



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

“REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA MAQUINARIA DE BIOGÉNESIS
DE microRNAs POR EL CALCITRIOL”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. EN C. RAMIRO JOSÉ GONZÁLEZ DUARTE

TUTOR:
DR. EUCLIDES AVILA CHÁVEZ
Departamento de Biología de la Reproducción
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. ALFREDO HIDALGO MIRANDA
Laboratorio de Genómica del Cáncer
Instituto Nacional de Medicina Genómica

DRA. LEONOR PÉREZ MARTÍNEZ
Departamento Medicina Molecular y Bioprocesos
Instituto de Biotecnología de la UNAM

MÉXICO, D. F., SEPTIEMBRE DE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Director de tesis:

Dr. Euclides Avila Chávez

Miembros del comité tutor:

Dr. Alfredo Hidalgo Miranda

Dra. Leonor Pérez Martínez

Jurado para examen de grado:

Dra. Marcela Lizano Soberón (Presidente)

Dr. Euclides Avila Chávez (Secretario)

Dra. Vilma Maldonado Lagunas (Vocal)

Dr. Gustavo Pedraza Alva (Vocal)

Dr. Oscar Peralta Zaragoza (Vocal)

ESTE TRABAJO EXPERIMENTAL FUE DESARROLLADO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN.

Agradecimientos.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, que mediante su **Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas** me ha permitido recibir una sólida formación científica, con la cual deseo contribuir a la generación de conocimiento útil a la sociedad.

A mi tutor, el Dr. **Euclides Avila Chávez**, por darme la oportunidad de desarrollar mi Doctorado bajo su dirección y por contar con su apoyo. Sus enseñanzas me han ayudado a crecer profesionalmente y me serán de gran utilidad en mi carrera científica.

A mi comité tutor, integrado por los doctores: **Alfredo Hidalgo Miranda** y **Leonor Pérez Martínez**, quienes siempre contribuyeron a mi formación académica con sus interesantes cuestionamientos y recomendaciones.

A los doctores: **Verna Cázares Ordoñez**, **Lorenza Díaz Nieto**, **Víctor Ortiz Ortega**, **Sandra Romero Córdoba** y **Julio Augusto Freyre González**, por sus importantes contribuciones, las cuales favorecieron el desarrollo de mi proyecto científico.

Al Dr. **Fernando Larrea Gallo**, jefe del Departamento de Biología de la Reproducción del INCMNSZ, por recibirme en su grupo con apoyo solidario y por su revisión y comentarios críticos al trabajo.

A mi Jurado para examen de grado, conformado por los doctores: **Marcela Lizano Soberón**, **Vilma Maldonado Lagunas**, **Gustavo Pedraza Alva** y **Oscar Peralta Zaragoza**, por sus valiosos comentarios, sugerencias y aportaciones para fortalecer mi Tesis.

A todos los **investigadores y compañeros del Departamento de Biología de la Reproducción**, por brindarme apoyo y grata amistad durante esta etapa académica.

Al **CONACyT** por su importante apoyo con la beca No. 207287

A mi familia, con mucho afecto.

“Lo más grande que hay en nosotros no es la razón que discute y argumenta, sino esa intuición de la verdad que luego tratará de buscar razones en que apoyarse. Dicha intuición es, en realidad, el motor de la investigación científica”.

Reflexión filosófica sobre la sabiduría, Libro del Sirácida.

“Nothing in biology makes sense except in the light of evolution”.

Theodosius Dobzhansky

Índice.

Índice.....	5
1. Resumen.....	7
2. Abstract.....	8
3. Introducción.....	9
3.1 Biogénesis de los microRNAs.....	10
3.2 La vitamina D y el calcitriol.....	14
3.3 Mecanismo de acción del calcitriol.....	15
3.4 Actividad antitumoral del calcitriol.....	17
4. Antecedentes.....	19
5. Hipótesis.....	25
6. Objetivo general.....	25
7. Objetivos específicos.....	25
8. Materiales y métodos.....	26
8.1 Cultivo celular.....	26
8.2 Construcción del plásmido pGL4.10-promotorDDX5.....	26
8.3 Transfección de las células y ensayos de actividad de luciferasa.....	28
8.4 Extracción del RNA total y síntesis de cDNA.....	29
8.5 PCR en tiempo real (qPCR).....	29
8.6 Identificación de posibles VDREs con herramientas computacionales.....	31
8.7 Western blot.....	32
8.8 Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).....	33
8.9 Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).....	34
8.10 Análisis de la expresión de los microRNAs.....	36
8.11 Análisis de las posibles vías celulares asociadas a los microRNAs.....	37
8.12 Análisis estadístico.....	38
9. Resultados.....	39
9.1 La expresión génica de DDX5, DGCR8 y DICER es inducible por el calcitriol en las células SiHa.....	39
9.2 El calcitriol aumenta la síntesis de proteína de DDX5 y de Dicer en las células SiHa.....	42
9.3 El aumento en la expresión de DDX5 y de Dicer requiere una concentración alta de calcitriol.....	44
9.4 Identificación <i>in silico</i> de posibles VDREs en el gen de DDX5 humano.....	45
9.5 El promotor del gen DDX5 es inducible por el calcitriol y requiere del VDR.....	48
9.6 La expresión génica de DDX5 también es inducible por el ácido 9-cis-retinoico.....	51
9.7 El VDR se une al VDRE-1 en el promotor proximal de DDX5 <i>in vitro</i>	52
9.8 El VDR se une al VDRE-1 en el promotor proximal de DDX5 <i>in vivo</i>	55
9.9 Identificación <i>in silico</i> de posibles VDREs en el gen de Dicer humano.....	57
9.10 El VDR se une al VDRE en el promotor de Dicer <i>in vitro</i>	58
9.11 El VDRE en el promotor de Dicer parece ser funcional <i>in vivo</i>	61
9.12 El calcitriol regula diferencialmente la expresión de microRNAs en las células SiHa.....	63
9.13 Los RNAs mensajeros blanco de los microRNAs que aumentaron su expresión están potencialmente relacionados con el cáncer.....	70
10. Discusión.....	72

11. Conclusiones.....	79
12. Perspectivas.....	80
13. Bibliografía.....	81
14. Apéndice.....	90

1. Resumen.

Los microRNAs son una clase de RNAs no codificantes que regulan la expresión génica en la etapa postranscripcional y son generados, fundamentalmente, en la vía canónica de biogénesis cuyas principales proteínas en el humano son: Drosha, DGCR8, DDX5, DDX17, exportina 5, Dicer y Argonauta 2.

El calcitriol es la forma hormonal de la vitamina D que además de regular el metabolismo del calcio es un anticancerígeno endógeno. Considerando que el calcitriol regula la expresión de microRNAs en las células cancerosas, mediante elementos de respuesta reconocidos por el receptor nuclear de la vitamina D, nos interesó estudiar si podría también regular la expresión de algunos componentes de la vía de biogénesis de los microRNAs. Actualmente, se desconocen los factores celulares que regulan dicha vía de biogénesis; no obstante, parece ser blanco de la acción hormonal, como lo sugieren reportes donde se muestra la participación de receptores de hormonas esteroideas.

En este trabajo, utilizamos líneas celulares de cáncer cervical (SiHa, HeLa y C33-A) para estudiar la posible regulación de la expresión de los principales componentes de la maquinaria de biogénesis de los microRNAs, ante el tratamiento con calcitriol. Identificamos que solamente DDX5, DGCR8 y Dicer aumentaron su expresión; en el caso de los genes de DDX5 y de Dicer detectamos posibles elementos de respuesta a la vitamina D y evaluamos su funcionalidad. De manera complementaria, determinamos el perfil de expresión de microRNAs y observamos que la proporción de microRNAs inducidos fue mayor que la de aquellos disminuidos, lo cual podría estar relacionado con la actividad antiproliferativa del calcitriol en las células tumorales. Nuestros hallazgos sugieren que el calcitriol participa en la regulación de la biogénesis de los microRNAs aumentando la expresión de algunos componentes de dicha maquinaria celular.

2. Abstract.

MicroRNAs are a class of non-coding RNAs that regulate gene expression at the posttranscriptional level and are generated, mainly, through the canonical biogenesis pathway whose major proteins in humans are: Drosha, DGCR8, DDX5, DDX17, exportin 5, Dicer and Argonaute 2.

Calcitriol is the hormonal form of vitamin D and in addition to regulating the calcium metabolism is an endogenous anticancer molecule. Given that calcitriol regulates microRNA expression in cancer cells, through response elements recognized by the vitamin D nuclear receptor, we studied if calcitriol also regulates the expression of some of the microRNA biogenesis pathway components. Currently, the cellular factors regulating the biogenesis pathway are still unknown; however, it might be target of hormonal action, as some reports suggest, where the participation of steroid hormone receptors was shown. In this work, we used cervical cancer cell lines (SiHa, HeLa y C33-A) to study the possibility of the gene expression regulation of key components of the microRNA biogenesis machinery, upon treatment with calcitriol. We identified that only DDX5, DGCR8 and Dicer increased their expression, and in the case of DDX5 and Dicer genes we detected potential vitamin D response elements and we evaluated their functionality. To complete our experimental work, we determined the microRNA expression profile upon treatment with calcitriol and we observed that the proportion of upregulated microRNAs was higher than the proportion of those downregulated, which might be related to the antiproliferative activity of calcitriol in tumor cells. Our findings suggest that calcitriol may participate in the regulation of the microRNA biogenesis by increasing the expression of some components of such cellular machinery.

3. Introducción.

Uno de los avances más significativos en la biología celular moderna ha sido el descubrimiento de los RNAs pequeños (de 20 a 30 nucleótidos) no codificantes y sus funciones como reguladores de la expresión de los genes, tanto en plantas como en animales (Bartel, 2004). En general, los efectos de los RNAs pequeños no codificantes sobre la expresión génica son de tipo inhibitorio y por ello se incluyen en el contexto del silenciamiento por RNA. Para realizar sus funciones, este tipo de RNAs se asocian con proteínas que finalmente son las que generan el efecto inhibitorio sobre la expresión de los genes. Las moléculas de RNA, por lo tanto, actúan como factores de especificidad que dirigen a las proteínas hacia los ácidos nucleicos blanco. Hasta ahora se conocen tres categorías principales de RNAs pequeños, descritas sólo en eucariontes: los RNAs pequeños interferentes (siRNAs, por sus siglas en inglés), los microRNAs (miRNAs) y los RNAs que interactúan con proteínas Piwi (piRNAs, por sus siglas en inglés) (Carthew y Sontheimer, 2009). En particular, los microRNAs representan la categoría de RNAs pequeños más estudiada y de la cual se tiene una amplia evidencia sobre su relevancia en la fisiología celular (Sayed y Abdellatif, 2011; Jansson y Lund, 2012). Los microRNAs fueron descubiertos en estudios genéticos realizados con el gusano nematodo *Caenorhabditis elegans* y se determinó su participación en la regulación del desarrollo de dicho organismo (Lee et al., 1993; Reinhart et al., 2000). Posteriormente se observó que las plantas y los animales utilizan también este tipo de RNAs reguladores en diversos procesos fisiológicos; de hecho, se considera que los microRNAs podrían regular a la mitad de los RNAs mensajeros codificados en el genoma humano (Bartel, 2009). El estudio sobre la regulación de la biogénesis de los microRNAs es reciente y comienza a

mostrar que la red de factores que modulan la generación de los microRNAs es realmente compleja.

3.1 Biogénesis de los microRNAs.

La vía canónica de biogénesis de los microRNAs comienza con la transcripción en el núcleo celular, donde transcritos primarios largos (de alrededor de 1000 nucleótidos, o más) son producidos y deben ser procesados secuencialmente para dar origen a los microRNAs maduros (figura 1).

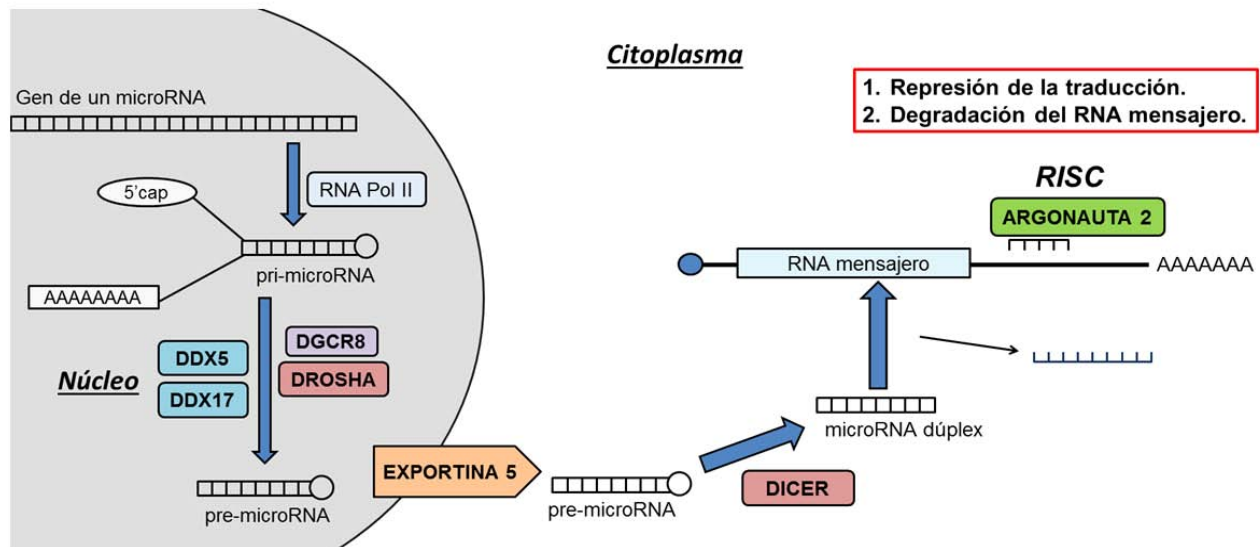


Figura 1. Vía canónica de biogénesis de los microRNAs. Los genes de los microRNAs son transcritos generalmente por la RNA polimerasa II como pri-microRNAs que tienen una caperuza (cap) en el extremo 5' y una cola de poliadenilación en el extremo 3'. La estructura de tallo y asa de los pri-microRNAs es reconocida por el complejo del Microprocesador, compuesto por DGCR8, Drosha, DDX17 y DDX5. La actividad enzimática de Drosha genera los pre-microRNAs que son exportados fuera del núcleo por la exportina 5. La enzima Dicer remueve el asa de los pre-microRNAs en el citoplasma y genera los microRNAs maduros. Sólo una de las cadenas de RNA se asocia con la proteína Argonauta 2 del Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (RISC) para realizar el silenciamiento en la etapa postranscripcional. Los microRNAs reconocen sitios específicos en sus RNAs mensajeros blanco, generalmente ubicados en la región no traducida del extremo 3'. Una complementariedad parcial entre el microRNA y su RNA mensajero blanco produce la represión de la traducción, sin involucrar la degradación del mensajero. Una complementariedad total implica que el RNA mensajero blanco sea degradado para generar la represión. (Esquema obtenido de González-Duarte et al., 2014).

El genoma humano contiene genes de microRNAs que generalmente son transcritos por la RNA polimerasa II. Dichos transcritos primarios, denominados como pri-microRNAs, tienen una caperuza en el extremo 5', una cola de poli-adenilación en el extremo 3' y adquieren una estructura de tallo y asa que es procesada durante la maduración. En el primer paso del procesamiento, el cual ocurre en el núcleo, se remueve la estructura de tallo y asa del resto del transcrito, lo que da origen a los precursores conocidos como pre-microRNAs. Este primer corte es realizado por la enzima Drosha (una RNasa tipo III) cuya actividad depende del cofactor proteico DGCR8 para que el corte sea preciso y eficiente. El primer corte es crítico y aunque la enzima Drosha lo realiza, ésta no es capaz de unirse directamente al pri-microRNA, por ello requiere de DGCR8 que le sirve como un “anclaje molecular” que posiciona correctamente el sitio catalítico de Drosha a la distancia correcta de la unión entre el tallo y los flancos del transcrito primario (Carthew y Sontheimer, 2009). Es importante mencionar que Drosha y DGCR8 forman parte de un complejo de proteínas conocido como complejo del Microprocesador, del que actualmente se desconoce su composición bioquímica exacta. Dentro de las proteínas hasta ahora reportadas como parte de dicho complejo destacan las helicasas de RNA DDX5 (p68) y DDX17 (p72), miembros de la familia DEAD box de helicasas de RNAs, que son proteínas multifuncionales expresadas de manera ubicua en los tejidos y que participan en la transcripción, el procesamiento de RNA y en la biogénesis de los microRNAs (Fuller-Pace y Moore, 2011).

El siguiente paso en el procesamiento de los microRNAs implica la eliminación del asa terminal en el tallo del pre-microRNA para generar el dúplex con el microRNA maduro. Los pre-microRNAs son primero exportados desde del núcleo hacia el citoplasma mediante la

acción de la exportina 5, después la enzima Dicer realiza el segundo corte. Dicer es una RNasa tipo III que posee un dominio PAZ (Piwi Argonaut and Zwill) que le permite interactuar con el extremo saliente 3' en el borde terminal del RNA de doble cadena, determinando el sitio de corte con precisión. Los dos sitios catalíticos de RNasa III que posee Dicer son ubicados a dos vueltas de hélice (22 pares de bases) de distancia de donde el dominio PAZ se unió al extremo terminal. El resultado del corte consiste en el microRNA maduro de doble cadena. Es importante señalar que los dominios PAZ también están presentes en las proteínas Argonautas y les sirven para la unión a los extremos dúplex del RNA, especialmente aquellos con pequeños extremos salientes (de 2 nucleótidos) en el 3'. Los productos de doble cadena generados por Dicer se incorporan en el ensamblado del Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés). Lo anterior implica la separación de las cadenas del dúplex de RNA y la asociación estable de sólo una de ellas con la proteína Argonauta 2. La cadena del microRNA maduro asociada con la proteína Argonauta 2 del RISC permite realizar el silenciamiento postranscripcional. Los microRNAs reconocen sitios específicos en sus RNAs mensajeros blanco, generalmente ubicados en la región no traducida del extremo 3'. Cuando hay una complementariedad parcial entre el microRNA y su RNA mensajero blanco ocurre la represión de la traducción, sin involucrar la degradación del mensajero. Por otro lado, si la complementariedad es total, el RNA mensajero blanco es degradado para generar la represión (Bartel, 2004; Carthew y Sontheimer, 2009; Finnegan y Pasquinelli, 2013).

Un concepto importante sobre la interacción entre un microRNA y su RNA mensajero blanco es que no se requiere de la complementariedad total entre las bases de ambos ácidos nucleicos, por lo tanto, un solo microRNA podría regular a un gran número de

RNAs mensajeros. Por otro lado, un mismo RNA mensajero puede ser regulado por varios microRNAs. Lo anterior implica una gran complejidad en el estudio de la regulación de la expresión génica mediada por microRNAs (Friedman et al., 2009). De manera interesante, las características de la interacción entre un microRNA y su RNA mensajero blanco han permitido el desarrollo de programas computacionales que posibilitan realizar predicciones teóricas sobre las asociaciones entre un microRNA y sus posibles blancos (Peterson et al., 2014). No obstante, siempre es necesaria la validación experimental (*in vitro* e *in vivo*).

Es importante señalar que la biogénesis de los microRNAs puede tener mecanismos alternativos. Algunos estudios han demostrado que existen vías no-canónicas de biogénesis de microRNAs, conservadas entre diferentes organismos. Por ejemplo: en *Drosophila* y en *C. elegans* se descubrió una clase de pre-microRNAs que no necesitan de Drosha para ser generados. Dichos pre-microRNAs han sido denominados como “mirtrones”, por su similitud con los intrones, ya que son generados por la maquinaria del *splicing*. Los mirtrones son exportados fuera del núcleo por la exportina 5 y son integrados al resto de la vía canónica de procesamiento (Ruby et al., 2007). Por otro lado, también se han descrito microRNAs generados a partir de precursores llamados “simtrones”, cuya biogénesis requiere de Drosha pero no requiere de DGCR8, Dicer o Argonauta 2 (Havens et al., 2012). Aunque sólo una fracción de los microRNAs conocidos son generados por vías no-canónicas, estos hallazgos implican que la versatilidad en la generación los microRNAs le permite a la célula una regulación más precisa de la expresión génica (Xie y Steitz, 2014).

3.2 La vitamina D y el calcitriol.

La vitamina D₃ es una molécula que puede ser sintetizada en nuestro organismo mediante un proceso de biosíntesis que comienza en la piel, con la exposición a la radiación ultravioleta B presente en la luz solar, y que adicionalmente puede ser obtenida de la dieta. En términos generales, el proceso comienza cuando el 7-dehidrocolesterol (pro-vitamina D₃) es convertido en un compuesto denominado como pre-vitamina D₃ mediante síntesis fotoquímica. Dicha pre-vitamina es convertida en la vitamina D₃ (colecalfiferol) por un cambio conformacional; a saber, una isomerización que ocurre en las capas basales de la epidermis. Se sabe que la vitamina D₃ viaja por el torrente sanguíneo unida a una proteína denominada como proteína de unión a vitamina D. Una vez en el hígado, la vitamina D₃ es hidroxilada por la enzima 25-hidroxilasa y como consecuencia se genera el 25-hidroxicolecalciferol. Dicho compuesto es posteriormente hidroxilado en la posición 1 α , ahora en el riñón, por la enzima 1 α -hidroxilasa, dando como resultado la generación del secosteroide activo: el 1 α ,25-dihidroxicolecalciferol, también conocido como calcitriol. Por otro lado, la acción del calcitriol es limitada por el catabolismo, debido principalmente a la acción de la enzima 24-hidroxilasa, la cual genera compuestos inactivos (como el 1 α ,24,25-trihidroxicolecalciferol) que son finalmente excretados del organismo (Deeb et al., 2007).

