 2017. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 169, 985–999. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016>
- O’Callaghan, G., Houston, A., 2015. Prostaglandin E2 and the EP receptors in malignancy: Possible therapeutic targets? *Br. J. Pharmacol.* 172, 5239–5250. <https://doi.org/10.1111/bph.13331>
- Obermoser, V., Baecker, D., Schuster, C., Braun, V., Kircher, B., Gust, R., 2018. Chlorinated cobalt alkyne complexes derived from acetylsalicylic acid as new specific antitumor agents. *Dalt. Trans.* 47, 4341–4351. <https://doi.org/10.1039/c7dt04790h>
- Ohtsuka, J., Oshima, H., Ezawa, I., Abe, R., Oshima, M., Ohki, R., 2018. Functional loss of p53 cooperates with the in vivo microenvironment to promote malignant progression of gastric cancers. *Sci. Rep.* 8, 3–4. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20572-1>
- Olsson, A.K., Dimberg, A., Kreuger, J., Claesson-Welsh, L., 2006. VEGF receptor signalling - In control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 359–371. <https://doi.org/10.1038/nrm1911>
- Ota, C., Baarsma, H.A., Wagner, D.E., Hilgendorff, A., Königshoff, M., 2016. Linking bronchopulmonary dysplasia to adult chronic lung diseases: role of WNT signaling. *Mol. Cell. Pediatr.* 3. <https://doi.org/10.1186/s40348-016-0062-6>
- Otto, J.C., Smith, W.L., 1995. Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* 12, 139–156. [https://doi.org/10.1016/0929-7855\(95\)00015-l](https://doi.org/10.1016/0929-7855(95)00015-l)
- Pálmer, H.G., González-Sancho, J.M., Espada, J., Berciano, M.T., Puig, I., Baulida, J., Quintanilla, M., Cano, A., de Herreros, A.G., Lafarga, M., Muñoz, A., 2001. Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J. Cell Biol.* 154, 369–87. <https://doi.org/10.1083/jcb.200102028>
- Pálmer, H.G., Larriba, M.J., García, J.M., Ordóñez-Morán, P., Peña, C., Peiró, S., Puig, I., Rodríguez, R., de la Fuente, R., Bernad, A., Pollán, M., Bonilla, F., Gamallo, C., de Herreros, A.G., Muñoz, A., 2004. The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer. *Nat. Med.* 10, 917–9. <https://doi.org/10.1038/nm1095>
- Parfenova, H., Parfenov, V.N., Shlopov, B. V., Levine, V., Falkos, S., Pourcyrus, M., Leffler, C.W., 2001. Dynamics of nuclear localization sites for COX-2 in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 281, 166–178. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.1.c166>
- Passegue, E., Wagner, E.F., 2000. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16INK4a expression. *EMBO J.* 19, 2969–2979. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.12.2969>
- Pendás-Franco, N., García, J.M., Peña, C., Valle, N., Pálmer, H.G., Heinäniemi, M., Carlberg, C., Jiménez, B., Bonilla, F., Muñoz, A., González-Sancho, J.M., 2008. DICKKOPF-4 is induced by TCF/ $\beta$ -catenin and upregulated in human colon cancer, promotes tumour cell invasion and angiogenesis and is repressed by  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3. *Oncogene* 27, 4467–4477. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.88>
- Picot, D., Loll, P.J., Garavito, R.M., 1994. The X-ray crystal structure of the membrane protein

- prostaglandin H 2 synthase-1. *Nature* 367, 243–249. <https://doi.org/10.1038/367243a0>
- Piotrowska, A., Wierzbicka, J., Zmijewski, M.A., 2016. Vitamin D in the skin physiology and pathology. *Acta Biochim. Pol.* 63, 17–29. [https://doi.org/10.18388/abp.2015\\_1104](https://doi.org/10.18388/abp.2015_1104)
- Polakis, P., 2012. Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, 9. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008052>
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C.J., Valko, M., 2017. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 592–607. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.04.005>
- Priehl, B., Treiber, G., Pieber, T.R., Amrein, K., 2013. Vitamin D and immune function. *Nutrients* 5, 2502–2521. <https://doi.org/10.3390/nu5072502>
- Purushothaman, P., Uppal, T., Sarkar, R., Verma, S.C., 2016. KSHV-mediated angiogenesis in tumor progression. *Viruses* 8. <https://doi.org/10.3390/v8070198>