3.3 Mecanismo de acción del calcitriol.

El calcitriol es el metabolito de la vitamina D que presenta la mayor actividad biológica en la regulación de la homeostasis del calcio y la mineralización de los huesos y se sabe que su deficiencia está relacionada con la osteoporosis y el raquitismo (Holick, 1996). Para ejercer sus efectos biológicos, el calcitriol debe unirse con el receptor de la vitamina D (VDR), el cual es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares que, en los mamíferos, está presente en casi todos los tejidos, lo cual indica una amplia y diversa actividad fisiológica. El VDR actúa como un factor de transcripción y se ha demostrado que forma heterodímeros con el receptor X de retinoides (RXR), otro receptor nuclear cuyo ligando es el ácido 9-cis-retinoico. Dicho heterodímero reconoce sitios específicos en el DNA, denominados como elementos de respuesta a la vitamina D (VDREs). Los VDREs se componen de dos secuencias repetidas, con seis nucleótidos cada una, separadas por una región intermedia de un número variable de nucleótidos (generalmente 3 o 4). Por ejemplo, la secuencia GGTCCA-NNN-GGTCCA (donde N se refiere a cualquier nucleótido) es conocida como VDRE tipo DR3. Es interesante destacar que para la activación de la transcripción, el VDR ocupa el repetido hacia 3' mientras que el RXR ocupa el repetido hacia 5' del VDRE (Carlberg y Campbell, 2013) (figura 2).

Se ha demostrado la presencia de este tipo de VDREs en los promotores proximales de varios genes cuya transcripción es activada por el calcitriol; como ejemplos tenemos el de CYP24A1, que codifica para la enzima responsable del catabolismo del calcitriol; BGLAP, que codifica para la osteocalcina expresada en células del hueso y CDKN1A, que codifica para p21, un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas (Deeb et al., 2007). Cabe señalar que los niveles de inducción del gen CYP24A1, debidos al calcitriol, llegan a ser

mayores a 10,000 veces, por lo que es considerado como el blanco más sensible a dicho metabolito. En contraste, la mayoría de los otros genes blanco son mucho menos sensibles y generalmente presentan niveles de inducción de dos veces, o menos, ante el tratamiento con el calcitriol (Carlberg, 2011).

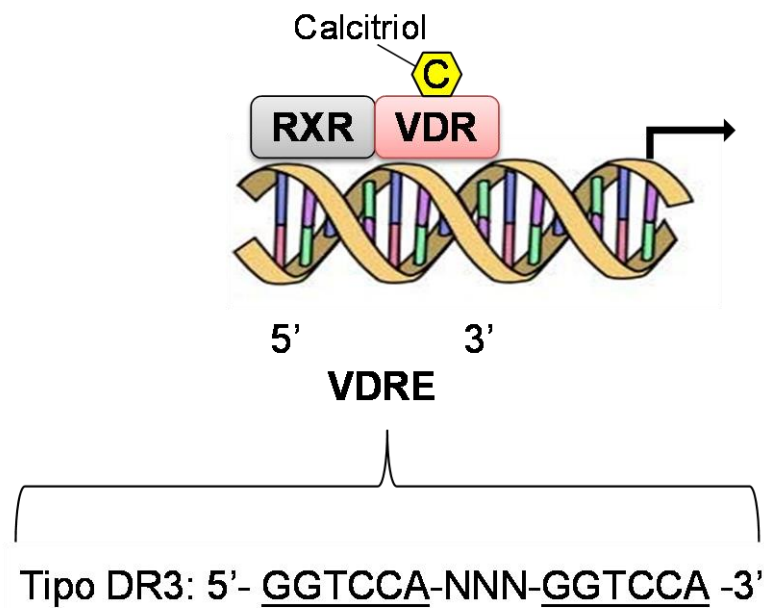


Figura 2. Regulación transcripcional mediada por el calcitriol. Los efectos genómicos del calcitriol requieren de su unión al receptor de la vitamina D (VDR) asociado al receptor X a retinoides (RXR). El heterodímero se une a regiones específicas del DNA genómico denominadas como elementos de respuesta a la vitamina D (VDREs) para activar la transcripción de los genes blancos del calcitriol. Los VDREs generalmente se localizan en el promotor de un gen blanco y el tipo DR3 es el que se ha reportado en mayor proporción.

3.4 Actividad antitumoral del calcitriol.

La evidencia epidemiológica ha mostrado una asociación entre la deficiencia de vitamina D y el riesgo de padecer cáncer (Garland et al., 2006). En particular, varios estudios epidemiológicos han mostrado una correlación entre un bajo nivel sérico del 25-hidroxicolecalciferol (el metabolito aceptado como medida de las reservas corporales de vitamina D) y un riesgo incrementado para cáncer colorectal, de mama y de próstata (Trump et al., 2010; Pereira et al., 2012). De manera interesante, estudios realizados con ratones VDR^{-/-} mostraron hiperproliferación y un incremento en la actividad mitótica en el colon descendente, lo cual indicó un posible papel de la señalización regulada por el calcitriol en el contexto de la supresión de tumores (Kallay et al., 2001). Actualmente, la evidencia experimental plantea que el tratamiento con calcitriol genera un efecto de inhibición sobre la progresión del ciclo celular en células tumorales pero las bases moleculares que describen dicho efecto difieren de un tipo de células tumorales a otro.

Por ejemplo: el calcitriol activa la transcripción de CDKN1A e induce la diferenciación y el arresto del ciclo celular en células mielomonocíticas humanas U937. Por otro lado, en células MCF7 de cáncer de mama el calcitriol aumenta la expresión de CDKN1A y también de CDKN1B (el cual codifica para p27, un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas) y reprime la expresión de varias ciclinas (D1, D3, A1 y E1) y con ello conduce a la inhibición de la actividad de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y a la hipofosforilación de pRb (Deeb et al., 2007). Además de los efectos del calcitriol sobre la inhibición de la proliferación de células tumorales, existen reportes que demuestran que dicha hormona también regula elementos importantes de la apoptosis, reprimiendo la expresión de proteínas anti-apoptóticas como BCL2 y BCL-XL, o induciendo la expresión de proteínas

pro-apoptóticas (como BAX, BAK y BAD) (Trump et al., 2010). Cabe señalar que el mecanismo mediante el cual el calcitriol reprime la expresión génica es poco conocido; sin embargo, se ha propuesto la participación de elementos de respuesta a la vitamina D negativos (nVDREs) o la competencia por la unión al DNA entre el VDR y otros factores de transcripción. Recientemente, nuestro grupo de investigación reportó evidencia sobre el mecanismo por el cual el calcitriol inhibe la expresión del oncogén hEAG1, el cual codifica para un canal iónico que favorece el desarrollo tumoral. Se identificó que el promotor del gen hEAG1 contiene un elemento regulador negativo, tipo caja E, y su relación con la disociación de un complejo multiproteico formado por el VDR, el RXR, el factor de transcripción del síndrome de Williams y el represor de la interacción de la vitamina D, en presencia del calcitriol (Cázares-Ordoñez et al., 2015).

Otros estudios han descubierto un nuevo grupo de blancos cuya expresión puede ser regulada por el calcitriol: los microRNAs (Wang et al., 2011, Gocek et al., 2011; Álvarez-Díaz et al., 2012; Kasiappan et al., 2012; Feldman et al., 2014). En general, se ha observado una mayor proporción de microRNAs inducidos por el calcitriol que aquellos disminuidos en su expresión (Giangreco y Nonn, 2013). El hecho de que el calcitriol regule la expresión de genes mediante microRNAs ha abierto un nuevo e interesante tema de estudio, dada la importancia de estos pequeños RNAs no codificantes en la fisiología celular.

4. Antecedentes.

Las hormonas esteroideas regulan una amplia variedad de procesos fundamentales para el organismo. Estudios recientes han demostrado que los efectos hormonales también implican la modificación de la expresión de microRNAs. Por ejemplo: el estradiol puede tanto inducir como inhibir la expresión de microRNAs en células humanas de cáncer de mama y en células de endometrio, así como en células de glándula mamaria de rata y de útero de ratón (Klinge, 2012). Por otro lado, en un estudio realizado con calcitriol y con testosterona en células de cáncer de próstata, se evaluó tanto el perfil de expresión de RNAs mensajeros como el de microRNAs y se observó que ambas hormonas pueden regular la degradación de RNAs mensajeros mediante la acción de microRNAs. Estas observaciones revelaron la presencia de circuitos de regulación muy precisos que generan cambios generales en la cantidad tanto de RNAs mensajeros como de proteínas (Wang et al., 2011).

Como se mencionó previamente, en la vía canónica de biogénesis de los microRNAs participan una serie de proteínas que actúan de manera coordinada desde el núcleo hasta el citoplasma. Aunque los genes que codifican dichas proteínas están identificados, se sabe poco sobre los factores que regulan su expresión. El tema de la regulación de la maquinaria de biogénesis de los microRNAs está en sus inicios; sin embargo, existe evidencia de que la acción hormonal puede tener un papel importante en ese contexto (Fletcher et al., 2014; González-Duarte et al., 2014). Uno de los primeros estudios sobre este tema demostró que la expresión del gen humano de Dicer es inducible por el estradiol. En dicho trabajo se observó que el estradiol aumentó la expresión del RNA mensajero de Dicer en células MCF-7 de cáncer de mama. Los autores del trabajo reportaron que además de que el estradiol modificó la expresión de algunos microRNAs,

también aumentó la expresión de la enzima Dicer, cuya función es crucial en el mecanismo general de silenciamiento por RNAs. Estos resultados indicaron que el estradiol podría influir sobre la biogénesis de los microRNAs (Bhat-Nakshatri et al., 2009).

Otro trabajo importante sobre la regulación de componentes de la biogénesis de los microRNAs por hormonas esteroideas fue realizado utilizando el útero de ratones. En dicho estudio se evaluaron los efectos del estradiol y la progesterona sobre la expresión de Drosha, DGCR8, exportina 5 y Dicer. Los autores reportaron que tanto el estradiol como la progesterona aumentaron la expresión del RNA mensajero de la exportina 5, mientras que sólo la progesterona aumentó la expresión del RNA mensajero de Dicer. También observaron que dicho efecto en la cantidad del RNA mensajero coincidió con el incremento de las proteínas correspondientes, en ambos genes (Nothnick et al., 2010).

Para determinar si el aumento detectado en la expresión de la exportina 5 y de Dicer podía favorecer el procesamiento de los microRNAs, los autores evaluaron la expresión del microRNA-451, el cual ya habían descrito como inducible por el estradiol en el tejido uterino (Nothnick, 2008). Los investigadores observaron que la expresión del microRNA-451 fue incrementada por ambas hormonas en los mismos tiempos de tratamiento donde se detectó el aumento en la expresión de la exportina 5 y de Dicer. Por lo anterior sugieren que esto podría ser un mecanismo adicional con el que las hormonas esteroideas favorecerían el procesamiento de los microRNAs (Nothnick et al., 2010).

Las helicasas de RNA, DDX5 y DDX17 son otros componentes asociados a la biogénesis de los microRNAs, formando parte del complejo del microprocesador (Gregory et al., 2004). Se ha descrito que DDX5 es en realidad una proteína multifuncional que puede interactuar con otras proteínas como las Smads (que son transductores de señales de la familia de TGF- β) y el supresor de tumores p53 (Warner et al., 2004; Bates et al., 2005).

Además DDX5 funciona como un coactivador de receptores nucleares como el receptor de andrógenos y el receptor de la vitamina D (Clark et al., 2008; Wagner et al., 2012). Esta información indica que dichas helicasas participan en la respuesta celular ante el estímulo hormonal y, por otro lado, plantea la pregunta sobre si la expresión de DDX5 y DDX17 puede ser blanco de algunas hormonas. Hasta ahora, la helicasa GTRH/DDX25, expresada específicamente en testículo y esencial para la espermatogénesis, es el único ejemplo descrito de una helicasa de RNA regulada por una hormona: la gonadotropina coriónica humana (Tsai-Morris et al., 2010).

Los efectos genómicos de las hormonas implican, generalmente, la participación de receptores nucleares específicos que regulan la transcripción de los genes blanco. La información actual muestra que las hormonas esteroideas modifican tanto la expresión de genes que codifican proteínas como la de genes que codifican microRNAs. Diversos trabajos indican que las hormonas esteroideas pueden aumentar directamente la expresión de microRNAs mediante la acción de los receptores nucleares; no obstante, otro panorama factible consiste en que algunos de los genes que codifican para las proteínas de la maquinaria de biogénesis de los microRNAs tengan elementos de respuesta a hormonas en regiones específicas (como el promotor del gen) y que un aumento en su expresión contribuya con un aumento en el procesamiento de los microRNAs. Esto nos indica que el mecanismo específico y detallado no está completamente definido. El panorama actual se resume gráficamente en la figura 3.

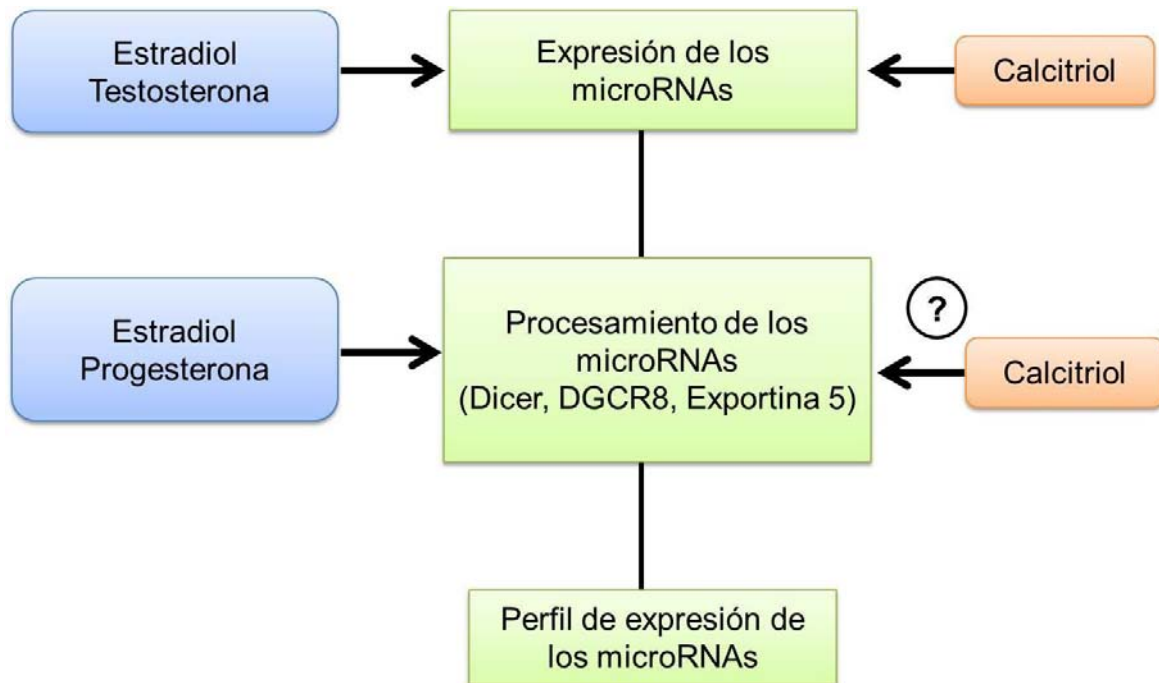


Figura 3. Evidencia científica sobre la regulación hormonal de la biogénesis de los microRNAs. Varios reportes indican que las hormonas esteroideas pueden regular la expresión tanto de los microRNAs como de algunos componentes de la maquinaria de biogénesis, lo que finalmente afecta el perfil de expresión de los microRNAs en las células. Otros trabajos han demostrado que el calcitriol también modifica la expresión de los microRNAs, pero no describen alguna modulación en la expresión de componentes de la vía de biogénesis.

Un hallazgo fundamental en la biología del cáncer ha sido la observación de que los tumores humanos presentan cambios en su perfil de expresión de microRNAs, en comparación con los tejidos sanos (Lu et al., 2005; Jansson y Lund 2012). Otros estudios mostraron la acumulación de pri-microRNAs en las células tumorales, lo cual indicó una posible alteración en la vía de biogénesis de los microRNAs (Thomson et al., 2006). La evidencia que apoya la idea anterior se encontró en anomalías en el número de copias de los genes de Dicer, exportina 5 y Argonauta 2 en cáncer de mama y de ovario, así como en el melanoma (Zhang et al., 2006; Kim et al., 2010). Adicionalmente, la disminución en la expresión de componentes de la biogénesis de los microRNAs ha sido

asociada a un mal pronóstico en el carcinoma hepatocelular (Kitagawa et al., 2013). Un estudio clave en este contexto demostró que la falta de Drosha, DGCR8 o Dicer promueve drásticamente la generación de tumores y sus cualidades invasivas (Kumar et al., 2007). Como se mencionó previamente, la ribonucleasa Dicer es un componente fundamental del procesamiento de los microRNAs. De manera interesante, se ha demostrado que en varios tipos de cáncer existe específicamente una disminución en la expresión de Dicer, y esto se ha relacionado con un mal pronóstico en los pacientes (Merritt et al., 2008; Guo et al., 2012; He et al., 2014). Además, se ha propuesto que dicha disminución está asociada con la metástasis (Martello et al., 2010). En cuanto a las helicasas de RNA DDX5 y DDX17, hay estudios con líneas celulares que han mostrado que ambas participan en la proliferación y en la diferenciación celular, aunque su función específica está poco establecida. También se ha propuesto que la alteración en la expresión y/o la función de ambas juega un papel importante en el desarrollo del cáncer. De hecho, hay estudios que describen que DDX5 y DDX17 inducen la proliferación celular y que podrían ser oncogénicas; sin embargo, también hay varios ejemplos en donde DDX5 y DDX17 tienen acciones inhibitorias sobre la proliferación, actuando como supresores de tumores. Aunque estos datos parecen contradictorios, hay que resaltar que indican que la función precisa de DDX5 y DDX17 podría depender del tipo celular del tumor y de la expresión de otras proteínas con las cuales interactúan estas helicasas (Fuller-Pace y Moore, 2011; Paris et al., 2012).

Los diversos reportes que asocian las alteraciones en la expresión de componentes de la biogénesis de los microRNAs con el desarrollo del cáncer aportan información biomédica valiosa para considerar a estos genes, y sus proteínas, como potenciales biomarcadores en el cáncer e incluso como nuevos blancos terapéuticos (van Kouwenhove et al., 2011;

Díaz-García et al., 2013; De Santa et al., 2013). Aunque el estudio de la regulación de la maquinaria de biogénesis de los microRNAs ha comenzado recientemente, sugiere la participación de diversos factores celulares. Parte de la evidencia experimental actual muestra que las hormonas esteroideas pueden aumentar la expresión de algunos componentes clave del procesamiento de los microRNAs y así favorecer la maduración de estos. Considerando que el calcitriol aumenta la expresión de microRNAs en diversas células tumorales, en el presente estudio utilizamos líneas celulares de cáncer cervical para investigar si dicha hormona modifica la expresión de componentes de la maquinaria de biogénesis de los microRNAs y, de manera relacionada, la expresión diferencial de microRNAs.

5. Hipótesis.

El calcitriol modula la expresión génica de componentes de la maquinaria de biogénesis de los microRNAs, por tanto modifica el perfil de expresión de los microRNAs.

6. Objetivo general.

Estudiar el efecto del calcitriol tanto en la expresión de los principales genes de la biogénesis como en el perfil de expresión de los microRNAs mediante técnicas *in vitro* y análisis computacionales.

7. Objetivos específicos.

1. Determinar si alguno de los componentes de la biogénesis de los microRNAs modifica su expresión debido al calcitriol (utilizando líneas celulares de cáncer cervical).
2. Identificar posibles VDREs en los genes que cambiaron su expresión ante el tratamiento con el calcitriol y evaluar la funcionalidad de dichos VDREs.
3. Obtener el perfil de expresión de microRNAs, ante el tratamiento con el calcitriol, para plantear un panorama relacionado con los cambios en la expresión de genes de la maquinaria de biogénesis.

8. Materiales y métodos.

8.1 Cultivo celular.

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer cervical humano SiHa, HeLa y C33-A obtenidas del ATCC (E.E.U.U.). Las células fueron cultivadas en el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) alto en glucosa y con rojo de fenol (Gibco, E.E.U.U.), suplementado con 5 % de suero fetal bovino inactivado (Thermo, E.E.U.U.) y antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina, obtenidos de Gibco, E.E.U.U.). Para los experimentos, las células fueron sembradas en medio de cultivo DMEM suplementado con 5 % de suero fetal bovino inactivado y tratado con carbón-dextran para eliminar los esteroides del suero. Se utilizaron condiciones estándar de incubación de 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO₂. Las células fueron incubadas durante 24 horas antes del tratamiento con el calcitriol o con 0.1 % de etanol (vehículo del calcitriol) como control. El calcitriol utilizado fue donado por Hoffmann-La Roche Ltd (Suiza).

8.2 Construcción del plásmido pGL4.10-promotorDDX5.

El promotor del gen DDX5 humano fue reportado por Rossler (Rossler et al., 2000) y esto fue considerado para clonarlo en un sistema de gen reportero. Un fragmento de 860 pb fue obtenido mediante PCR utilizando una polimerasa de DNA de alta especificidad (AccuPrime GC-Rich DNA Polymerase de Invitrogen, E.E.U.U.) y los reactivos incluidos con la enzima. Como templado se utilizó DNA genómico humano obtenido de un individuo sano mediante el kit *comercial* Illustra blood genomicPrep Midi Flow (GE Healthcare

Lifesciences, E.E.U.U). Los oligonucleótidos 5'-ATTCTCGAGGCCTGCCATGTTTC-3' y 5'-TTCTCGAGGACACCAGCCGAAG-3' incluyeron un sitio para la enzima de restricción Xho I (subrayado) para utilizarlo en la clonación molecular. Elegimos dicha enzima porque previamente verificamos que el inserto no fuera cortado por ella, utilizando el programa NEBcutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). El programa utilizado para PCR fue: 95 °C por 3 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 65 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto y una extensión final a 72 °C por 10 minutos. El tamaño del producto de PCR fue verificado en geles de agarosa al 1 %. El fragmento de DNA fue ligado con la enzima T4 ligasa (Promega, E.E.U.U.) en el sitio de clonación múltiple del vector pGL4.10 (Promega, E.E.U.U.), el cual carece de un promotor y contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga como reportero. El plásmido generado: pGL4.10-promotorDDX5 fue utilizado para transformar bacterias DH5 α (*E. coli*) mediante el método químico y para la selección de las clonas positivas se utilizó "PCR de colonia" (agregando una pequeña cantidad de bacterias a cada reacción de PCR para obtener el templado). El plásmido producido por los cultivos bacterianos seleccionados fue purificado utilizando el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, E.E.U.U.). Considerando que el fragmento de PCR clonado tenía en cada extremo un sitio para Xho I y, precisamente, para evitar tener un plásmido equivocado, comprobamos tener la construcción correcta. La orientación adecuada del inserto fue determinada mediante PCR: utilizando el mismo oligonucleótido directo que en el PCR de colonia y un oligonucleótido reverso que se alinea dentro del promotor de DDX5. La secuencia del inserto fue verificada por secuenciación de DNA utilizando el sistema Dye terminador cycle sequencing with Quick

Start kit (Beckman Coulter, E.E.U.U.) en un secuenciador automático CEQ 8800 marca Beckman Coulter.

8.3 Transfección de las células y ensayos de actividad de luciferasa.

Las células fueron cultivadas en placas de seis pozos hasta alcanzar una confluencia aproximada del 80 %, requerida para la transfección con el reactivo FuGENE HD (Roche, Alemania) y 1 µg del plásmido pGL4.10-promotorDDX5. Dado que utilizamos el sistema Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega, E.E.U.U.) para determinar la actividad de la luciferasa, se realizó también la cotransfección con 2.5 ng del plásmido pGL4.73 (que expresa a la luciferasa de *Renilla reniformis* bajo el control del promotor del SV40; Promega, E.E.U.U.). Esto sirvió como un control de la eficiencia del procedimiento de transfección y para normalizar los datos obtenidos. El periodo de incubación con la mezcla de reacción para transfección fue de 24 horas y posteriormente el medio de cultivo fue reemplazado con medio fresco con los tratamientos correspondientes. En estos experimentos también utilizamos el ácido 9-cis-retinoico (Santa Cruz Biotechnology, E.E.U.U.) disuelto en etanol, como en el caso del calcitriol. Las células fueron cosechadas 24 horas después del tratamiento, utilizando una solución amortiguadora de lisis pasiva 1X (Promega, E.E.U.U.) y para determinar la luminiscencia se utilizó un equipo multimodal HT Synergy (Biotek Instruments, E.E.U.U.).

8.4 Extracción del RNA total y síntesis de cDNA.

Se utilizó el protocolo estándar para la extracción del RNA total (Chomczynski y Sacchi, 1987) utilizando el reactivo TRI-Reagent (Ambion, E.E.U.U.). El RNA obtenido fue disuelto en agua grado PCR (Promega, E.E.U.U.), cuantificado mediante espectrofotometría (260 nm / 280 nm) y su integridad fue evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa. Su almacenamiento fue a -70 °C. Para la síntesis del cDNA, se utilizaron 3 µg de RNA total y el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche, Alemania) utilizando el método de cebado con oligo-(dT)₁₈ y una temperatura de síntesis de 42 °C durante 90 minutos.

8.5 PCR en tiempo real (qPCR).

Para el diseño de los ensayos de qPCR se utilizó el programa computacional ProbeFinder de Roche Applied Science (<http://qpcr.probefinder.com/organism.jsp>) empleando las secuencias de los RNAs mensajeros de los genes: Drosha, DGCR8, DDX5, DDX17, exportina 5 (XPO 5), Dicer, Argonauta 2 (EIF2C2), CYP24A1 y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), obtenidas del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Los experimentos fueron realizados con el cDNA previamente obtenido y la mezcla de reacción para PCR del sistema LightCycler 2.0 (Roche, Alemania) que implica el uso de sondas de hidrólisis tipo TaqMan de la Universal Probe Library para humano. Los parámetros de PCR utilizados en estos experimentos fueron los siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 95 °C por 10 min, 45 ciclos de 94 °C por 10 segundos, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 segundo, tal y como se indica en el protocolo del equipo de Roche. Los datos obtenidos fueron procesados con el software LightCycler 4.1 de Roche, utilizando un análisis de cuantificación relativa. Los

resultados fueron normalizados con respecto a la expresión del gen GAPDH, ya que es una referencia adecuada porque su expresión no es afectada por el calcitriol (Avila et al., 2010; Cázares-Ordoñez et al., 2015). En la tabla 1 se muestra el símbolo oficial de cada gen, el número de acceso del RNA mensajero, los oligonucleótidos y la sondas tipo TaqMan utilizados para qPCR.

Tabla 1. Oligonucleótidos y sondas utilizados para evaluar la expresión génica mediante qPCR.

Gen	Número de acceso (mRNA)	Oligonucleótidos	Sonda
DROSHA	NM_013235	5'-GGCCCGAGAGCCTTTTATAG-3' 5'-TGCACACGTCTAACTCTTCCAC-3'	17
DGCR8	NM_022720	5'-AAAACCTTGCGAAGAATAAAGCTG-3' 5'-TCTGTTTAACAAAGTCAGGGATGA-3'	47
DDX17	NM_006386	5'-GATCGTGACCGTGGAGGAT-3' 5'-AAATTTCTTCGGGGGAAGG-3'	77
DDX5	NM_004396	5'-GCCATGTCGGGTTATTCG-3' 5'-GGTTTCCAACTTCTTTCCAGA-3'	69
XPO5	NM_020750	5'-TATATACTCTCCGCCGCACA-3' 5'-GCCTCTTCAGAAAGACGTAGTGT-3'	25
DICER1	NM_177438	5'-TCCGATGGTTCTCGAAGG-3' 5'-GCAAAGCAGGGCTTTTCAT-3'	47
EIF2C2	NM_012154	5'-GTCTCTGAAGGCCAGTTCCA-3' 5'-ATACAGGCCTCACGGATGG-3'	22
GAPDH	AF261085	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3' 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'	60
CYP24A1	NM_000782.3	5'-CATCATGGCCATCAAACAA-3' 5'-GCAGCTCGACTGGAGTGAC-3'	88

8.6 Identificación de posibles VDREs con herramientas computacionales.

Para la detección de posibles VDREs utilizamos dos estrategias computacionales, dependiendo de la información biológica disponible para cada gen. Para el caso de DDX5, donde el promotor está caracterizado experimentalmente, utilizamos el programa MatInspector (Cartharius et al., 2005) de la compañía Genomatix (<http://www.genomatix.de>) que utiliza una amplia compilación de matrices descriptivas para localizar los posibles sitios de unión de los factores de transcripción en secuencias de DNA. La secuencia del promotor de DDX5 humano fue comparada con la secuencia ortóloga de ratón (obtenida de las bases de datos en www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) mediante un alineamiento con el programa ClustalW2 (<http://ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

En el caso de Dicer, donde el promotor no ha sido caracterizado experimentalmente, la secuencia del promotor fue obtenida del UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) (Kent et al., 2002). Se utilizaron secuencias genómicas de Dicer, tanto de humano como de ratón (UC001ydx.2 y UC007oxi.1, respectivamente), de 5000 pares de bases en dirección 5' desde el sitio de inicio de la transcripción, es decir, donde estaría ubicado el promotor del gen. Para la identificación de los posibles VDREs se utilizó el programa JASPAR v.4.0 (<http://jaspar.genereg.net>) (Portales-Casamar et al., 2010) y la matriz MA0074.1 específica para RXR-VDR. Para destacar los VDREs biológicamente relevantes, compartidos entre humano y ratón, se utilizó el programa ConSite (<http://asp.ii.uib.no:8090/cgi-bin/CONSITE/consite>) (Sandelin et al. 2004) para obtener un análisis de huellas filogenéticas.

8.7 Western blot.

Para la obtención de las proteínas se realizó la lisis de las células con la solución amortiguadora RIPA (fosfato de sodio dibásico 9.1 mM, fosfato de sodio monobásico 1.7 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1 %, SDS 0.1 %, pH 7.4) complementada con inhibidores de proteasas del reactivo Complete (Roche, Alemania) e inhibidores de fosfatasas (ortovanadato de sodio 1 mM y fluoruro de sodio 1 mM). La concentración de proteínas se determinó por el método del ácido bicinconínico (Pierce Thermo Scientific, E.E.U.U.). Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10 % y la transferencia de las proteínas se hizo en membranas de nitrocelulosa. Para la transferencia de la proteína de Dicer (218 kDa) se utilizó el método sumergido (25 volts, toda la noche a 4 °C); mientras que para la proteína de DDX5 (68 kDa) se utilizó el método semi-seco (15 volts, 1 hora a temperatura ambiente). Se utilizó leche al 5 % en la solución amortiguadora TBS (TRIS-HCl 10 mM, NaCl 50 mM; pH 8.0) como solución bloqueadora. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti Dicer (1:200, sc-136980) y anti DDX5 (1:200, sc-166167), ambos obtenidos de Santa Cruz Biotechnology, E.E.U.U., y para tener un control de carga utilizamos un anticuerpo anti GAPDH (1:10000, MAB374) de Millipore, E.E.U.U. Las proteínas de interés fueron detectadas mediante un kit de quimioluminiscencia (Thermo Scientific, E.E.U.U.) y la densidad óptica de las bandas fue determinada mediante un equipo Molecular Imager ChemiDoc XRS System y el programa Image Lab Software (BioRad, E.E.U.U.).

8.8 Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).

Se utilizaron células SiHa tratadas con calcitriol 100 nM por 3 horas para obtener el extracto nuclear con el kit Nuclear Extract (Sigma, E.E.U.U.). Para realizar el EMSA se utilizó el kit Gel Shift Assay System (Promega, E.E.U.U.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos para generar las sondas de doble cadena se muestran en la tabla 2. En cada reacción se utilizaron 17.5 fmol de sonda de DNA marcada con [γ - 32 P-ATP], 2 μ g de poli(dI-dC) y 5 o 6 μ g de extracto nuclear (para DDX5 o Dicer, respectivamente). Para identificar a las proteínas involucradas en la formación de los complejos de DNA-proteína, se realizaron incubaciones de 30 minutos con 3 μ g de los anticuerpos anti VDR (sc-13133 X) o anti RXR (sc-774 X), obtenidos de Santa Cruz Biotechnology, E.E.U.U. En los ensayos de competencia se utilizó un exceso molar de 100 veces de la sonda correspondiente sin marca, por cada reacción. Los complejos de DNA-proteína obtenidos fueron resueltos en geles no-desnaturalizantes de poliacrilamida al 4 % y la señal fue visualizada mediante autorradiografía.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en el ensayo de EMSA.

Gen	Nombre de la sonda	Oligonucleótidos complementarios
DDX5	VDRE tipo DR4 (secuencia consenso)	5'- AGCTTCGGTCCACACTGGTCCAGAGAGC -3'
		5'- GCTCTCTGGACCAGTGTGGACCGAAGCT -3'
DDX5	VDRE-1	5'- CTGCGGCGTAGGAGGCGGTCCAGACTAT -3'
		5'- ATAGTCTGGACCGCCTCCTACGCCGCAG -3'
DDX5	VDRE-2	5'- GGGAGGGGTGAAAGCGCGGCGATCCTGG -3'
		5'- CCAGGATCGCCGCGCTTTCACCCCTCCC -3'
DDX5	VDRE-1 mut	5'- CTGCGGacTAGGAGGccTCCAGACTAT -3'
		5'- ATAGTCTGGAGGGCCTCCTAGTCCGCAG -3'
DDX5	VDRE-2 mut	5'- GGGAGGccTGAAAGCGacGCGATCCTGG -3'
		5'- CCAGGATCGCGTCGCTTTCAGGCCTCCC -3'
Dicer	VDRE tipo DR3 (secuencia consenso)	5'-AGCTTCAGGTCAAGGAGGTCAAGAGAGCT-3'
		5'-AGCTCTCTGACCTCCTTGACCTGAAGCT-3'
Dicer	Dicer-VDRE	5'-TGGCTGGGGGGCCGGGATTAACCTT-3'
		5'-AAGGTTAATCCCGGCCCCCAAGCCA-3'
Dicer	Dicer-VDRE-Mut	5'-TGGCTttGGGGCCGttATTAACCTT-3'
		5'-AAGGTTAATAACGGCCCCAAAGCCA-3'

8.9 Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

Se utilizaron células SiHa tratadas con calcitriol 1 μ M durante 2 horas, o con 0.1% de etanol como control, para obtener la cromatina y procesarla. Para el entrecruzamiento se utilizó formaldehído al 1 %, incubando las células por 15 minutos. Las células fueron recolectadas con solución PBS 1X fría y centrifugadas brevemente para compactarlas, luego fueron resuspendidas en una solución amortiguadora de lisis (SDS 1 %, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8.1) y sonicadas con un equipo Ultrasonic Processor modelo GEX500 (Geneq Inc., Canada) utilizando 7 ciclos de 30 segundos (35 % de amplitud). Las

muestras fueron almacenadas a -70 °C hasta ser utilizadas para la inmunoprecipitación de la cromatina. Es importante mencionar que la integridad del DNA fue verificada mediante electroforesis en geles de agarosa (antes y después de la sonicación) para garantizar resultados certeros. El procedimiento realizado para la inmunoprecipitación de la cromatina en estos ensayos fue el correspondiente al del kit EZ-Magna ChIP A-Chromatin Immunoprecipitation Kit (Merck Millipore, E.E.U.U.). La inmunoprecipitación fue realizada utilizando los anticuerpos anti VDR y anti RXR, mencionados en la sección previa, y se utilizó una IgG de ratón (sc-2025, Santa Cruz Biotechnology, E.E.U.U.) como control negativo. Todas las muestras fueron tratadas con NaCl 5 M a 65 °C toda la noche para revertir el entrecruzamiento de las moléculas y después se hizo una incubación con proteinasa K a 45 °C por 1 hora. El DNA fue purificado con el kit Wizard DNA Clean-Up System (Promega, E.E.U.U) y utilizado para los experimentos de PCR. Para el caso de los posibles VDREs ubicados en el promotor proximal del gen de DDX5, se utilizaron los oligonucleótidos 5'- CGGGGCGATTAGGTCATAGA -3' y 5'- GAGGAAGGACACCGATGACA-3' para el VDRE-1 (amplicón de 157 pb) y los oligonucleótidos 5'- TGCTTGAGGTGTGGAAAGAC-3' y 5'-CGCTCTATGACCTAATCGCC-3' para el VDRE-2 (amplicón de 183 pb). El programa para PCR fue: 95 °C por 2 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos y una extensión final a 72 °C por 30 segundos. Para el caso del posible VDRE en el promotor del gen de Dicer, se utilizaron los oligonucleótidos 5'- AGGTGCTCAGAGGGAAGCTA -3' y 5'- CATGAGAGCGAGCCTGTGAT -3' (amplicón de 330 pb). El programa para PCR fue: 95 °C por 2 minutos, 35 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos y una extensión final a 72 °C por 30 segundos. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 2 %.

8.10 Análisis de la expresión de los microRNAs.

Se cultivaron células SiHa para ser tratadas con calcitriol 1 μ M o con etanol 0.1 % (vehículo) durante 24 o 48 horas y extraer el RNA total, utilizando el reactivo TRIzol. La concentración del RNA se determinó con un equipo Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, E.E.U.U.) y la integridad fue determinada con un equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, E.E.U.U.), verificando que las muestras de RNA tuvieran un valor de integridad igual o mayor a 9.0 para ser procesadas para el análisis con los microarreglos. Para este estudio, se realizaron dos experimentos independientes, con seis réplicas cada uno por cada condición experimental (calcitriol vs vehículo a 24 y 48 horas). A partir de las muestras de los dos experimentos independientes, se prepararon dos mezclas de RNA total para los microarreglos (N = 2). Cada mezcla de RNA consistió en la combinación equimolar del RNA total de seis réplicas experimentales (tres réplicas de un experimento y tres réplicas del otro, por cada condición). Por lo anterior, se utilizaron 8 microarreglos en este estudio. La expresión de los microRNAs fue evaluada con el microarreglo Affymetrix GeneChip miRNA Array v3.0, el cual considera 1733 microRNAs maduros y 1658 pre-microRNAs, y el perfil de expresión se determinó utilizando el kit Affymetrix FlashTag Biotin HSR RNA labeling kit (Affymetrix, E.E.U.U.).

Se utilizó 1 μ g de RNA total para ser marcado e hibridado en el Affymetrix GeneChip. El proceso de lavados y marcaje se realizó en el equipo GeneChip Fluidics Station 450 y los arreglos fueron analizados con un Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G. Los experimentos con los microarreglos fueron realizados en la Unidad de Microarreglos del Instituto Nacional de Medicina Genómica, en la Ciudad de México. Todos los datos obtenidos fueron depositados en la base de datos GEO (Gene Expression Omnibus)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/summary/>) con el número de acceso GSE61829. El análisis computacional de los datos (en archivos CEL) fue procesado con el programa Affy library en R Bioconductor. La corrección del fondo en los microarreglos y la normalización fue realizada con el Robust Multichip Analysis (RMA) y el algoritmo de cuantiles, respectivamente. Los patrones de expresión diferencial entre las condiciones experimentales (calcitriol vs vehículo) fueron determinados con el programa Limma (para realizar una prueba de t de Student utilizando una estimación Bayesiana de la varianza). Para definir los microRNAs expresados diferencialmente, se consideró un umbral del valor de $P \leq 0.05$ y un valor de cambio de, al menos, 1.4 veces. Se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico no-supervisado con los valores normalizados de los microRNAs expresados diferencialmente, utilizando el programa ggplots en R, aplicando una escala de Z-score para evitar el dominio de los valores extremos.

8.11 Análisis de las posibles vías celulares asociadas a los microRNAs.

Para identificar los procesos celulares probablemente afectados por los microRNAs expresados diferencialmente, se utilizó la base de datos de miRWalk (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>) (Dweep et al., 2011), la cual aporta información sobre los RNAs mensajeros blanco de los microRNAs, basada en 10 algoritmos (DIANA-mT, miRanda, miRDB, miRWalk, RNAhybrid, PICTAR v4 y v5, PITA, RNA22 y TargetScan). Solamente los RNAs mensajeros blanco predichos por al menos 7 algoritmos distintos fueron considerados para el análisis de las vías celulares. Se realizó un análisis de enriquecimiento de vías con la base de datos DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (Huang et al., 2009) para obtener un posible significado biológico asociado a los RNAs mensajeros

blanco predichos. Para visualizar las vías celulares se utilizó el programa Enrichment map plugin de Cytoscape.

8.12 Análisis estadístico.

Se utilizó la prueba t de Student para muestras independientes y las diferencias fueron consideradas significativas (*) con una $p < 0.05$. Los datos han sido representados como el promedio \pm la desviación estándar y consideran el resultado de tres experimentos independientes.

9. Resultados.

En nuestros experimentos utilizamos principalmente la línea celular SiHa de cáncer cervical porque es susceptible a los efectos antiproliferativos del calcitriol, ya que expresa el VDR (Avila et al., 2010). Adicionalmente utilizamos la línea celular C-33A, también de cáncer cervical, porque identificamos que carece del VDR y ha resultado útil para comparar y contrastar nuestros resultados (Cázares-Ordoñez et al., 2015).

9.1 La expresión génica de DDX5, DGCR8 y DICER es inducible por el calcitriol en las células SiHa.

Para determinar si algunos componentes de la biogénesis de los microRNAs modifican su expresión debido al calcitriol, utilizamos la técnica de RT-qPCR para evaluar el RNA mensajero de cada uno de los principales componentes: Drosha, DGCR8, DDX5, DDX17, Exportina 5, Dicer y Argonauta 2 ante diferentes tiempos de tratamiento con la hormona. Observamos que de los siete genes evaluados solamente DDX5, DGCR8 y Dicer tuvieron un aumento en su expresión ante el tratamiento con el calcitriol (figura 4) mientras que los otros genes no tuvieron cambios (figura 5). En particular, el aumento en la expresión de DDX5 fue de un 30 % a las 3 horas del tratamiento (figura 4). Por otro lado, observamos que tanto la expresión de DGCR8 como la de Dicer aumentaron un 60 % a las 24 horas del tratamiento y un 30 % a las 48 horas (figura 4). Como un control positivo de la actividad del calcitriol en las células SiHa evaluamos la expresión del gen CYP24A1, el cual es altamente inducible por el calcitriol (figura 6).