- Qian, L.-W., Xie, J., Ye, F., Gao, S.-J., 2007. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection Promotes Invasion of Primary Human Umbilical Vein Endothelial Cells by Inducing Matrix Metalloproteinases. *J. Virol.* 81, 7001–7010. <https://doi.org/10.1128/jvi.00016-07>
- Qie, S., Diehl, J.A., 2016. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J. Mol. Med.* 94, 1313–1326. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1475-3>
- Raivich, G., Behrens, A., 2006. Role of the AP-1 transcription factor c-Jun in developing, adult and injured brain. *Prog. Neurobiol.* 78, 347–363. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.03.006>
- Rankin, E.B., Giaccia, A.J., 2008. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 15, 678–685. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.21>
- Rask, K., Zhu, Y., Wang, W., Hedin, L., Sundfeldt, K., 2006. Ovarian epithelial cancer: A role for PGE2-synthesis and signalling in malignant transformation and progression. *Mol. Cancer* 5, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-62>
- Ravid, A., Rubinstein, E., Gamady, A., Rotem, C., Liberman, U.A., Koren, R., 2002. Vitamin D inhibits the activation of stress-activated protein kinases by physiological and environmental stresses in keratinocytes. *J. Endocrinol.* 173, 525–532. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1730525>
- Ravid, A., Shenker, O., Buchner-Maman, E., Rotem, C., Koren, R., 2016. Vitamin D Induces Cyclooxygenase 2 Dependent Prostaglandin E2 Synthesis in HaCaT Keratinocytes. *J. Cell. Physiol.* 231, 837–843. <https://doi.org/10.1002/jcp.25132>
- Regier, M.K., DeWitt, D.L., Schindler, M.S., Smith, W.L., 1992. Subcellular Localization of Prostaglandin Endoperoxide Synthase-2 in Murine 3T3 Cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 301, 439–444. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1168>
- Reichmann, E., Schwarz, H., Deiner, E.M., Leitner, I., Eilers, M., Berger, J., Busslinger, M., Beug, H., 1992. Activation of an inducible c-FosER fusion protein causes loss of epithelial polarity and triggers epithelial-fibroblastoid cell conversion. *Cell* 71, 1103–1116. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(05\)80060-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80060-1)
- Reya, T., Clevers, H., 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843–850. <https://doi.org/10.1038/nature03319>
- Rimm, D.L., Caca, K., Hu, G., Harrison, F.B., Fearon, E.R., 1999. Frequent nuclear/cytoplasmic localization of  $\beta$ -catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma. *Am. J. Pathol.* 154, 325–329. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65278-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65278-9)
- Rong, Y., Hu, F., Huang, R., Mackman, N., Horowitz, J.M., Jensen, L., Durden, D.L., Meir, E.G. Van, Brat, D.J., 2006. Early Growth Response Gene-1 Regulates Hypoxia-Induced Expression of Tissue Factor in Glioblastoma Multiforme through Hypoxia-Inducible Factor-1-Independent Mechanisms. *Cancer Res* 66, 7067–7074. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0346.Early>
- Rosen, C.J., Adams, J.S., Bikle, D.D., Black, D.M., Demay, M.B., Manson, J.A.E., Murad, M.H., Kovacs, C.S., 2012. The nonskeletal effects of vitamin D: An endocrine society scientific statement. *Endocr. Rev.* 33, 456–492. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.1210%2Fer.2012-1000>

- Rouzer, C.A., Marnett, L.J., 2009. Cyclooxygenases : structural and functional insights 29–34. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800042-JLR200>
- Rouzer, C.A., Marnett, L.J., 2003. Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases. *Chem. Rev.* 103, 2239–2304. <https://doi.org/10.1021/cr000068x>
- Rundhaug, J.E., Simper, M.S., Surh, I., Fischer, S.M., 2011. The role of the EP receptors for prostaglandin E2 in skin and skin cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 30, 465–480. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9317-9>
- Russo de Boland, A.J., 2005. Acción de la vitamina D en el intestino. *Actual. osteol.* 1, 34–39.