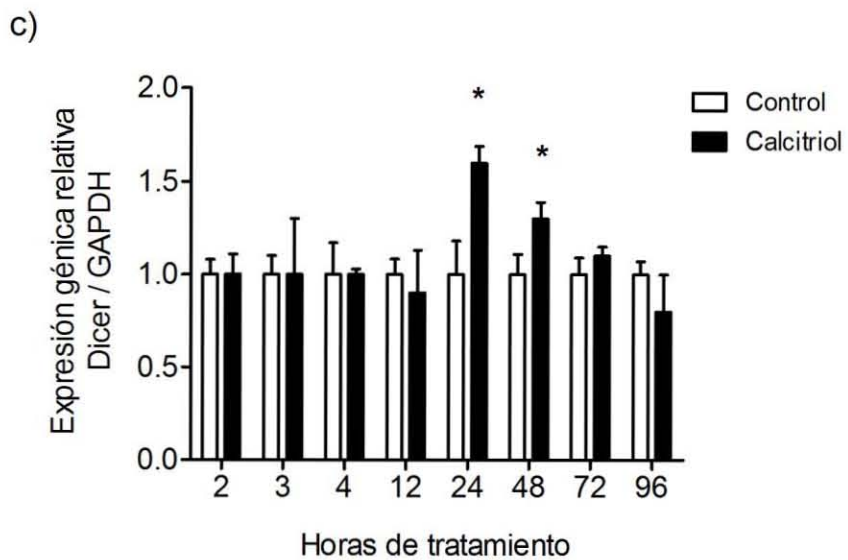
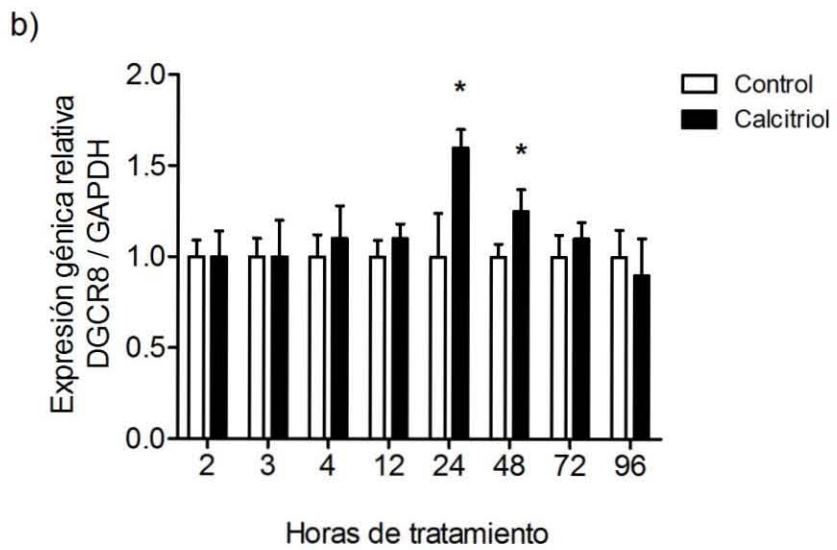
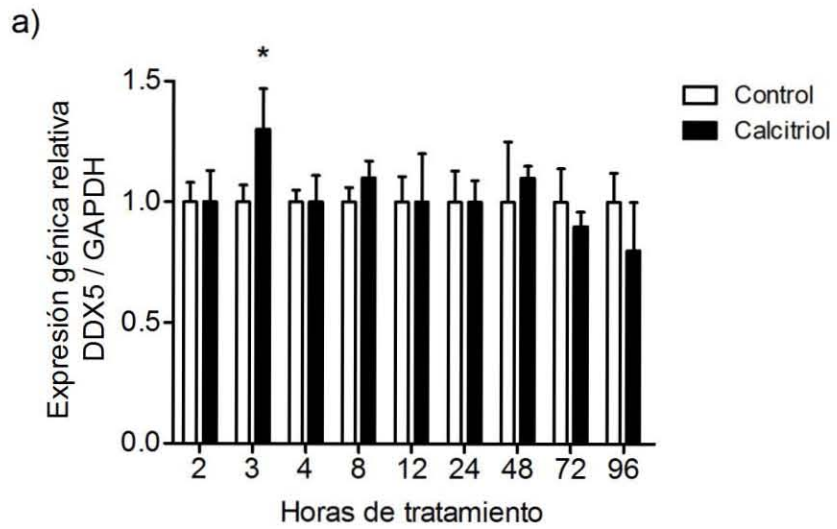


Figura 4 (página anterior). La expresión génica de DDX5, DGCR8 y Dicer es inducible por el calcitriol. Se utilizó la técnica de qPCR para evaluar la expresión de los genes DDX5 (a), DGCR8 (b) y Dicer (c) a partir del cDNA obtenido de células SiHa tratadas con calcitriol 1 μ M o con 0.1 % de etanol (control) a diferentes tiempos. Los resultados representan el promedio \pm DE de 3 experimentos independientes. * p < 0.05 vs control (vehículo). Se muestran los resultados normalizados contra la expresión del gen constitutivo GAPDH.

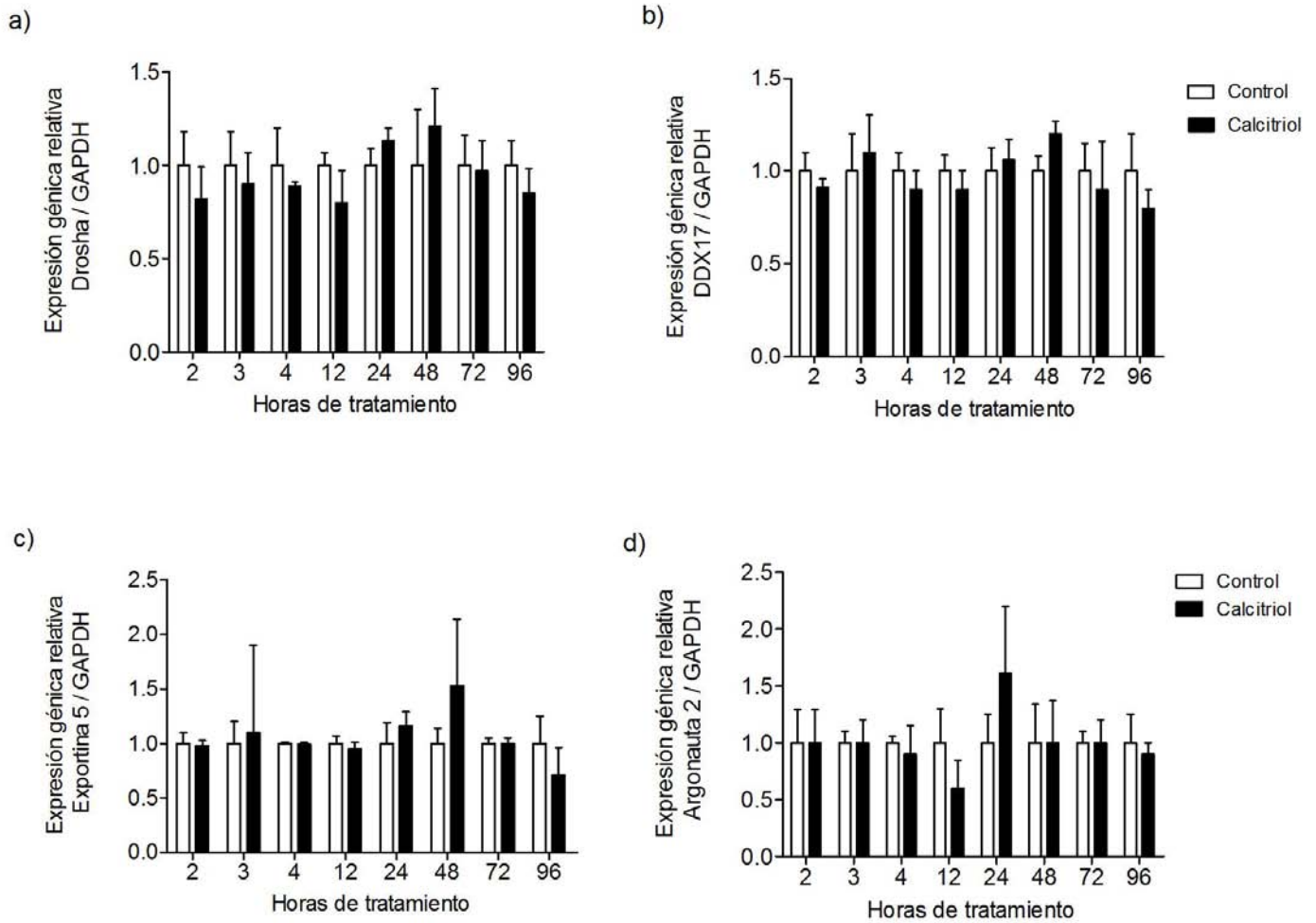


Figura 5. La expresión génica de DDX17, Droscha, Exportina 5 y Argonauta 2 no es inducible por el calcitriol. Mediante qPCR se evaluó la expresión de los genes de Droscha (a), DDX17 (b), exportina 5 (c) y Argonauta 2 (d) a partir del cDNA obtenido de células SiHa tratadas con calcitriol 1 μ M o con 0.1 % de etanol (control) a diferentes tiempos. Los resultados representan el promedio \pm DE de 3 experimentos independientes. Se muestran los resultados normalizados contra la expresión del gen constitutivo GAPDH.

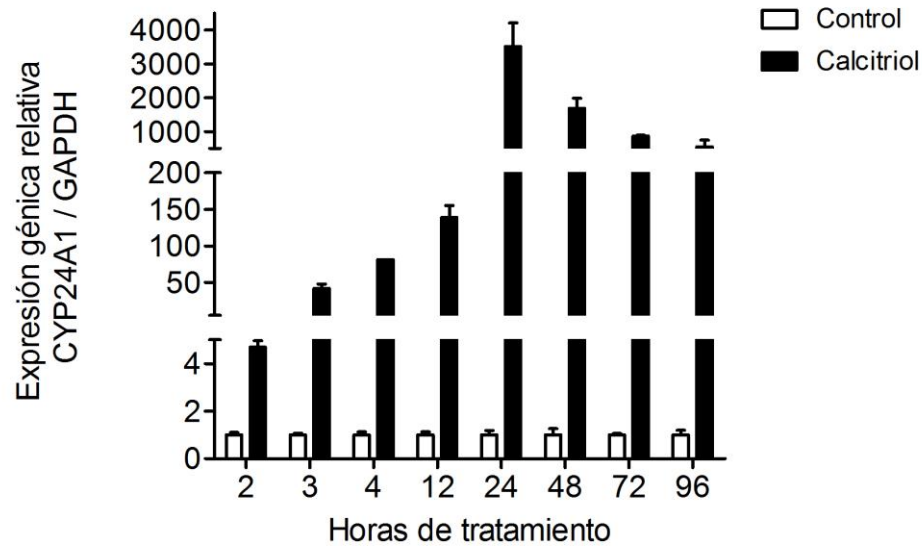


Figura 6. La expresión génica de CYP24A1 es inducida en gran proporción por el calcitriol en las células SiHa. Mediante qPCR se evaluó la expresión, como fue descrito previamente. Los resultados fueron normalizados contra la expresión del gen GAPDH.

9.2 El calcitriol aumenta la síntesis de proteína de DDX5 y de Dicer en las células SiHa.

Para determinar si el efecto del calcitriol sobre la expresión del RNA mensajero de DDX5, DGCR8 y Dicer se veía reflejado en la síntesis de proteína, realizamos ensayos de Western blot. Cabe señalar que sólo los anticuerpos primarios contra DDX5 y Dicer tuvieron la calidad necesaria para una detección clara de la proteína correspondiente. Dado que para DGCR8 no detectamos la proteína con claridad, no obtuvimos un resultado que indique su inducción más allá del RNA mensajero. En el caso de Dicer, el aumento en la cantidad proteínica ocurrió a las 24 y 48 horas del tratamiento, es decir, coincidió con la inducción del RNA mensajero (figura 7a). Por otro lado, en el caso de DDX5 observamos que el aumento en la síntesis de proteína ocurrió a las 5 horas del tratamiento con calcitriol, es decir, dos horas después que la inducción del RNA mensajero (figura 7b).

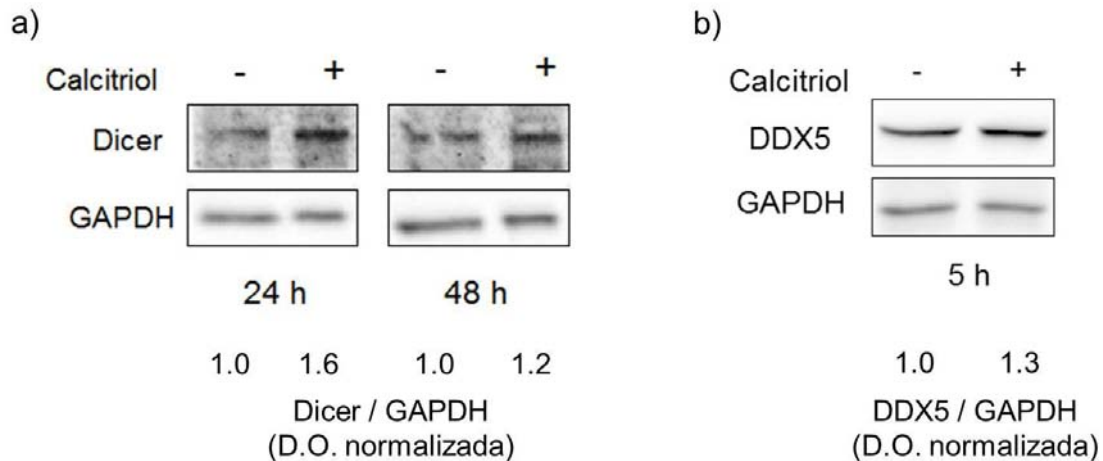


Figura 7. El calcitriol aumenta la síntesis de proteína de Dicer y de DDX5. Mediante Western blot se evaluó la proteína de Dicer (a) y de DDX5 (b) a partir de extractos celulares obtenidos de células SiHa tratadas con calcitriol 1 μ M o con 0.1 % de etanol (control) a los tiempos mencionados. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes. La densidad óptica (D.O.) de cada banda fue determinada mediante el programa Image Lab Software (BioRad) y se utilizó para determinar la proporción del cambio entre la condición con calcitriol y la condición control. Se utilizó la GAPDH como control de carga.

Para determinar si lo observado en las células SiHa ocurría en otra línea celular de cáncer cervical, utilizamos las células HeLa para las que también se ha reportado la presencia del VDR (Kloss et al., 2010). En este caso, el aumento en la proteína de Dicer se detectó solamente a las 48 horas del tratamiento con calcitriol (figura 8a). Por otro lado, en las células C33-A que no expresan el VDR, no se detectó ningún cambio en la cantidad de la proteína de Dicer (figura 8b). De manera interesante, estas observaciones coincidieron con los resultados de qPCR del RNA mensajero de Dicer en dichas células, ante el tratamiento con el calcitriol. Es importante mencionar que la expresión génica de CYP24A1 tampoco se induce en las células C33-A tratadas con calcitriol, a menos que un plásmido con el VDR sea transfectado en esas células (Cázares-Ordoñez et al., 2015). Por lo anterior, consideramos que el aumento en la cantidad de proteína de Dicer está

relacionado con la presencia del VDR en las células SiHa y HeLa.

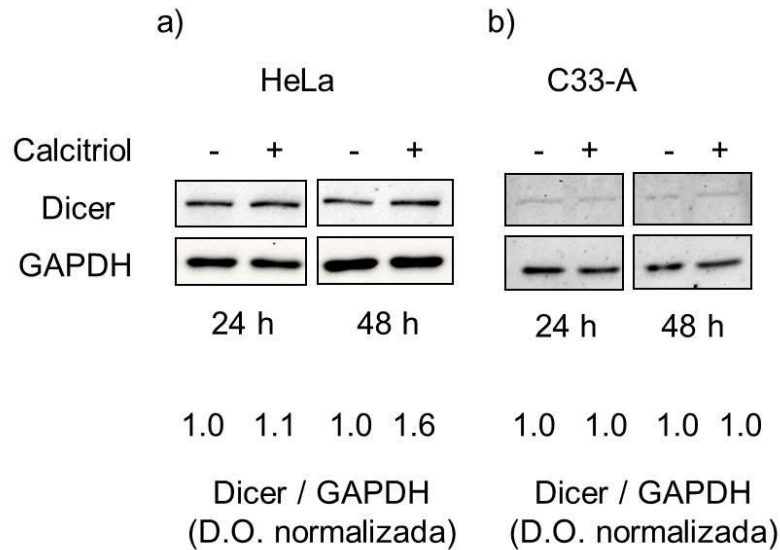


Figura 8. El calcitriol aumenta la síntesis de proteína de Dicer en células que expresan el receptor de la vitamina D. Mediante Western blot se evaluó la proteína de Dicer a partir de extractos obtenidos de células HeLa (a) y de células C33-A (b) tratadas con calcitriol 1 μ M o con 0.1 % de etanol (control) a los tiempos indicados. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes. La cantidad utilizada de proteína total fue de 60 μ g por cada carril, es decir, utilizamos la misma cantidad de proteína tanto de células HeLa como de C33-A. La densidad óptica (D.O.) de cada banda fue determinada mediante el programa Image Lab Software (BioRad) y se utilizó para determinar la proporción del cambio entre la condición con calcitriol y la condición control. Se utilizó la GAPDH como control de carga.

9.3 El aumento en la expresión de DDX5 y de Dicer requiere una concentración alta de calcitriol.

Comenzamos utilizando una concentración de 1 μ M de calcitriol para poder identificar cualquier cambio en la expresión de los componentes de la biogénesis de los microRNAs. Para determinar si el aumento en la expresión de DDX5 y de Dicer ocurría a una concentración menor, realizamos ensayos de RT-qPCR considerando los tiempos de

tratamiento previamente identificados. Observamos que sólo a la concentración de 1 μM ocurre el efecto del calcitriol en la línea celular SiHa (figura 9).

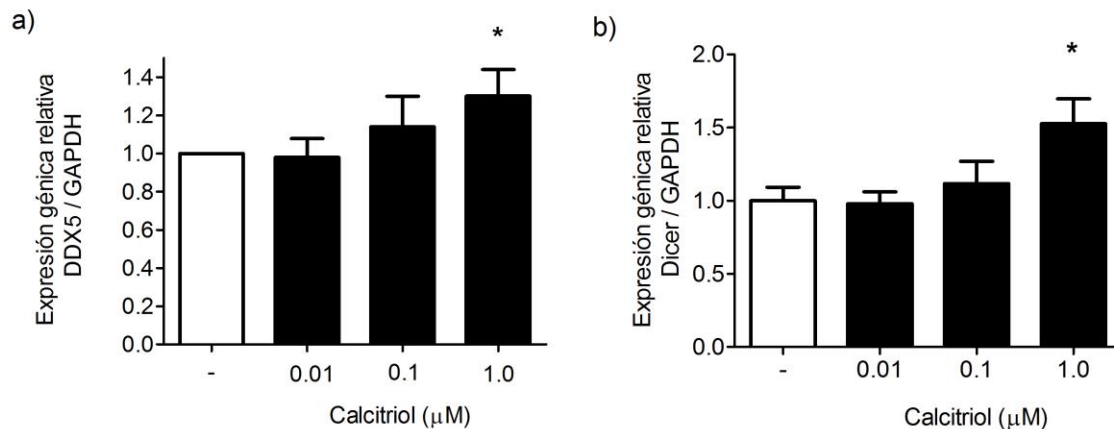


Figura 9. La expresión génica de DDX5 y de Dicer es inducible por el calcitriol sólo a una concentración alta. Se evaluaron tres concentraciones de calcitriol y 0.1 % de etanol, como control (-), para determinar la expresión de DDX5 (a) y de Dicer (b) mediante qPCR, utilizando el cDNA obtenido de células SiHa tratadas durante 3 horas para DDX5 y 24 horas para Dicer. Los resultados representan el promedio \pm DE de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs control (vehículo). Se muestran los resultados normalizados contra la expresión del gen constitutivo GAPDH.

9.4 Identificación *in silico* de posibles VDREs en el gen de DDX5 humano.

Para comenzar a estudiar el mecanismo por el cual el calcitriol aumentó la expresión de DDX5, utilizamos herramientas computacionales para identificar posibles VDREs. En el caso de DDX5, la secuencia del promotor del gen ya ha sido caracterizada (Rossler et al., 2000) y también se menciona la presencia de posibles sitios de unión para diversos factores de transcripción, lo cual sugiere una compleja regulación transcripcional de dicho promotor (Rossler et al., 2000; figura 10).

>ENA|AF015812|AF015812.1 Homo sapiens RNA helicase p68 (HUMP68) gene, complete cds.:
 Location:1..1300

```

5' -CGTCTGAAGGTCACGAGCCCCGCCGACAGCCCAGACCCAGTCCGGGCTAGCCCCGAGGCCT
      AP-2
CCCTGGAGGTGGACGGTTTCAGTCCACACATACTGGGACCCCAGGGAGACACTCACCAGC
      AP-2
ATCCGAGCCTGCCATGTTTCAGAGGCAGGTCGCCCGGGACTCCGACGCGGCCGGAAGG
CGACGGTGTCTCTGGAAGGACCGATCCACGCAGACCGACACTGGGCGCGGACGCACGAACC
AAAGCGCGGGAAGGAGGCGTGAAGAAGGACGGACGTTAAAGAGCTTCTCGCCGCTGATTG
GTCATCAGAGGAGCACTTCCTTCACAGGACGTGAAACGGGGCGGTTTGGGAAGTTTAGA
      SP1 P53
GACCATTTCTCCGCCGACCAAACCCGTCAAAGGATTATCAGACACGCGGGTCGGACGGTC
      E-box
CACATCAGCCGGCAGCCCGGGCGGGTCCCAGGGTGCAGAGCAGCGCACTTCCGGTGAGCTA
      AP-2 SP1
TTTCGTTTTGTATCCCTCCGCCGACGTC AACGGGAAAAGTAGTGCGGACCGCTCTCTCGGT
      CRE
GGTCCGGGGTGGTACAGCCACGTGACAACGCCAGGCCCGCCTTCCCCCTCTTTTGGTTA
      E-box AP-2
CAGACGTGAGGGCTCTTTGGAGACGTAAACATCTCCGAGTGGCGAGGGTGGGCGGGGCTA
      SP1
GGGCTTGGGAAAGGGCGGGTGGCTTGCTTGAGGTGTGGAAAGACCAGAAGAAGGTGAGG
      SP1
TCAAGAGAGTGCGAATGAGGCATTCCAATGGTGGGTGGGCCCTGACCTGAGAGAGTGGCG
CGGGGAGGGGTGAAAGCGCGGCGATCCTGGAACGCCAGCGGGCGTTGCGGCCTATGCGCG
      CCAAT-box
AGGGGCGGGCGATTAGGTCATAGAGCGGCTCCCAGCGTTCCTTGCGGCGTAGGAGGCGG
      SP1 +1==>
TCCAGACTACAAAAGCGGCTGCCGGAAAGCGGCCGGCACCTCATTTCATTTCTACCGGTCT
      TATA-box Inr
CTAGTAGTGCAGCTTCGGCTGGTGT CATCGGTGTCTTCTCCGCTGCCGCCCCCGCAAG
GCTTCGCCGTCATCGAGGCCATTTCCAGCGACTTGTTCGACGCTTTTCTATATACTTCGT
TCCCCGCCAACC GCAACCATGACGCCATGTCGGGTATTTCGAGTGACCGAGACCGCGGC
  
```

Figura 10. El promotor de DDX5 tiene posibles elementos reguladores para diversos factores de transcripción. La región promotora del gen DDX5 humano tiene sitios de unión SP1, AP-2, CRE, E-box y p53 que podrían ser funcionales y que implican una compleja regulación en la expresión de DDX5. En gris se muestran las regiones donde hibridan los oligonucleótidos que utilizamos en el PCR para clonar el promotor para los ensayos de gen reportero. El esquema del promotor y los sitios de unión ha sido tomado de Rossler et al., 2000 y se muestra con fines ilustrativos.

Dado que en dicho artículo no se menciona la presencia de posibles VDREs, utilizamos la secuencia reportada para el análisis computacional con MatInspector, un programa especializado en la búsqueda de elementos de respuesta a factores de transcripción. El resultado mostró dos posibles VDREs tipo DR4 ubicados en la región proximal del promotor: uno de -49 a -34 (VDRE-1) y otro de -149 a -134 (VDRE-2) con respecto al sitio

de inicio de la transcripción (figura 11a). Para tener información sobre la posible relevancia biológica de ambos VDREs realizamos un alineamiento con la secuencia ortóloga del ratón y encontramos una similitud importante en el caso del VDRE-1, lo que sugirió una posible conservación evolutiva (figura 11b).

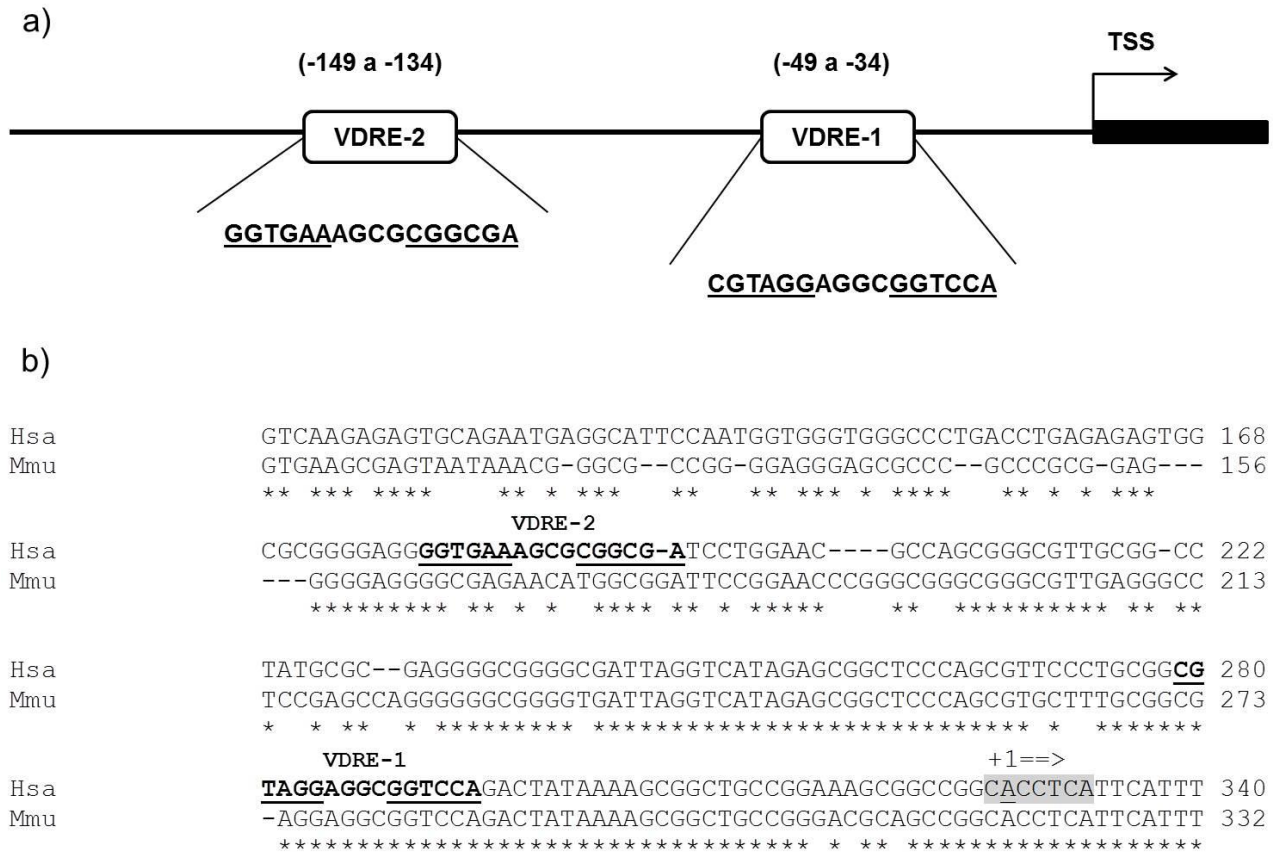


Figura 11. El promotor del gen DDX5 tiene dos posibles elementos de respuesta a la vitamina D. En la parte superior de la figura (a) se representan los posibles VDREs tipo DR4, ubicados de -49 a -34 (VDRE-1) y de -149 a -134 (VDRE-2) a -149. Se muestra que la secuencia de cada uno de ellos consiste de dos hexámeros (subrayados) separados por cuatro nucleótidos. En la parte inferior (b) se muestra un alineamiento entre la secuencia del promotor de DDX5 humano (Hsa) y la región ortóloga de ratón (Mmu) donde se señalan los dos probables VDREs detectados con MatInspector. Se indica también el elemento Inr (CACCTCA) correspondiente al sitio de inicio de la transcripción (TSS) descrito por Rossler y cols. en el promotor de DDX5 humano.

b)

		Oligo reverso	<=Inr	
Query	78	CGAGG GACACCAGCCGAAG CTGCACTACTAGAGACCGGTAGAAAT GAATGAGGT GCCGGCC		137
Sbjct	310084	CGAT GACACCAGCCGAAG CTGCACTACTAGAGACCGGTAGAAAT GAATGAGGT GCCGGCC		310143
		VDRE-1		
Query	138	GCTTTCGGCAGCCGCTTTTATAGTCTGGACCGCCTCCTACGCCGACAGGGAACGCTGGGA		197
Sbjct	310144	GCTTTCGGCAGCCGCTTTTATAGTCTGGACCGCCTCCTACGCCGACAGGGAACGCTGGGA		310203
Query	198	GCCGCTCTATGACCTAATCGCCCCGCCCTCGCGCATAGGCCGCAACGCCCGCTGGCGTT		257
Sbjct	310204	GCCGCTCTATGACCTAATCGCCCCGCCCTCGCGCATAGGCCGCAACGCCCGCTGGCGTT		310263
		VDRE-2		
Query	258	CCAGGATCGCCGCGCTTTACCCCTCCCCGCGCCACTCTCTCAGGTCAGGGCCACCCAC		317
Sbjct	310264	CCAGGATCGCCGCGCTTTACCCCTCCCCGCGCCACTCTCTCAGGTCAGGGCCACCCAC		310323
Query	318	CATTGGAATGCCTCATTCTGCACTCTCTTGACCTCACCTTCTTCTGGTCTTTCCACACCT		377
Sbjct	310324	CATTGGAATGCCTCATTCTGCACTCTCTTGACCTCACCTTCTTCTGGTCTTTCCACACCT		310383
Query	378	CAAGCAAGCCACCCCGCCCTTTCCAAGCCCAGCCCCGCCACCCTCGCCACTCGGAGAT		437
Sbjct	310384	CAAGCAAGCCACCCCGCCCTTTCCAAGCCCAGCCCCGCCACCCTCGCCACTCGGAGAT		310443
Query	438	GTTTACGTCTCCAAGAGCCCTCACGTCTGTAACCAAAGAGGGGGAAGGCGGGCCTGG		497
Sbjct	310444	GTTTACGTCTCCAAGAGCCCTCACGTCTGTAACCAAAGAGGGGGAAGGCGGGCCTGG		310503

Figura 12 (inicia en la página anterior): Secuenciación de DNA del promotor de DDX5 clonado. Se verificó la secuencia y la orientación correctas del promotor de DDX5 clonado en el vector pGL4.10 que contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga como reportero. Se muestra el resultado de un alineamiento entre las secuencias que obtuvimos con los oligonucleótidos directo (a) y reverso (b), incluidos con el kit del vector pGL4.10 de Promega, y la secuencia reportada del promotor de DDX5 humano. Se señalan en letras negras los oligonucleótidos (directo y reverso) que se utilizaron para amplificar previamente el promotor de DDX5 y se observa que coinciden con la orientación correcta en el vector (ambos aquí representados en orientación de 5' a 3'). Adicionalmente, se señalan, como referencia, el sitio de inicio de la transcripción (Inr) y los dos VDREs que detectamos. El alineamiento de la secuencias fue realizado con el programa en línea BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

De entre los sitios de unión identificados por Rossler y cols., nos interesaron aquellos de alta afinidad para el factor de transcripción AP-2. Ya que el ácido 9-cis-retinoico induce la actividad de AP-2 (Luscher et al., 1989) evaluamos la respuesta del gen reportero ante el tratamiento con el ácido 9-cis-retinoico, como un control positivo de la funcionalidad del promotor que clonamos. Lo que observamos fue un aumento en la actividad de la

luciferasa tanto con el ácido 9-cis-retinoico como con el calcitriol en las células SiHa (figura 13, barras negras). El aumento en la actividad de la luciferasa generado por el ácido 9-cis-retinoico fue de un 50 % mientras que el del calcitriol fue del 40 %, con respecto a la condición control. Estos resultados mostraron que el promotor proximal de DDX5 que clonamos tiene una secuencia funcional y que es inducible por el calcitriol. Aunque en el artículo citado de Rossler y cols. no se menciona la presencia de VDREs, nuestros resultados indicaron esa posibilidad. Para determinar si el VDR era necesario en el mecanismo de inducción, utilizamos a la línea celular C33-A carente del VDR (Cázares-Ordoñez et al., 2015) para transfección con nuestra construcción y observamos que no hubo aumento en la actividad de luciferasa con el calcitriol (figura 13, barras blancas). Adicionalmente y para complementar estos resultados, realizamos experimentos en células C33-A tratadas con ácido 9-cis retinoico y observamos un aumento en la actividad de la luciferasa (figura 13, barras blancas), de manera similar a lo descrito en células SiHa. Este resultado complementario confirmó la funcionalidad de nuestra construcción y nos indicó, de manera indirecta, que la ausencia del VDR impide la inducción del promotor de DDX5 por el calcitriol.

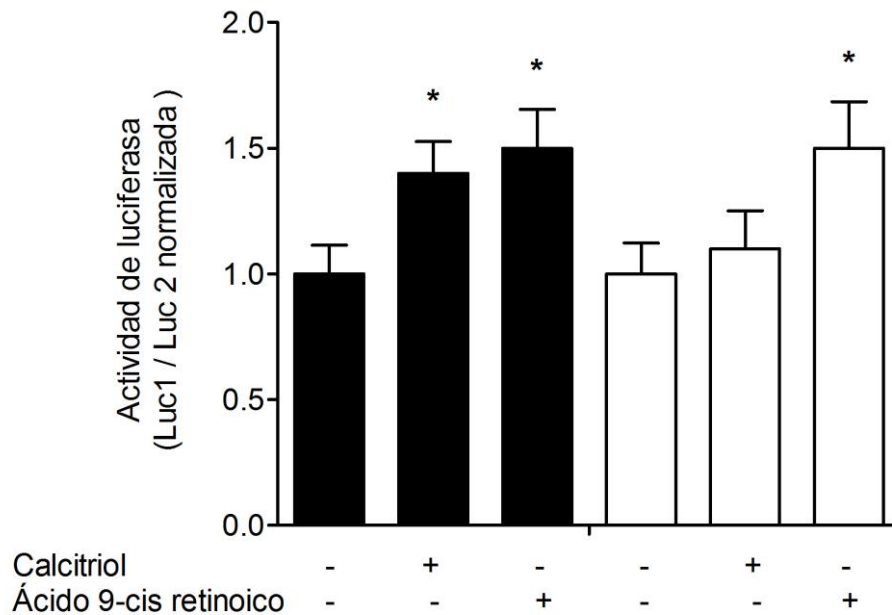


Figura 13. El promotor del gen DDX5 humano es inducible por el calcitriol y requiere del VDR. Las células SiHa (VDR positivas; barras negras) y las células C33-A (VDR negativas, barras blancas) fueron transfectadas tanto con el plásmido pGL4.10-promotorDDX5 como con el vector de expresión de luciferasa de *Renilla*, el cual se utilizó para normalizar la eficiencia de la transfección. Después del tratamiento con calcitriol 1 μ M o con ácido 9-cis retinoico 1 μ M o con 0.1 % de etanol (control), por 24 horas, las células fueron cosechadas para los ensayos de actividad de luciferasa. Los resultados representan el promedio \pm DE de 3 experimentos independientes con el sistema dual de luciferasas (Luc1 / Luc2). * $p < 0.05$ vs respectivo control (-). Los datos se normalizaron asignando el valor de 1 a la condición control correspondiente.

9.6 La expresión génica de DDX5 también es inducible por el ácido 9-cis-retinoico.

Tomando en cuenta los resultados de los ensayos con el gen reportero, donde detectamos que el promotor de DDX5 es inducible por el ácido 9-cis-retinoico, evaluamos mediante RT-qPCR si ocurría un aumento en la transcripción de DDX5 en las células SiHa. En este caso observamos un aumento del 30 % en la expresión de DDX5 a las 4 horas del tratamiento con ácido 9-cis-retinoico (figura 14a), algo similar a lo sucedido con el calcitriol. Como un control positivo, determinamos también la expresión de CYP24A1 ante el

tratamiento con dicho retinoide y observamos un efecto de inducción (figura 14b), como ha sido descrito en la literatura científica (Zou et al., 1997).

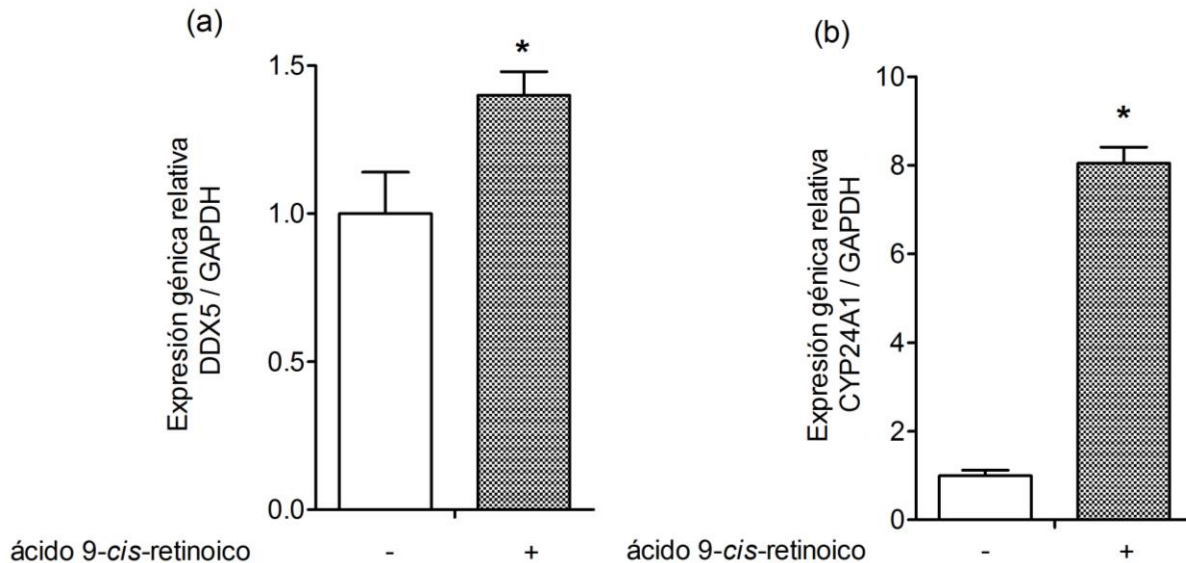


Figura 14. La expresión génica de DDX5 es inducible por el ácido 9-*cis*-retinoico. Mediante RT-qPCR se detectaron los niveles de expresión de DDX5 (a) y de CYP24A1 (b) a partir del cDNA obtenido de células SiHa tratadas con ácido 9-*cis*-retinoico 1 μ M por 4 horas. Los resultados representan el promedio \pm DE de 2 experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs vehículo (-). Se muestran los resultados normalizados contra la expresión del gen constitutivo GAPDH.

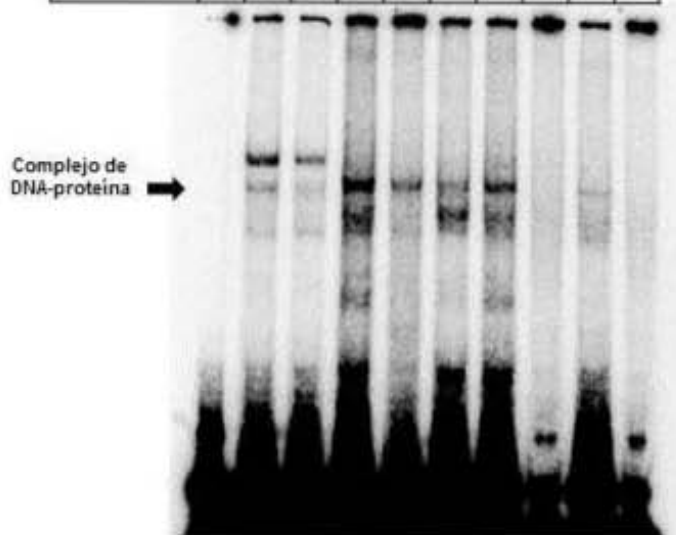
9.7 El VDR se une al VDRE-1 en el promotor proximal de DDX5 *in vitro*.

Para evaluar de manera *in vitro* si había unión entre el VDR y los probables VDREs detectados con el programa MatInspector, realizamos ensayos de retardo en la movilidad de la electroforesis utilizando sondas de DNA de doble cadena marcadas radiactivamente y el extracto nuclear de células SiHa. Adicionalmente, se incluyó como referencia una sonda con un VDRE consenso tipo DR4 (Deeb et al., 2007) (figura 15a, carriles 2 y 3). Encontramos que sólo el VDRE-1 (del -49 a -34) generó un complejo de DNA-proteína (figura 15a, carril 4).