- Russo, J.J., Bohenzky, R.A., Chien, M.C., Chen, J., Yan, M., Maddalena, D., Parry, J.P., Peruzzi, D., Edelman, I.S., Chang, Y., Moore, P.S., 1996. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14862–14867. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14862>
- S. Patrick, M., Chang, Y., 2010. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat Rev Cancer.* 10, 878–889. <https://doi.org/10.1038/nrnc.2010.10>
- Saadi, E., Tal, S., Barki-Harrington, L., 2018. Substrate-inactivated cyclooxygenase-2 is disposed of by exosomes through the ER-Golgi pathway. *Biochem. J.* 475, 3141–3151. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180530>
- Sakamoto, S., Ryan, A.J., Kyprianou, N., 2008. Targeting vasculature in urologic tumors: Mechanistic and therapeutic significance. *J. Cell. Biochem.* 103, 691–708. <https://doi.org/10.1002/jcb.21442>
- Salehi-Tabar, R., Memari, B., Wong, H., Dimitrov, V., Rochel, N., White, J.H., 2019. The tumor suppressor Fbw7 and the Vitamin D receptor are mutual cofactors in protein turnover and transcriptional regulation. *Mol. Cancer Res.* 17, 709–719. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0991>
- Satoh, S., Daigo, Y., Furukawa, Y., Kato, T., Miwa, N., Nishiwaki, T., Kawasoe, T., Ishiguro, H., Fujita, M., Tokino, T., Sasaki, Y., Imaoka, S., Murata, M., Shimano, T., Yamaoka, Y., Nakamura, Y., 2000. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat. Genet.* 24, 245–250. <https://doi.org/10.1038/73448>
- Schieber, M., Chandel, N.S., 2014. ROS function in redox signaling. *Curr. Biol.* 24, 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Schrader, M., Kahlen, J.-P., Carlberg, C., 1997. Functional Characterization of a Novel Type of 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Response Element Identified in the Mouse c-fos Promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230, 646–651.
- Schuermann, M., Neubergh, M., Hunter, J.B., Jenuwein, T., Ryseck, R.P., Bravo, R., Müller, R., 1989. The leucine repeat motif in Fos protein mediates complex formation with Jun/AP-1 and is required for transformation. *Cell* 56, 507–516. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90253-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90253-5)
- Schulz, T.F., Cesarman, E., 2015. Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus: Mechanisms of oncogenesis. *Curr. Opin. Virol.* 14, 116–128. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.08.016>
- Schwarz, M., Murphy, P.M., 2001. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus G Protein-Coupled Receptor Constitutively Activates NF- $\kappa$ B and Induces Proinflammatory Cytokine and Chemokine Production Via a C-Terminal Signaling Determinant. *J. Immunol.* 167, 505–513. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.1.505>
- Semba, S., Kusumi, R., Moriya, T., Sasano, H., 2000. Nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin in human endocrine tumors: Association with Ki-67 (MIB-1) proliferative activity. *Endocr. Pathol.* 11, 243–250. <https://doi.org/10.1385/EP:11:3:243>
- Semenza, G.L., 2002. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Pharmacol.* 64, 993–998. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01168-1](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01168-1)
- Semenza, G.L., Wang, G.L., 1992. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5447–5454. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.12.5447>

- Shah, S., Islam, M.N., Dakshanamurthy, S., Rizvi, I., Rao, M., Herrell, R., Zinser, G., Valrance, M., Aranda, A., Moras, D., Norman, A., Welsh, J.E., Byers, S.W., 2006. The molecular basis of vitamin D receptor and  $\beta$ -catenin crossregulation. *Mol. Cell* 21, 799–809. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.037>
- Sharma-Walia, N., Paul, A.G., Bottero, V., Sadagopan, S., Mohanan Valiya Veetil, N.K., Chandran, B., 2010. Kaposi's Sarcoma Associated Herpes Virus (KSHV) Induced COX-2: A Key Factor in Latency, Inflammation, Angiogenesis, Cell Survival and Invasion. *PLoS Pathog.* 6, e1000777. <https://doi.org/10.15252/embj.201695973>
- Sharma-Walia, N., Raghu, H., Sadagopan, S., Sivakumar, R., Veetil, M. V., Naranatt, P.P., Smith, M.M., Chandran, B., 2006. Cyclooxygenase 2 Induced by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Early during In Vitro Infection of Target Cells Plays a Role in the Maintenance of Latent Viral Gene Expression. *J. Virol.* 80, 6534–6552. <https://doi.org/10.1128/jvi.00231-06>
- Shaulian, E., Karin, M., 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* 4, E131–E136. <https://doi.org/10.1038/ncb0502-e131>
- Shehat, M.G., Tigno-Aranjuez, J., 2019. Flow cytometric measurement of ROS production in macrophages in response to Fc $\gamma$ R cross-linking. *J. Vis. Exp.* 2019, 1–15. <https://doi.org/10.3791/59167>
- Shelby, B.D., LaMarca, H.L., McFerrin, H.E., Nelson, A.B., Lasky, J.A., Sun, G., Myatt, L., Offermann, M.K., Morris, C.A., Sullivan, D.E., 2007. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus G-protein coupled receptor activation of cyclooxygenase-2 in vascular endothelial cells. *Virol. J.* 4, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-4-87>
- Shimoyamada, H., Yazawa, T., Sato, H., Okudela, K., Ishii, J., Sakaeda, M., Kashiwagi, K., Suzuki, T., Mitsui, H., Woo, T., Tajiri, M., Ohmori, T., Ogura, T., Masuda, M., Oshiro, H., Kitamura, H., 2010. Early growth response-1 induces and enhances vascular endothelial growth factor-a expression in lung cancer cells. *Am. J. Pathol.* 177, 70–83. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091164>
- 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>
- Skulachev, V.P., 2012. Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. *J. Alzheimer's Dis.* 28, 283–289. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-111391>
- Slimen, I.B., Najar, T., Ghram, A., Dabbebi, H., Ben Mrad, M., Abdrabbah, M., 2014. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *Int. J. Hyperth.* 30, 513–523. <https://doi.org/10.3109/02656736.2014.971446>
- Smith, W.L., Dewitt, D.L., Garavito, R.M., 2000. CYCLOOXYGENASES: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 145–82. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.145>
- Smith, W.L., Lands, W.E.M., 1972. Oxygenation of Polyunsaturated Fatty Acids during Prostaglandin Biosynthesis by Sheep Vesicular Gland. *Biochemistry* 11, 3276–3285. <https://doi.org/10.1021/bi00767a024>
- Sodhi, A., Montaner, S., Patel, V., Zohar, M., Bais, C., Mesri, E.A., Gutkind, J.S., 2000. The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Cancer Res.* 60, 4873–4880. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-05-1026>
- Solomon, C., Macoritto, M., Gao, X.L., White, J.H., Kremer, R., 2001. The unique tryptophan residue of the vitamin D receptor is critical for ligand binding and transcriptional activation. *J. Bone Miner. Res.* 16, 39–45. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.1.39>
- Somjen, D., Katzburg, S., Grafi-Cohen, M., Knoll, E., Sharon, O., Posner, G.H., 2011. Vitamin D metabolites and analogs induce lipoxygenase mRNA expression and activity as well as reactive oxygen species (ROS) production in human bone cell line. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 123, 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.11.010>

- Su, C.W., Zhang, Y., Zhu, Y.T., 2016. Stromal COX-2 signaling are correlated with colorectal cancer: A review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 107, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.08.010>
- Suares, A., 2018. Estudio de la apoptosis y autofagia como parte del mecanismo antineoplásico de la vitamina D en el sarcoma de Kaposi [en línea]. <https://doi.org/http://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/4606>
- Suares, A., Russo De Boland, A., Verstuyf, A., Boland, R., González Pardo, V., 2015. The proapoptotic protein Bim is up regulated by  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its receptor agonist in endothelial cells and transformed by viral GPCR associated to Kaposi sarcoma. *Steroids* 102, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.08.005>
- Suares, A., Tapia, C., Gonzalez-Pardo, V., 2019a. Heliyon VDR agonists down regulate PI3K / Akt / mTOR axis and trigger autophagy in Kaposi ' s sarcoma cells 5. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02367>
- Suares, A., Tapia, C., González-Pardo, V., 2019b. Antineoplastic effect of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in spheroids from endothelial cells transformed by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein coupled receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 186, 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.10.004>