La formación de dicho complejo disminuyó cuando se utilizó la secuencia mutada del VDRE-1 (figura 15a, carril 5). Para verificar la presencia del VDR, utilizamos un anticuerpo contra dicho factor de transcripción. En la condición con el VDRE-1 observamos que la banda del complejo de DNA-proteína disminuyó, lo cual indicó que el anticuerpo bloqueó la unión del factor de transcripción (figura 15a, carriles 4 y 6). Al utilizar un anticuerpo anti IgG de ratón, como control negativo, no observamos modificación en el complejo previamente mencionado (figura 15a, carriles 4 y 7). Para complementar estos estudios, realizamos ensayos de competencia entre el VDRE-1 marcado radiactivamente y un exceso de 100 veces tanto de la sonda silvestre como de la mutada, sin marcaje radiactivo. Observamos que sólo la sonda silvestre pudo competir eficientemente, mostrando una disminución en la banda del complejo de DNA-proteína (figura 15b, carriles 2, 3 y 4). En el caso del VDRE-2 (del -149 a -134) no hubo formación de complejo de DNA-proteína (figura 15a, carril 8).

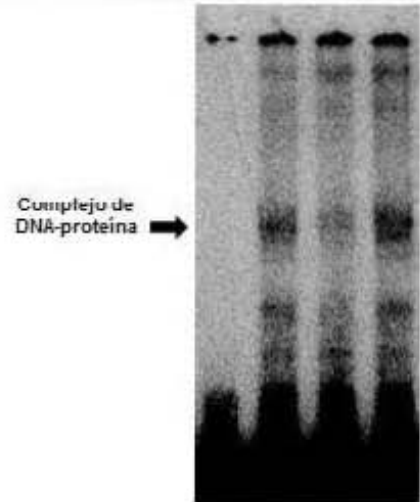
a)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
VDRE-DR4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Extracto nuclear	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VDRE-2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
VDRE-2 mut	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
VDRE-1	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
VDRE-1 mut	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Anti-VDR	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
Anti-IgG	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-



b)

	1	2	3	4
VDRE-1 marcado	+	+	+	+
Extracto nuclear	-	+	+	+
100X VDRE-1 sin marcar	-	-	+	-
100X VDRE-1 mut sin marcar	-	-	-	+



c)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
VDRE-DR4	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Extracto nuclear	-	+	+	+	+	+	+	+	+
VDRE-1	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Anti-VDR	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Anti-RXR	-	-	-	+	-	-	+	-	+
Anti-IgG	-	-	-	-	-	-	-	+	-

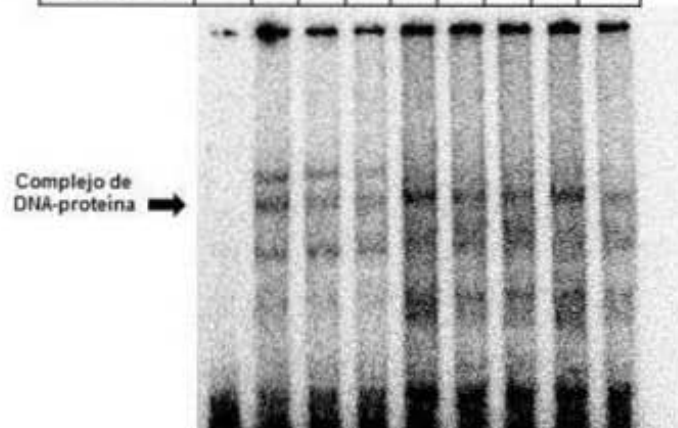


Figura 15 (página anterior). El VDR se une al VDRE-1 (del -49 a -34) ubicado en el promotor proximal de DDX5 *in vitro*. Se utilizó el extracto nuclear de células SiHa y sondas de DNA de doble cadena marcadas con ³²P en cada reacción. La capacidad de formación de complejos de DNA-proteína tanto del VDRE-1 como del VDRE-2 fue evaluada y comparada con secuencias mutantes de cada elemento de respuesta (a). Se realizaron ensayos de competencia para verificar la especificidad de la unión del VDRE-1 (b) y la presencia del VDR y el RXR fue detectada mediante anticuerpos dirigidos contra dichos factores de transcripción (c). Como referencia se utilizó la secuencia de un VDRE tipo DR4 y como control negativo se utilizó un anticuerpo no relacionado (IgG de ratón).

Finalmente, para verificar la presencia del heterodímero VDR-RXR en el complejo que se une al VDRE-1 utilizamos anticuerpos anti VDR y anti RXR, por separado y en combinación. Observamos la disminución en la formación de la banda correspondiente al complejo con cada anticuerpo y en combinación (figura 15c, carriles 6, 7, 8 y 9). Por lo anterior, concluimos que solamente uno de los dos posibles VDREs detectados con el programa MatInspector fue reconocido por el VDR *in vitro*: el VDRE-1, que es el más cercano al sitio de inicio de la transcripción del gen DDX5.

9.8 El VDR se une al VDRE-1 en el promotor proximal de DDX5 *in vivo*.

Considerando el resultado de los ensayos de EMSA, realizamos experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina para determinar si el VDRE-1 era funcional *in vivo* en las células SiHa. Utilizando el DNA purificado de las reacciones de inmunoprecipitación, realizamos ensayos de PCR para detectar el fragmento que abarcaba el VDRE-1 y adicionalmente probamos con el VDRE-2. Confirmamos que el VDR se une al VDRE-1 ya que observamos un producto único de PCR del tamaño esperado (157 pb) cuya banda era más intensa en la condición con calcitriol que en aquella con el vehículo, utilizando el anticuerpo anti VDR (figura 16a). De manera interesante, al repetir todo el experimento utilizando las células C33-A, carentes del VDR, no obtuvimos el producto de 157 pb del

VDRE-1 (figura 16c).

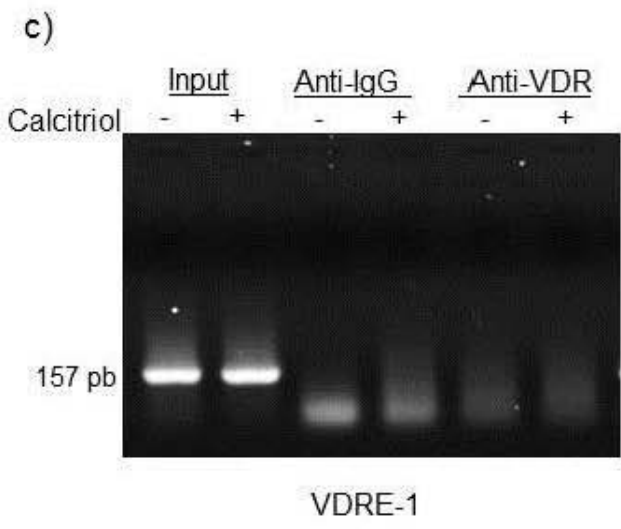
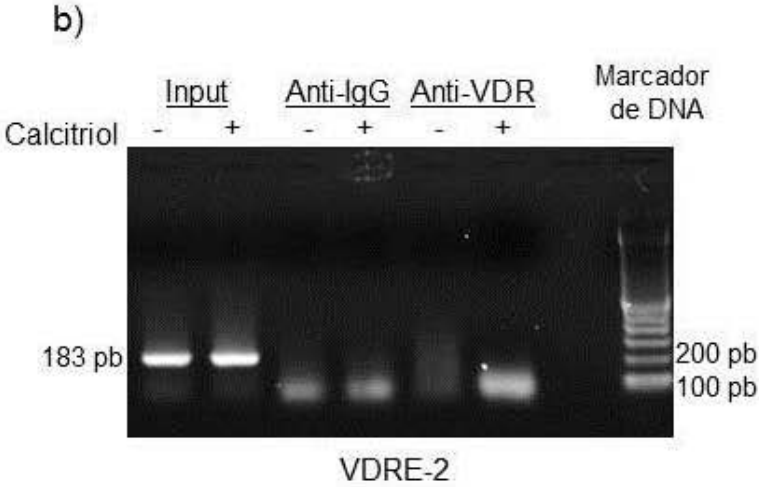
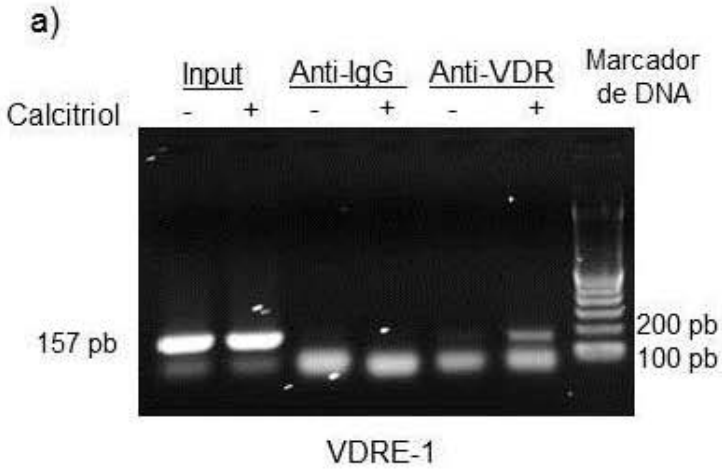


Figura 16 (página anterior). El VDRE-1 (del -49 a -34) en el promotor proximal del gen DDX5 es funcional *in vivo*. La cromatina obtenida de las células SiHa y C33-A fue procesada para inmunoprecipitación con los anticuerpos mencionados (anti VDR o IgG de ratón). El DNA obtenido y purificado fue utilizado para la amplificación del producto correspondiente mediante PCR. Se evaluó la obtención del amplicón de 157 pb del VDRE-1 (a) y del amplicón de 183 pb del VDRE-2 (b) y se observó que sólo el VDRE-1 se une *in vivo* al VDR en células SiHa. En células C33-A, carentes del VDR, no se detectó el amplicón del VDRE-1 (c). El DNA de los input se utilizó como control positivo y el de la inmunoprecipitación con anti IgG de ratón como control negativo.

Por otro lado, en el caso del VDRE-2 no hubo amplificación del producto esperado de 183 pb, excepto en el input (figura 16b), lo cual coincidió con lo obtenido mediante EMSA. En todos los casos se utilizó un anticuerpo no relacionado anti IgG de ratón como control negativo. De estos experimentos concluimos que, ante el tratamiento con calcitriol, el VDR puede unirse *in vivo* al VDRE-1 ubicado en el promotor del gen DDX5 en las células SiHa de cáncer cervical.

9.9 Identificación in silico de posibles VDREs en el gen de Dicer humano.

El gen de Dicer fue otro caso donde detectamos un aumento en la expresión ante el tratamiento con calcitriol; sin embargo, para este gen no existe un estudio que haya caracterizado funcionalmente el promotor y por lo tanto se utilizó otra estrategia. La secuencia genómica correspondiente al promotor de Dicer, ubicada en el cromosoma 14 humano, fue obtenida con la base de datos del UCSC Genome Browser y después analizada con los programas JASPAR y ConSite, especializados en la búsqueda de elementos de respuesta a factores de transcripción. El resultado mostró un posible VDRE tipo DR3 que además está conservado evolutivamente entre el humano y el ratón, ubicado en la región 95,623,977 a 95,623,963 del cromosoma 14 humano, río arriba del probable