- Sugimoto, Y., Narumiya, S., 2007. Prostaglandin E receptors. *J. Biol. Chem.* 282, 11613–11617. <https://doi.org/10.1074/jbc.R600038200>
- Taddei, A., Giampietro, C., Conti, A., Orsenigo, F., Breviario, F., Pirazzoli, V., Potente, M., Daly, C., Dimmeler, S., Dejana, E., 2008. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat. Cell Biol.* 10, 923–934. <https://doi.org/10.1038/ncb1752>
- Tafrihi, M., Nakhaei Sistani, R., 2017. E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin Complex: A Target for Anticancer and Antimetastasis Plants/Plant-derived Compounds. *Nutr. Cancer* 69, 702–722. <https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1320415>
- Tagliaferri, S., Porri, D., De Giuseppe, R., Manuelli, M., Alessio, F., Cena, H., 2019. The controversial role of vitamin D as an antioxidant: results from randomised controlled trials. *Nutr. Res. Rev.* 32, 99–105. <https://doi.org/10.1017/s0954422418000197>
- Takeichi, M., 1995. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 619–27. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80102-2](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80102-2)
- 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 D<sub>3</sub> 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>
- Tetsu, O., McCormick, F., 1999.  $\beta$ -catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422–426. <https://doi.org/10.1038/18884>
- Thanan, R., Murata, M., Ma, N., Hammam, O., Wishahi, M., El Leithy, T., Hiraku, Y., Oikawa, S., Kawanishi, S., 2012. Nuclear localization of COX-2 in relation to the expression of stemness markers in urinary bladder cancer. *Mediators Inflamm.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/165879>
- Thill, M., Cordes, T., Hoellen, F., Becker, S., Dittmer, C., Kümmel, S., Salehin, D., Friedrich, M., Diedrich, K., Köster, F., 2012. Influence of calcitriol on prostaglandin- and vitamin D-metabolising enzymes in benign and malignant breast cell lines. *Anticancer Res.* 32, 359–365.
- Thill, M., Woeste, A., Reichert, K., Fischer, D., Rody, A., Friedrich, M., Köster, F., 2015. Vitamin D inhibits ovarian cancer cell line proliferation in combination with celecoxib and suppresses cyclooxygenase-2 expression. *Anticancer Res.* 35, 1197–1203.
- 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. U. S. A.* 76, 4350–4354. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335–344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Ushio-Fukai, M., 2006. Redox signaling in angiogenesis: Role of NADPH oxidase. *Cardiovasc.*

- Res. 71, 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.04.015>
- Vallée, A., Lecarpentier, Y., Vallée, J.-N., 2019. Targeting the Canonical WNT/ $\beta$ -Catenin Pathway in Cancer Treatment Using Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Cells* 8, 1–26. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/cells8070726>
- Vallejo, D.F., Zamarreño, F., Guérin, D.M.A., Grigera, J.R., Costabel, M.D., 2009. Prediction of the most favorable configuration in the ACBP-membrane interaction based on electrostatic calculations. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1788, 696–700. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.12.007>
- Vane, J.R., Bakhle, Y.S., Botting, R.M., 1998. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, 97–120. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97>
- Vane, J.R., Botting, R.M., 1998. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflamm. Res.* 47, 78–87. <https://doi.org/10.1007/s000110050284>
- Vaupel, P., Mayer, A., 2007. Hypoxia in cancer: Significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 225–239. <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9055-1>
- Verlinden, L., Eelen, G., Bouillon, R., Vandewalle, M., De Clercq, P., Verstuyf, A., 2011. Analogs of calcitriol, Third Edit. ed, Vitamin D. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381978-9.10076-9>
- Verlinden, L., Verstuyf, A., Van Camp, M., Marcelis, S., Sabbe, K., Zhao, X.Y., De Clercq, P., Vandewalle, M., Bouillon, R., 2000. Two novel 14-Epi-analogues of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibit the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 60, 2673–9.
- Wang, G.L., Semenza, G.L., 1993. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 4304–4308. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.9.4304>
- Wang, J., Yi, J., 2008. Cancer cell killing via ROS: To increase or decrease, that is a question. *Cancer Biol. Ther.* 7, 1875–1884. <https://doi.org/10.4161/cbt.7.12.7067>
- Wang, M.T., Honn, K. V., Nie, D., 2007. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 525–534. <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9096-5>
- Wang, Q., He, Y., Shen, Y., Zhang, Q., Chen, D., Zuo, C., Qin, J., Wang, H., Wang, J., Yu, Y., 2014. Vitamin D inhibits cox-2 expression and inflammatory response by targeting thioesterase superfamily member 4. *J. Biol. Chem.* 289, 11681–11694. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.517581>
- Wang, X., Studzinski, G.P., 2006. The Requirement for and Changing Composition of the Activating Protein-1 Transcription Factor during Differentiation of Human Leukemia HL60 Cells Induced by 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Cancer Res.* 66, 4402. <https://doi.org/doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3109>. The
- Watany, M., 2017. Study of Dickkopf-1 (DKK-1) Gene Expression in Hepatocellular Carcinoma Patients. *J. Clin. Diagnostic Res.* 1, 32–34. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/23095.9450>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., De Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T., 2018. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46, W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Weinstein, I.B., Joe, A., 2008. Oncogene addiction. *Cancer Res.* 68, 3077–3080. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-3293>
- 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/https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.010>
- Wen, K.W., Damania, B., 2010. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): Molecular biology and oncogenesis. *Cancer Lett.* 289, 140–150. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.07.004>
- Willert, K., Nusse, R., 2012. Wnt proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a007864. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007864>
- Wimalawansa, S.J., 2019. Vitamin D Deficiency: Effects on Oxidative Stress, Epigenetics,

- Gene Regulation, and Aging. *Biology (Basel)*. 8, 1–15. <https://doi.org/10.3390/biology8020030>
- Winterbourn, C.C., Kettle, A.J., Hampton, M.B., 2016. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 765–792. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014442>
- Wintermeyer, E., Ihle, C., Ehnert, S., Stöckle, U., Ochs, G., de Zwart, P., Flesch, I., Bahrs, C., Nussler, A.K., 2016. Crucial role of vitamin D in the musculoskeletal system. *Nutrients* 8, 319. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/nu8060319>
- Wong, M.P., Cheung, N., Yuen, S.T., Leung, S.Y., Chung, L.P., 1999. Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumour progression. *Int. J. Cancer* 81, 845–850. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19990611\)81:6<845::AID-IJC1>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19990611)81:6<845::AID-IJC1>3.0.CO;2-5)
- Wu, D., Pan, W., 2010. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem. Sci.* 35, 161–168. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.002>
- Wu, W., Zhang, X., Zanello, L.P., 2007.  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> antiproliferative actions involve vitamin D receptor-mediated activation of MAPK pathways and AP-1/p21waf1 upregulation in human osteosarcoma. *Cancer Lett* 254, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.02.013>.  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin
- Xia, D., Wang, D., Kim, S.-H., Katoh, H., DuBois, R.N., 2012. Prostaglandin E<sub>2</sub> promotes intestinal tumor growth via DNA methylation. *Nat Med.* 18, 224–226. <https://doi.org/10.1038/nm.2608>
- Xiao, G., Chen, W., Kulmacz, R.J., 1998. Comparison of structural stabilities of prostaglandin H synthase-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 273, 6801–6811. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.12.6801>