sitio de inicio de la transcripción (figura 17).

```

Hsa      TCCAGTCCAGGCGCTGGGCGCAAACGCCTCTCCGGCCTCCGCGCGCGCGCCCGCTGTCT
Mmu      -TCGGTCTTCGCATTGGGCCTCCGACGC-----GGCCTCGGCCCGAGTCTGCTGTCT
          *  **   *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
                                VDRE
Hsa      CCCTGCTCCTGAGTGGCTGGGGGGCCGGGATTAACCTTTACCGCCAGGCCCTGTCCAAT
Mmu      CCCGGCTTCTGAGTGGCTGGGGGGCCGGGGTTAACCTTTACCTCCGCGCTCCGTCCAAT
          ***  ***  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
Hsa      CACAGGCTCGCTCTCATGCCGCCACGGGGCGAGCGGAGCGTGGGGGCGCGGAGGGGCGGT
Mmu      CACAGGACGGCTTTTCATGCGGCCGCGGGGCGAGC-GAGCGAGGGGGCGCGGAGCGGCGGC
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
Hsa      GCGGGAGCCAGTGGGATTCTCCAAGCGGCTGTGCGCCGTTGCCGCGGGCCGTGCGCTGGC
Mmu      GC-GACGCCGGTGGGATTCTCCAAGCCGCTGTGCGCCGTCGCCGCGGGCCGAGCGCGGGC
          **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

Figura 17. El promotor del gen Dicer tiene un posible VDRE. Se muestra un alineamiento entre la secuencia del promotor de Dicer humano (Hsa) y la región ortóloga de ratón (Mmu) donde se señala el probable VDRE tipo DR3 detectado con los programas JASPAR y ConSite. Se muestra que la secuencia consiste de dos hexámeros (subrayados) separados por tres nucleótidos. El posible VDRE está ubicado en la región 95,623,977 a 95,623,963 del cromosoma 14 humano, hacia el 5' desde el probable sitio de inicio de la transcripción.

9.10 El VDR se une al VDRE en el promotor de Dicer in vitro.

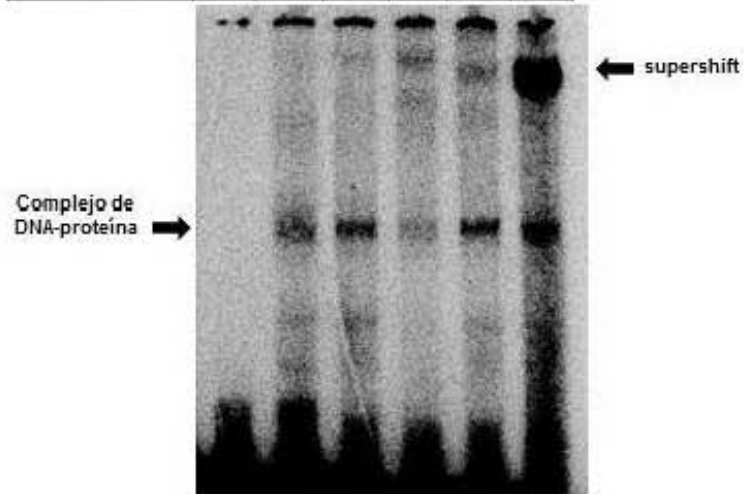
Para determinar si el VDR se unía al posible VDRE ubicado en el gen de Dicer realizamos ensayos de EMSA, como fue para el caso del gen DDX5. Utilizamos una sonda con el posible VDRE en Dicer (Dicer-VDRE) y observamos que el complejo de DNA-proteína formado fue similar al obtenido con una sonda con un VDRE consenso tipo DR3 (Qi et al., 2002) que sirvió como referencia (figura 18a, carriles 2 y 3). Al utilizar una sonda con el Dicer-VDRE mutado se disminuyó la formación del complejo (figura 18a, carril 4).

En este caso, cuando utilizamos el anticuerpo anti VDR notamos la formación de un nuevo complejo de mayor tamaño y menor migración conocido como súper-retardo o supershift (figura 18a, carril 5). Por otro lado, cuando utilizamos el anticuerpo anti RXR para

confirmar la presencia del heterodímero VDR-RXR, el complejo de súper-retardo se volvió de mayor intensidad (figura 18a, carril 6). Para complementar estos experimentos, realizamos ensayos de competencia entre el Dicer-VDRE marcado radiactivamente y un exceso molar de 100 veces tanto de la sonda silvestre como de la mutada sin marcar. Observamos que solamente la sonda silvestre compitió eficientemente la interacción, mostrando una disminución en la banda del complejo de DNA-proteína (figura 18b, carriles 5, 6 y 7). Con estos resultados confirmamos que el VDRE ubicado en el gen de Dicer interactúa con el VDR *in vitro*.

a)

	1	2	3	4	5	6
VDRE-DR3	+	+	-	-	-	-
Extracto nuclear	-	+	+	+	+	+
Dicer-VDRE	-	-	+	-	+	+
Dicer-VDRE mut	-	-	-	+	-	-
Anti-VDR	-	-	-	-	+	-
Anti-RXR	-	-	-	-	-	+



b)

	1	2	3	4	5	6	7
VDRE-DR3	+	+	-	-	-	-	-
Extracto nuclear	-	+	+	+	+	+	+
Dicer-VDRE	-	-	+	-	+	+	-
Dicer-VDRE mut	-	-	-	+	-	-	+
100X Dicer-VDRE sin marcar	-	-	-	-	+	-	+
100X Dicer-VDRE mut sin marcar	-	-	-	-	-	+	-

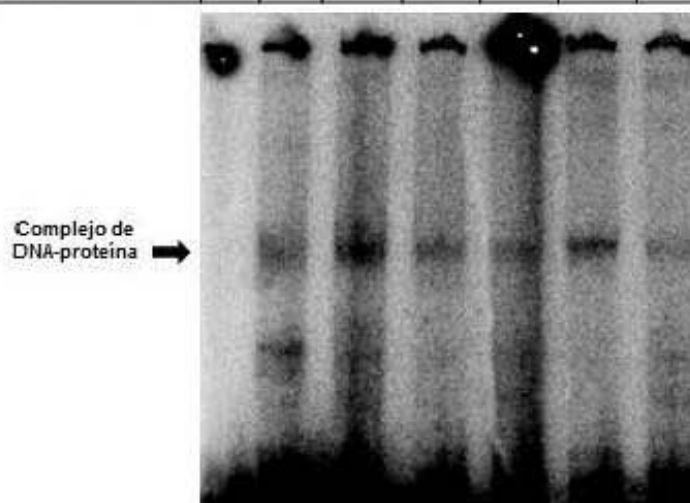


Figura 18 (página anterior). El VDRE ubicado en el promotor de Dicer es reconocido por el VDR y el RXR *in vitro*. Se utilizó el extracto nuclear de células SiHa y sondas de DNA de doble cadena marcadas con ³²P en cada reacción. Como referencia se utilizó la secuencia de un VDRE tipo DR3. La capacidad de formación de complejos de DNA-proteína del Dicer-VDRE fue evaluada y comparada con la de una secuencia mutante, también se utilizaron anticuerpos específicos contra el VDR y el RXR (a). Se realizaron ensayos de competencia para verificar la especificidad de la unión del Dicer-VDRE (b).

9.11 El VDRE en el promotor de Dicer parece ser funcional in vivo.

Para definir la funcionalidad del Dicer-VDRE *in vivo* en las células SiHa realizamos ensayos de ChIP. Aunque observamos un producto único de PCR cuya banda fue más intensa en la condición con calcitriol, el tamaño observado fue algo menor que el esperado de 330 pb (figura 19a). Al repetir todo el experimento utilizando las células C33-A, que no expresan el VDR, no observamos ningún producto de PCR (figura 19b). Estas observaciones aportan información para complementar los resultados obtenidos mediante EMSA y sugieren la funcionalidad *in vivo* del VDRE detectado en Dicer. El DNA de los input se utilizó como control positivo y el de la inmunoprecipitación con anti IgG de ratón como control negativo.

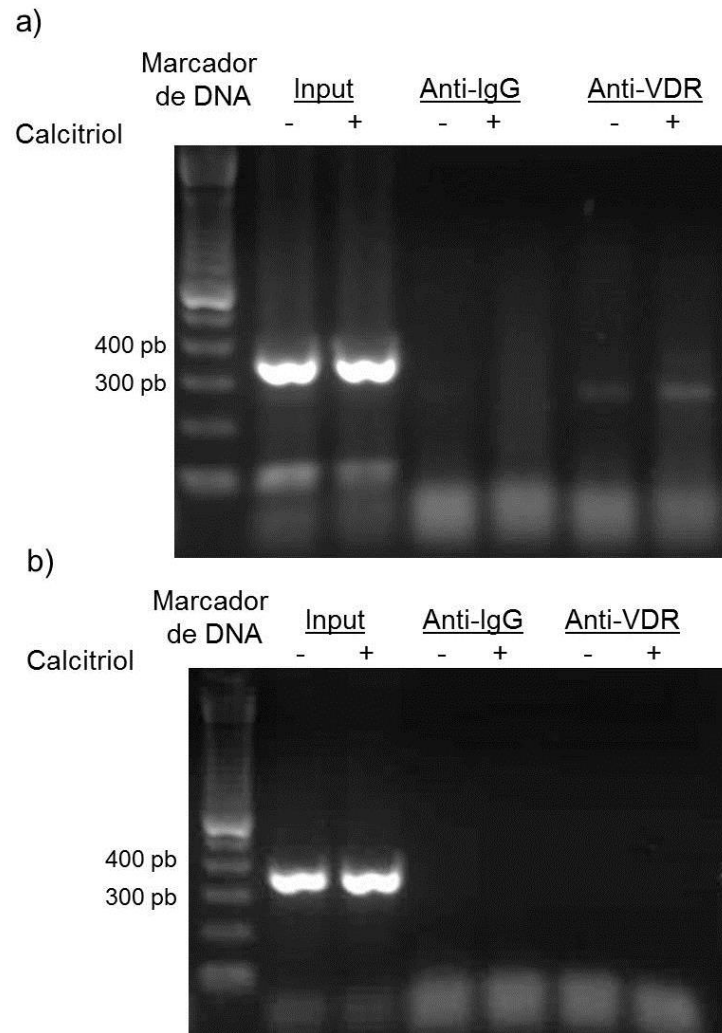


Figura 19. El VDRE en el promotor de Dicer parece ser funcional *in vivo*. La cromatina obtenida de las células SiHa y C33-A fue procesada para inmunoprecipitación con los anticuerpos mencionados (anti VDR o IgG de ratón) y el DNA obtenido fue utilizado para PCR. Se evaluó la obtención del amplicón de 330 pb del Dicer-VDRE-1 tanto en las células SiHa (a) como en las células C33-A (b).

9.12 El calcitriol regula diferencialmente la expresión de microRNAs en las células SiHa.

Para tener una idea sobre el significado biológico de nuestros resultados en las células SiHa, realizamos un perfil de expresión de microRNAs. Comparamos las células tratadas con calcitriol con las células tratadas sólo con el vehículo, utilizando los mismos tiempos de tratamiento donde detectamos la inducción en Dicer (24 y 48 horas). El sistema de microarreglos utilizado nos permitió analizar 1658 precursores de microRNAs (pre-miRNAs) y 1733 microRNAs maduros (miRNAs) del genoma humano y distinguir los cambios en su expresión. En general, observamos una mayor proporción de microRNAs maduros. El análisis reveló que a 24 horas del tratamiento con calcitriol sólo 8 pre-microRNAs aumentaron su expresión mientras que 31 microRNAs aumentaron. A las 48 horas del tratamiento sólo 2 pre-microRNAs aumentaron su expresión mientras que 55 microRNAs lo hicieron. Por otro lado, observamos también que algunos microRNAs disminuyeron su expresión: 16 a 24 horas y 15 a 48 horas del tratamiento con el calcitriol (figura 20). Todos los microRNAs diferencialmente expresados que fueron detectados se muestran en las tablas 3 y 4.

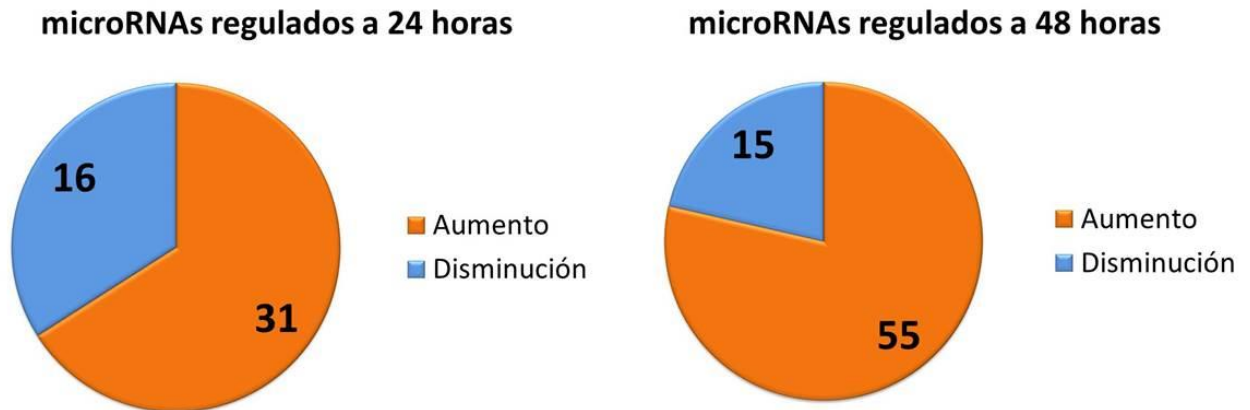


Figura 20. El calcitriol modifica la expresión de microRNAs en las células SiHa. El perfil de expresión de microRNAs fue obtenido con microarreglos Affymetrix GeneChip miRNA Array v3.0 y reveló que a las 24 horas del tratamiento con la hormona hubo un mayor número de microRNAs que aumentaron su expresión, en comparación con aquellos que la disminuyeron (gráfica a la izquierda). De manera similar, a las 48 horas del tratamiento se detectaron más microRNAs con un aumento en su expresión que aquellos con una disminución (gráfica a la derecha). Los patrones de expresión diferencial entre las condiciones experimentales (calcitriol vs vehículo) fueron determinados con el programa Limma. Para definir los microRNAs expresados diferencialmente, se consideró un umbral del valor de $P \leq 0.05$ y un valor de cambio mínimo de 1.4 veces.

En términos generales, observamos una mayor cantidad de microRNAs cuya expresión aumentó, en comparación con aquellos cuya expresión resultó disminuida. De entre los microRNAs que aumentaron su expresión (figura 21), encontramos siete que fueron comunes a ambos tiempos de tratamiento con el calcitriol (24 y 48 horas). Dichos microRNAs comunes fueron: miRNA-22, 296-3p, 29c, 342-5p, 4455, 4462 y 4656 (figura 22).

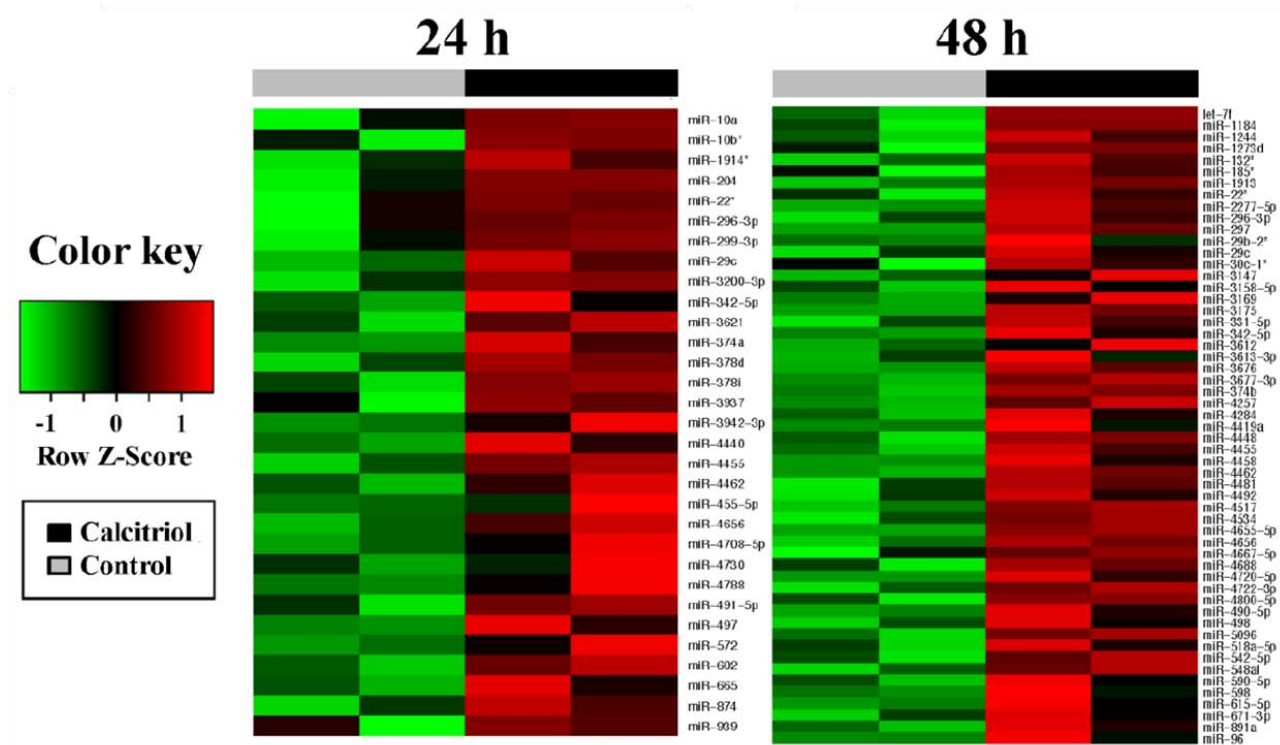


Figura 21. Mapa de calor de los microRNAs inducidos por el calcitriol a 24 y 48 horas del tratamiento en células SiHa. Se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico no-supervisado con los valores normalizados de los microRNAs utilizando el programa ggplots en R y aplicando una escala de Z-score para evitar el dominio de los valores extremos. Los valores normalizados de cada microRNA fueron graficados en filas y las columnas representan dos experimentos independientes (calcitriol y control a 24 y 48 h). Dichos valores, indicados como el Z-score, fueron graficados en una escala de colores verde – rojo, donde el verde indica una expresión menor y el rojo indica una expresión mayor.

miRNA	FC 24 Hrs	FC 48 hrs
miR-22*	2.7	2.5
miR-296-3p	2.5	2.4
miR-297	-1.8	2.4
miR-29c	4.2	2.9
miR-342-5p	1.5	1.9
miR-4455	2.6	2.5
miR-4462	1.6	1.6
miR-4656	2.09	1.5

Figura 22. Grupo de microRNAs cuya expresión aumentó tanto a 24 como a 48 horas del tratamiento con calcitriol en células SiHa. Las barras horizontales rojas indican la magnitud de la inducción (FC, fold change) de cada microRNA. Se menciona adicionalmente el miR-297 ya que fue un caso particular donde hubo un cambio de una baja expresión a una inducción.

Tabla 3. Pre-microRNAs (hp-mir) y microRNAs maduros (miR) expresados diferencialmente en células SiHa después de 24 horas de tratamiento con calcitriol.

microRNAs inducidos	Magnitud del cambio	Valor de P
24 horas		
hp_mir-1254-2_x	1.47	0.0368
hp_mir-1289-2	1.81	0.0015
hp_mir-326	1.49	0.0321
hp_mir-3934	1.64	0.0062
hp_mir-4419a	1.52	0.0262
hp_mir-4634	2.35	0.0072
hp_mir-631	1.73	0.0357
hp_mir-760	1.61	0.0308
miR-10a	3.00	0.0087
miR-10b	1.99	0.0118
miR-1914	1.55	0.0082
miR-204	1.56	0.0417
miR-22	2.76	0.0329
miR-296-3p	2.47	0.0317
miR-299-3p	1.68	0.0366
miR-29c	4.24	0.0026
miR-3200-3p	1.93	0.0057
miR-342-5p	1.54	0.0367
miR-3621	3.16	0.0018
miR-374a	1.63	0.0019
miR-378d	2.94	0.0035
miR-378i	1.68	0.0121
miR-3937	2.36	0.0202
miR-3942-3p	1.60	0.0125
miR-4440	2.92	0.0033
miR-4455	2.64	0.0016
miR-4462	1.63	0.0060
miR-455-5p	2.30	0.0432
miR-4656	2.10	0.0016
miR-4708-5p	2.22	0.0310
miR-4730	1.96	0.0395
miR-4788	2.30	0.0141
miR-491-5p	1.44	0.0061
miR-497	2.32	0.0227
miR-572	1.64	0.0267

miR-602	2.80	0.0428
miR-665	2.74	0.0284
miR-874	2.21	0.0048
miR-939	1.81	0.0355

microRNAs disminuidos	Magnitud del cambio	Valor de P
24 horas		
hp_mir-3153_x	-1.53	0.0282
hp_mir-3180-5_s	-1.45	0.0019
hp_mir-365-1_x	-1.51	0.0015
hp_mir-4647	-1.88	0.0041
hp_mir-548f-2_x	-1.40	0.0019
miR-1249	-1.77	0.0183
miR-125b-1	-1.90	0.0043
miR-1262	-1.60	0.0140
miR-150	-1.96	0.0047
miR-199b-3p	-1.40	0.0121
miR-297	-1.80	0.0146
miR-30b	-2.48	0.0015
miR-3128	-1.78	0.0305
miR-362-3p	-1.44	0.0195
miR-3921	-2.36	0.0318
miR-4276	-1.47	0.0359
miR-606	-1.71	0.0296
miR-663b	-1.85	0.0238
miR-720	-1.66	0.0110
miR-766	-2.21	0.0317
miR-769-3p	-1.63	0.0315

Tabla 4. Pre-microRNAs (hp-mir) y microRNAs maduros (miR) expresados diferencialmente en células SiHa después de 48 horas de tratamiento con calcitriol.

microRNAs inducidos	Magnitud del cambio	Valor de P
	48 horas	
hp_mir-3150a1	1.42	0.0032
hp_mir-4661	2.10	0.0045
let-7f	1.41	0.0070
miR-1184	3.76	0.0026
miR-1244	2.88	0.0020
miR-1273d	1.48	0.0153
miR-132	1.89	0.0032
miR-185	2.26	0.0113
miR-1913	2.06	0.0004
miR-22	2.51	0.0470
miR-2277-5p	2.27	0.0005
miR-296-3p	2.41	0.0351
miR-297	2.39	0.0035
miR-29b-2	2.13	0.0290
miR-29c	2.92	0.0173
miR-30c-1	2.06	0.0191
miR-3147	1.63	0.0358
miR-3158-5p	2.21	0.0267
miR-3169	1.66	0.0088
miR-3175	3.10	0.0015
miR-331-5p	1.54	0.0144
miR-342-5p	1.92	0.0144
miR-3612	1.51	0.0176
miR-3613-3p	1.70	0.0468
miR-3676	1.52	0.0012
miR-3677-3p	1.53	0.0017
miR-374b	3.84	0.0001
miR-4257	2.10	0.0010
miR-4284	2.04	0.0056
miR-4419a	2.19	0.0195
miR-4448	3.88	0.0077
miR-4455	2.50	0.0022
miR-4458	1.99	0.0249
miR-4462	1.60	0.0066
miR-4481	1.62	0.0285

miR-4492	1.86	0.0082
miR-4517	1.81	0.0016
miR-4534	1.45	0.0138
miR-4655-5p	3.27	0.0023
miR-4656	1.53	0.0086
miR-4667-5p	2.05	0.0070
miR-4688	4.12	0.0012
miR-4720-5p	1.82	0.0133
miR-4722-3p	2.12	0.0016
miR-4800-5p	1.94	0.0150
miR-490-5p	1.42	0.0080
miR-498	1.74	0.0194
miR-5096	3.44	0.0051
miR-518a-5p	1.61	0.0162
miR-542-5p	1.94	0.0055
miR-548a1	1.54	0.0041
miR-590-5p	1.79	0.0305
miR-598	1.96	0.0165
miR-615-5p	1.71	0.0249
miR-671-3p	2.21	0.0153
miR-891a	1.56	0.0123
miR-96	1.70	0.0410

microRNAs disminuidos	Magnitud del cambio	Valor de P
	48 horas	
hp_mir-31271	-1.46	0.0873
hp_mir-47631	-1.46	0.1295
hp_mir-548q_x1	-1.94	0.0511
let-7f-1	-1.48	0.2148
miR-1292	-1.44	0.2064
miR-181c	-1.77	0.3300
miR-2277-3p	-1.74	0.1213
miR-3162-3p	-1.48	0.2083
miR-3201	-1.72	0.1168
miR-3605-5p	-1.67	0.0751
miR-3613-5p	-1.53	0.6791
miR-3648	-2.44	0.0597
miR-3917	-1.45	0.1529
miR-3921	-1.80	0.0817

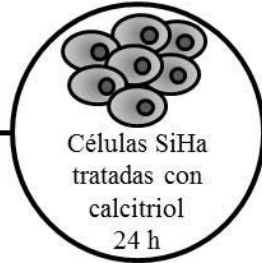
miR-4418	-1.76	0.0609
miR-4423-3p	-1.70	0.0625
miR-4442	-1.42	0.0885
miR-548a	-1.44	0.0649
miR-551b	-1.98	0.1409

9.13 Los RNAs mensajeros blanco de los microRNAs que aumentaron su expresión están potencialmente relacionados con el cáncer.

Para conocer los posibles RNAs mensajeros blanco de los microRNAs que cambiaron su expresión ante el tratamiento con calcitriol, realizamos un análisis computacional con la base de datos miRWalk, que utiliza 10 algoritmos. Se consideraron solamente los RNAs mensajeros blanco predichos con al menos 7 diferentes algoritmos para continuar con un análisis de enriquecimiento de vías celulares, mediante la base de datos DAVID, y así tener idea de los posibles procesos biológicos involucrados. Los resultados del análisis destacaron vías relacionadas con regulación transcripcional y postranscripcional, movilidad celular, modificación de la cromatina, entre otras (figura 23). De manera interesante, varias vías enriquecidas están involucradas con el desarrollo del cáncer. En particular, encontramos que los microRNAs -22, -498 y -296-3p fueron algunos de los inducidos por el calcitriol en las células SiHa y de los cuales se tiene ya descrito que son anticancerígenos en otros tipos celulares. Por otro lado, procesos como la señalización celular, la muerte celular programada y el transporte intracelular fueron predichos para ser afectados por los microRNAs cuya expresión fue disminuida por el calcitriol (figura 23).

Vías celulares posiblemente afectadas por los microRNAs con aumento en su expresión

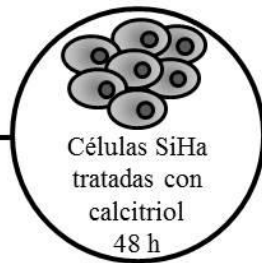
Regulación de la transcripción
Modificación de la cromatina
Respuesta a estímulos hormonales
Regulación de la motilidad y la migración celular



Vías celulares posiblemente afectadas por los microRNAs con disminución en su expresión

Regulación de la fosforilación
Señalización inter-celular
Regulación del transporte de glucosa

Vías de señalización asociadas al cáncer
Regulación de la fosforilación
Regulación de la apoptosis
Regulación de la motilidad y la migración celular
Adhesión celular



Muerte celular programada
Respuesta a hormonas esteroideas
Transporte intracelular

Figura 23. Vías celulares potencialmente afectadas por los microRNAs expresados diferencialmente en las células SiHa tratadas con calcitriol durante 24 o 48 horas. El análisis de vías celulares fue realizado con la base de datos DAVID, considerando los RNAs mensajeros blanco predichos para los microRNAs cuya expresión aumentó o disminuyó. Sólo se consideraron los RNAs mensajeros predichos por, al menos, 7 algoritmos de la base de datos miRWalk.

10. Discusión.

Al comenzar a desarrollar el presente trabajo experimental, encontramos que la información disponible sobre la regulación hormonal de la biogénesis de los microRNAs era sumamente limitada; de hecho, como tema de estudio sigue siendo algo reciente. Partiendo de la cuestión anterior, decidimos evaluar la expresión génica de Drosha, DGCR8, DDX5, DDX17, Exportina 5, Dicer y Argonauta 2, considerados como los principales componentes de la maquinaria de biogénesis de los microRNAs, ante diferentes tiempos de tratamiento con el calcitriol. Utilizamos principalmente a la línea celular SiHa de cáncer cervical humano porque que expresa el VDR y es susceptible a la acción del calcitriol (Avila et al., 2010).

Se ha descrito que algunos de los genes blanco del calcitriol y el VDR aumentan su expresión ante tiempos de tratamiento cortos, de 2 a 6 horas, mientras que otros genes blanco aumentan su expresión ante tiempos de tratamiento largos, de 24 a 72 horas (Carlberg, 2011). Lo anterior nos sirvió como un criterio para dirigir nuestros experimentos. Los resultados obtenidos mediante la técnica de RT-qPCR mostraron que, de los siete genes evaluados, únicamente la expresión génica de DDX5, DICER y DGCR8 fue inducida ante el tratamiento con el calcitriol. En particular, detectamos que la expresión génica de DDX5 aumentó a las 3 horas del tratamiento mientras que la expresión de Dicer y DGCR8 aumentó a las 24 horas y a las 48 horas. Estos resultados indicaron que el calcitriol puede aumentar la expresión génica de algunos componentes de la maquinaria de biogénesis de los microRNAs y que podría ser un regulador hormonal de dicho proceso. Se ha propuesto que los blancos primarios del calcitriol unido al VDR, requieren de tiempos cortos de estimulación para ser inducidos a nivel de la transcripción. Dentro de la categoría de los blancos primarios se tienen ejemplos bien caracterizados, a saber: la

osteocalcina y la osteopontina son proteínas que participan en el transporte del calcio y en la formación de los huesos, acciones fundamentales del calcitriol consideradas como clásicas. Por otro lado, p21 que es un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas, contiene VDREs en el promotor de su gen y el incremento en su expresión, debida al calcitriol, inhibe la proliferación al inducir el arresto en la fase G0/G1 del ciclo celular (Carlberg y Seuter, 2009). Con base en nuestros datos de RT-qPCR, de los ensayos de transfección con el gen reportero de luciferasa, de EMSA y de ChIP, consideramos que el gen DDX5 podría ser considerado como un blanco primario del VDR, ya que el incremento en su expresión fue detectado a las 3 horas después del tratamiento con el calcitriol.

De manera interesante, y como una observación complementaria, nuestros resultados obtenidos ante el tratamiento con el ácido 9-cis-retinoico también mostraron un aumento en la expresión de DDX5. Lo anterior ha sido descrito para el caso de CYP24A1, uno de los blancos primarios clásicos del calcitriol (Zou et al., 1997). De hecho, se determinó que en ese gen los VDREs ubicados en el promotor, funcionan también como elementos de respuesta al ácido 9-cis-retinoico, aunque la magnitud de la inducción es claramente menor. Además, se ha reportado que otros genes blanco del calcitriol han resultado susceptibles de regulación por los retinoides, como es el caso de la osteopontina y de la osteocalcina. Particularmente, se observó que los niveles del RNA mensajero de la osteopontina eran incrementados con 4 horas de tratamiento con retinoides (Zou et al., 1997). Por lo ya mencionado, ha surgido la idea de que los ligandos del RXR podrían regular a algunos de los genes que son blancos de la vitamina D.

La helicasa DDX5 está implicada en la regulación de la transcripción debido a sus interacciones con varios componentes de dicha maquinaria celular: la RNA polimerasa II, CBP/p300 y HDAC1 (Fuller-Pace y Moore, 2011) y adicionalmente funciona como un

coactivador de varios receptores nucleares (como el receptor de estrógenos α y el receptor de andrógenos) incluyendo el VDR. Por lo anterior, es posible que el tratamiento con calcitriol tuviera un efecto inductivo sobre la expresión de DDX5 para favorecer tanto la actividad transcripcional de la célula como los eventos postranscripcionales, en donde la biogénesis de los microRNAs tiene un papel importante, tomando en cuenta que DDX5 es una helicasa de RNA que participa en ambos procesos celulares (Wagner et al., 2012). Existe un reporte sobre la regulación de la expresión de DDX5 en la línea celular HaCaT donde se demuestra que la expresión de DDX5 es incrementada ante el tratamiento con óxido nítrico, factores de crecimiento y citocinas proinflamatorias y se propone que ese fenómeno es importante para la proliferación de los queratinocitos durante la reparación de la piel (Kahlina et al., 2004). Algo por destacar de ese estudio está en que los tiempos de inducción en la expresión del RNA mensajero de DDX5 están entre 2 y 5 horas, es decir, son tiempos de tratamiento cortos. Aunque los mecanismos celulares que incrementan la expresión de DDX5 son diferentes entre los factores utilizados en ese estudio y el calcitriol, es interesante notar que la actividad de dicha helicasa de RNA es requerida rápidamente por la célula, independientemente del estímulo externo, lo cual hablaría de la importante función de DDX5 en la fisiología de las células. Ahora bien, la propuesta de que DDX5 fuera regulada por una hormona como el calcitriol es interesante si consideramos que, hasta ahora, existe solamente un caso reportado en donde se describe la regulación hormonal de una helicasa de RNA. La proteína GRTH (también conocida como DDX25) es un miembro de la familia DEAD box de helicasas de RNA que se expresa casi exclusivamente en los testículos, donde actúa como un regulador multifuncional que es esencial para la espermatogénesis. En células de Leydig se ha