- Xie, J., Pan, H., Yoo, S., Gao, S.-J., 2005. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Induction of AP-1 and Interleukin 6 during Primary Infection Mediated by Multiple Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *J. Virol.* 79, 15027–15037. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.24.15027-15037.2005>
- Xiong, Y., Zhang, Y., Xin, N., Yuan, Y., Zhang, Q., Gong, P., Wu, Y., 2017.  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> promotes osteogenesis by promoting Wnt signaling pathway. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 174, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.08.014>
- Xu, H., McCann, M., Zhang, Z., Posner, G.H., Bingham, V., El-Tanani, M., Campbell, F.C., 2009. Vitamin D receptor modulates the neoplastic phenotype through antagonistic growth regulatory signals. *Mol. Carcinog.* 48, 758–72. <https://doi.org/10.1002/mc.20520>
- Xu, Z., Choudhary, S., Voznesensky, O., Mehrotra, M., Woodard, M., Hansen, M., Herschman, H., Pilbeam, C., 2006. Overexpression of Cox-2 in human osteosarcoma cells decreases proliferation and increases apoptosis. *Cancer Res.* 66, 6657–6664. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3624>
- Yang, Y., 2012. Wnt signaling in development and disease. *Cell Biosci.* 2, 1. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-14>
- Ye, F.-C., Blackburn, D.J., Mengel, M., Xie, J.-P., Qian, L.-W., Greene, W., Yeh, I.-T., Graham, D., Gao, S.-J., 2007. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Promotes Angiogenesis by Inducing Angiopoietin-2 Expression via AP-1 and Ets1. *J. Virol.* 81, 3980–3991. <https://doi.org/10.1128/jvi.02089-06>
- Yokoyama, C., Takai, T., Tanabe, T., 1988. Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence. *FEBS Lett.* 231, 347–351. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80847-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80847-0)
- Zamarreño, F., Giorgetti, A., Amundarain, M.J., Viso, J.F., Córscico, B., Costabel, M.D., 2017. Conserved charged amino acids are key determinants for fatty acid binding proteins (FABPs)-membrane interactions. A multi-methodological computational approach. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 36, 861–877. <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1301271>
- Zamarreño, F., Herrera, F.E., Córscico, B., Costabel, M.D., 2012. Similar structures but different mechanisms: Prediction of FABPs-membrane interaction by electrostatic calculation. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1818, 1691–1697. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.03.003>

- Zanello, L.P., Norman, A.W., 2004. Rapid modulation of osteoblast ion channel responses by  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D<sub>3</sub> requires the presence of a functional vitamin D nuclear receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1589–1594. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305802101>
- Zwezdaryk, K.J., Combs, J.A., Morris, C.A., Sullivan, D.E., 2016. Regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by herpesviruses. *World J. Virol.* 5, 144. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i4.144>

# PUBLICACIONES DE LA TESIS

1. Soares A.\*, **Tapia C.\***, González-Pardo V., 2018. Antineoplastic effect of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in spheroids from endothelial cells transformed by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein coupled receptor. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.10.004>

\* Ambos autores contribuyeron de la misma manera al trabajo.

2. **Tapia C.**, Soares A., De Genaro P., González-Pardo V., 2019. *In vitro* studies revealed a downregulation of Wnt/ $\beta$ -catenin cascade by active vitamin D and TX 527 analog in a Kaposi's sarcoma cellular model. *Toxicology in Vitro*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104748>
3. **Tapia C.**, Zamarreño F., Salvador G. A., Casali C. I., Viso J., Fernandez M. del C., White J. H., González-Pardo V., 2020. Down-regulation of COX-2 activity by  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  is VDR dependent in endothelial cells transformed by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus G Protein-Coupled Receptor. *Heliyon*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05149>