demostrado que su expresión es incrementada por la gonadotropina coriónica humana (Tsai-Morris et al., 2010).

Los otros dos genes que identificamos como inducibles por el calcitriol: Dicer y DGCR8, cuyo incremento en la expresión fue observado a las 24 horas y 48 horas, nos sugiere que podrían ser blancos de respuesta tardía al calcitriol. Se ha propuesto que ese tipo de genes también contribuyen a los efectos fisiológicos del calcitriol pero su inducción requiere de varias horas, o incluso días, y puede implicar la participación de otras proteínas coreguladoras (Carlberg y Seuter, 2009). Sin embargo, existen ejemplos de genes de respuesta tardía donde se identificaron VDREs en su región promotora y que son responsables del aumento en la expresión con el calcitriol, tal es el caso del gen de la nefrina, un importante componente estructural producido en los podocitos (Deb et al., 2011). Cabe destacar que tanto DGCR8 como Dicer han sido descritos como genes que respondieron ante el tratamiento con estradiol y progesterona, respectivamente, en el útero de ratón (Nothnick et al., 2010). De manera interesante, la magnitud del aumento reportado fue similar a la que nosotros observamos en nuestros experimentos con calcitriol, a pesar de que esos investigadores utilizaron ratones y nosotros líneas celulares, lo cual apoya el significado biológico de nuestros datos. En el presente trabajo, no profundizamos en el estudio de la regulación de DGCR8 por limitaciones tanto de información (falta de una región promotora precisa) como experimentales (falta de un anticuerpo adecuado); sin embargo, consideramos que el aumento en la expresión del RNA mensajero aporta un indicio interesante que hay que considerar.

Ya que el aumento en la expresión de DDX5, DGCR8 y Dicer podría tener un impacto en la biogénesis de los microRNAs, decidimos profundizar en su efecto biológico sobre las células SiHa. En particular, considerando la importancia de Dicer en la vía de biogénesis y

los resultados obtenidos de nuestros experimentos, nos enfocamos en explorar su efecto sobre la expresión de los microRNAs. El análisis del perfil de expresión de microRNAs reveló una mayor proporción de microRNAs maduros que de precursores y también que hubo un mayor número de microRNAs que aumentaron su expresión que aquellos que la disminuyeron, lo cual coincide con observaciones reportadas en otros tipos de células tumorales (Giangreco y Nonn, 2013). Aunque el mecanismo clásico de inducción de la expresión génica utilizado por el calcitriol (mediante el VDR y los VDREs) ha sido descrito en microRNAs (Peng et al., 2010; Guan et al., 2013) y ayudaría a explicar la inducción que detectamos en diversos microRNAs en nuestro estudio, no se puede descartar la participación de otros procesos celulares. Una explicación complementaria implicaría que el calcitriol favoreciera el procesamiento de los microRNAs, pero dicho panorama no había sido reportado. Nuestros resultados sugieren una probable relación con la inducción de Dicer, que es una enzima clave en la biogénesis de los microRNAs. Si bien el aumento en la expresión de Dicer fue pequeño, la cantidad de proteína fue proporcional a la cantidad del RNA mensajero, haciendo el aumento plausible. Es importante destacar que lo anterior fue observado en la expresión de Dicer pero no en la de Drosha, la otra enzima importante del proceso de biogénesis, lo cual indicó un efecto gen-específico. Adicionalmente, la expresión de Dicer no tuvo cambios en las células C33-A (carentes del VDR) aun cuando se utilizó la misma concentración de calcitriol (1 μ M). En conjunto, estos resultados indican que el gen de Dicer, expresado en las células SiHa de cáncer cervical humano, es un componente de la maquinaria de biogénesis de microRNAs inducido por el calcitriol, de manera dependiente del VDR.

Es conveniente aclarar, con respecto al hecho de que tanto el RNA mensajero como la proteína de DDX5 y de Dicer aumentaron ante el tratamiento con calcitriol, que aunque es probable una mayor biodisponibilidad de dichas enzimas, favoreciendo los procesos en donde participan, no es algo demostrado por nuestras observaciones. Sería interesante diseñar y realizar experimentos adicionales que demuestren la funcionalidad de ambas enzimas de la biogénesis de microRNAs, asociada al aumento en su expresión. Por otro lado, considerando el grupo de microRNAs que detectamos disminuidos en su expresión, la existencia de VDREs negativos en sus promotores podría estar asociada con dicho efecto, ya que el calcitriol unido al VDR también puede reprimir la transcripción de genes, pero hasta ahora no hay ejemplos descritos con microRNAs. En dicho caso, el aumento detectado en la expresión de DDX5 y de Dicer no favorecería el procesamiento de esos microRNAs.

En otro aspecto de nuestro estudio, dado que el calcitriol tiene efectos antiproliferativos en las células SiHa, nuestras observaciones podrían estar relacionadas con tales efectos. De hecho, algunos de los microRNAs inducidos que detectamos, están relacionados con la acción anticancerígena del calcitriol. Por ejemplo: el miR-22 y el miR-498 son inducibles por el calcitriol y tienen acciones anticancerígenas demostradas. El miR-22 inhibe la migración celular y la proliferación en células de cáncer de colon (Alvarez-Díaz et al., 2012). El miR-498 reprime la expresión de la telomerasa en células de cáncer de ovario, de cáncer de mama y de cáncer de endometrio (Kasiappan et al., 2012). El hecho de que también los hayamos detectado en células de cáncer cervical sugiere que existe un grupo conservado de microRNAs, blancos del calcitriol, con efectos anticancerígenos, lo cual enriquece el conocimiento biológico sobre esta hormona como un agente para prevenir el desarrollo de los tumores.

Por otro lado, diversos estudios describen que en varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer cervical, ocurre una disminución en la expresión de Dicer que favorece el desarrollo tumoral (Pellegrino et al., 2013; Zhao et al., 2014; He et al., 2014). En contraste, nuestros hallazgos representan el primer reporte sobre el calcitriol como una hormona que induce la expresión de Dicer en el cáncer cervical y por ello pueden ser de interés biomédico, en el contexto de la biología del cáncer. Cabe mencionar que la concentración de calcitriol utilizada en nuestros estudios (1 μ M) es inalcanzable fisiológicamente y que en un contexto terapéutico sería muy riesgosa para considerarla; no obstante, ha sido utilizada en varios trabajos donde se han descrito hallazgos interesantes (Agarwal et al., 1999; Riboldi et al., 2005; Halder et al., 2013; Haddur et al., 2015) y donde también se puede concluir que algunos tipos celulares requieren de una concentración alta de calcitriol para mostrar una respuesta máxima y clara, teniendo un significado biológico. Al parecer, la capacidad de respuesta a los estímulos difiere de unas células a otras en función de sus patrones de regulación génica y de las redes de interacción entre los genes. Finalmente, nuestros resultados de ciencia básica aportan evidencia para seguir explorando la regulación de Dicer por el calcitriol en otros tipos celulares de cáncer, o incluso en modelos animales (ratones, por ejemplo). Consideramos que sería interesante estudiar este efecto regulador del calcitriol en otros modelos biológicos porque la dosis requerida podría ser menor (tal vez alcanzable fisiológicamente) a la que utilizamos con las líneas celulares de cáncer cervical.

11. Conclusiones.

1. La expresión de DDX5, DGCR8 y Dicer es inducible por el calcitriol a una concentración alta (1 μ M) en células SiHa de cáncer cervical.
2. El aumento en la expresión de DDX5 y de Dicer involucra el mecanismo clásico de los efectos genómicos del calcitriol, implicando la interacción del VDR con un VDRE.
3. El calcitriol modula la expresión diferencial de microRNAs en células SiHa de cáncer cervical.
4. La proporción de microRNAs inducidos por el calcitriol es mayor que la de aquellos disminuidos, lo cual coincide con observaciones en otros tipos celulares de cáncer.
5. El aumento en la expresión de microRNAs podría ser favorecido por el aumento observado en la expresión de DDX5, DGCR8 y Dicer.
6. El significado biológico de los efectos observados estaría relacionado con la actividad antiproliferativa del calcitriol en las células SiHa.

12. Perspectivas.

- Diseñar y realizar experimentos que evalúen la actividad de ribonucleasa de Dicer y la actividad de helicasa de RNA de DDX5, en relación al aumento en su expresión debida al calcitriol.
- Estudiar el efecto de la combinación del calcitriol con el ácido 9-cis-retinoico sobre la expresión de DDX5 y Dicer.
- Estudiar el efecto del calcitriol sobre la expresión de Dicer y DDX5 en otro modelo biológico (cultivo primario o ratones) para comparar y contrastar los resultados obtenidos en este proyecto.
- Validar mediante qPCR el cambio en la expresión de algunos microRNAs identificados con el microarreglo e identificar experimentalmente los RNAs mensajeros blanco.
- Determinar el perfil de expresión de microRNAs en células C33-A, que carecen del VDR, para compararlo con el de las células SiHa, ante el tratamiento con calcitriol, e identificar los microRNAs expresados diferencialmente.

13. Bibliografía.

Agarwal C, Lambert A, Chandraratna RA, Rorke EA, Eckert RL. 1999. Vitamin D regulates human ectocervical epithelial cell proliferation and insulin-like growth factor-binding protein-3 level. **Biol Reprod.** 60: 567-572.

Alvarez-Diaz S, Valle N, Ferrer-Mayorga G, Lombardia L, Herrera M, Dominguez O, Segura MF, Bonilla F, Hernando E, Muñoz A. 2012. MicroRNA-22 is induced by vitamin D and contributes to its antiproliferative, antimigratory and gene regulatory effects in colon cancer cells. **Hum Mol Genet.** 21(10): 2157-2165.

Avila E, Garcia-Becerra R, Rodriguez-Rasgado JA, Diaz L, Ordaz-Rosado D, Zugel U, Steinmeyer A, Barrera D, Halhali A, Larrea F, Camacho J. 2010. Calcitriol down-regulates human ether a go-go 1 potassium channel expression in cervical cancer cells. **Anticancer Res.** 30(7): 2667-2672.

Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell.** 116: 281–297.

Bartel DP. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell.** 136: 215-233.

Bates GJ, Nicol SM, Wilson BJ, Jacobs AM, Bourdon JC, Wardrop J, Gregory DJ, Lane DP, Perkins ND, Fuller-Pace FV. 2005. The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor. **EMBO J.** 24(3): 543-553.

Bhat-Nakshatri P, Wang G, Collins NR, Thomson MJ, Geistlinger TR, Carroll JS, Brown M, Hammond S, Srour EF, Liu Y, Nakshatri H. 2009. Estradiol-regulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. **Nucleic Acids Res.** 37(14): 4850-4861.

Carlberg C, Campbell MJ. 2013. Vitamin D receptor signaling mechanisms: integrated actions of a well-defined transcription factor. **Steroids.** 78(2): 127-136.

Carlberg C, Seuter S. 2009. A genomic perspective on vitamin D signaling. **Anticancer Res.** 29: 3485-3494.

Carlberg C. 2011. Target genes of vitamin D: spatio-temporal interaction of chromatin, VDR, and response elements. En D. Feldman, J.W. Pike, J.S. Adams (Eds.), **Vitamin D, Third Edition** (pp. 211-226). U.S.A.: Elsevier.

Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T. 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. **Bioinformatics**. 21: 2933-2942.

Carthew RW, Sontheimer EJ. 2009. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**. 136: 642–655.

Cázares-Ordoñez V, González-Duarte RJ, Diaz L, Ishizawa M, Uno S, Ortiz V, Ordoñez-Sánchez ML, Makishima M, Larrea F, Avila E. 2015. A cis-acting element in the promoter of human ether à go-go 1 potassium channel gene mediates repression by calcitriol in human cervical cancer cells. **Biochem Cell Biol**. 93(1): 94-101.

Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**. 162(1): 156-159.

Clark EL, Coulson A, Dalglish C, Rajan P, Nicol SM, Fleming S, Heer R, Gaughan L, Leung HY, Elliott DJ, Fuller-Pace FV, Robson CN. 2008. The RNA helicase p68 is a novel androgen receptor coactivator involved in splicing and is overexpressed in prostate cancer. **Cancer Res**. 68(19): 7938-7946.

De Santa F, Iosue I, Del Rio A, Fazi F. 2013. microRNA biogenesis pathway as a therapeutic target for human disease and cancer. **Curr Pharm Des**. 19(4): 745-764.

Deb DK, Wang Y, Zhang Z, Nie H, Huang X, Yuan Z, Chen Y, Zhao Q, Li YC. Molecular mechanism underlying 1,25-dihydroxyvitamin D regulation of nephrin gene expression. **J Biol Chem**. 286(37): 32011-32017.

Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. 2007. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. **Nat Rev Cancer**. 7: 684-700.

Díaz-García CV, Agudo-López A, Pérez C, López-Martín JA, Rodríguez-Peralto JL, de Castro J, Cortijo A, Martínez-Villanueva M, Iglesias L, García-Carbonero R, Fresno Vara JA, Gámez-Pozo A, Palacios J, Cortés-Funes H, Paz-Ares L, Agulló-Ortuño MT. 2013. DICER1, DROSHA and miRNAs in patients with non-small cell lung cancer: implications for outcomes and histologic classification. **Carcinogenesis**. 34(5): 1031-1038.

Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. 2011. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. **J Biomed Inform**. 44(5): 839-847.

Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. 2014. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. **Nat Rev Cancer**. 14(5): 342-357.

Finnegan EF, Pasquinelli AE. 2013. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. **Crit Rev Biochem Mol Biol**. 48: 51-68.

Fletcher CE, Dart DA, Bevan CL. 2014. Interplay between steroid signalling and microRNAs: implications for hormone-dependent cancers. **Endocr Relat Cancer**. 21(5): R409-429.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Res**. 19(1): 92-105.

Fuller-Pace F, Moore H. 2011. RNA helicases p68 and p72: multifunctional proteins with important implications for cancer development. **Future Oncol**. 7: 239-251.

Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, Holick MF. 2006. The role of vitamin D in cancer prevention. **Am J Public Health**. 96: 252-261.

Giangreco AA, Nonn L. 2013. The sum of many small changes: microRNAs are specifically and potentially globally altered by vitamin D₃ metabolites. **J Steroid Biochem Mol Biol**. 136: 86-93.

Gocek E, Wang X, Liu X, Liu CG, Studzinski GP. 2011. MicroRNA-32 upregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human myeloid leukemia cells leads to Bim targeting and inhibition of AraC-induced apoptosis. **Cancer Res**. 71(19): 6230-6239.

González-Duarte RJ, Cázares-Ordoñez V, Avila E. 2014. The microRNA biogenesis machinery: regulation by steroid hormones and alterations in cancer. **Rev Invest Clin.** 66(5): 460-464.

Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. **Nature.** 432: 235-240.

Guan H, Liu C, Chen Z, Wang L, Li C, Zhao J, Yu Y, Zhang P, Chen W, Jiang A. 2013. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ up-regulates expression of hsa-let-7a-2 through the interaction of VDR/VDRE in human lung cancer A549 cells. **Gene.** 522(2): 142-146.

Guo X, Liao Q, Chen P, Li X, Xiong W, Ma J, Li X, Luo Z, Tang H, Deng M, Zheng Y, Wang R, Zhang W, Li G. 2012. The microRNA-processing enzymes: Drosha and Dicer can predict prognosis of nasopharyngeal carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol.** 138(1): 49-56.

Haddur E, Ozkaya AB, Ak H, Aydin HH. 2015. The effect of calcitriol on endoplasmic reticulum stress response. **Biochem Cell Biol.** 93(3): 268-271.

Halder SK, Osteen KG, Al-Hendy A. 2013. Vitamin D₃ inhibits expression and activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human uterine fibroid cells. **Hum Reprod.** 1:1-10.

Havens MA, Reich AA, Duelli DM, Hastings ML. 2012. Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. **Nucleic Acids Res.** 40(10): 4626-4640.

He L, Wang HY, Zhang L, Huang L, Li JD, Xiong Y, Zhang MY, Jia WH, Yun JP, Luo RZ, Zheng M. 2014. Prognostic significance of low DICER expression regulated by miR-130a in cervical cancer. **Cell Death Dis.** 1(5): e1205.

Holick MF. 1996. Vitamin D and bone health. **J Nutr.** 126: 1159S–1164S.

Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nat Protoc.** 4(1): 44-57.

Jansson MD, Lund AH. 2012. MicroRNA and cancer. **Mol Oncol.** 6(6): 590-610.

Kahlina K, Goren I, Pfeilschifter J, Frank S. 2004. p68 DEAD box RNA helicase expression in keratinocytes. Regulation, nucleolar localization, and functional connection to proliferation and vascular endothelial growth factor gene expression. **J Biol Chem.** 279: 44872-44882.

Kallay E, Pietschmann P, Toyokuni S, Bajna E, Hahn P, Mazzucco K, Bieglmayer C, Kato S, Cross HS. 2001. Characterization of a vitamin D receptor knockout mouse as a model of colorectal hyperproliferation and DNA damage. **Carcinogenesis.** 22(9):1429-1435.

Kasiappan R, Shen Z, Tse AK, Jinwal U, Tang J, Lungchukiet P, Sun Y, Kruk P, Nicosia SV, Zhang X, Bai W. 2012. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ suppresses telomerase expression and human cancer growth through microRNA-498. **J Biol Chem.** 287(49): 41297-41309.

Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. 2002. The human genome browser at UCSC. **Genome Res.** 12(6): 996-1006.

Kim MS, Oh JE, Kim YR, Park SW, Kang MR, Kim SS, Ahn CH, Yoo NJ, Lee SH. 2010. Somatic mutations and losses of expression of microRNA regulation-related genes AGO2 and TNRC6A in gastric and colorectal cancers. **J Pathol.** 221(2): 139-146.

Kitagawa N, Ojima H, Shirakihara T, Shimizu H, Kokubu A, Urushidate T, Totoki Y, Kosuge T, Miyagawa S, Shibata T. 2013. Downregulation of the microRNA biogenesis components and its association with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **Cancer Sci.** 104(5): 543-551.

Klinge C. 2012. miRNAs and estrogen action. **Trends Endocrinol Metab.** 23: 223-233.

Kloss M, Fischer D, Thill M, Friedrich M, Cordes T, Salehin D, Diedrich K, Koster F. 2010. Vitamin D, calcidiol and calcitriol regulate vitamin D metabolizing enzymes in cervical and ovarian cancer cells. **Anticancer Res.** 30(11): 4429-4434.

Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. 2007. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. **Nat Genet.** 39(5): 673-677.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell.** 75: 843-854.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature**. 435(7043): 834-838.

Lüscher B, Mitchell PJ, Williams T, Tjian R. 1989. Regulation of transcription factor AP-2 by the morphogen retinoic acid and by second messengers. **Genes Dev**. 3: 1507-1517.

Martello G, Rosato A, Ferrari F, Manfrin A, Cordenonsi M, Dupont S, Enzo E, Guzzardo V, Rondina M, Spruce T, Parenti AR, Daidone MG, Bicciato S, Piccolo S. 2010. A microRNA targeting Dicer for metastasis control. **Cell**. 141(7): 1195-1207.

Merritt WM, Lin YG, Han LY, Kamat AA, Spannuth WA, Schmandt R, Urbauer D, Pennacchio LA, Cheng JF, Nick AM, Deavers MT, Mourad-Zeidan A, Wang H, Mueller P, Lenburg ME, Gray JW, Mok S, Birrer MJ, Lopez-Berestein G, Coleman RL, Bar-Eli M, Sood AK. 2008. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. **N Engl J Med**. 359(25): 2641-2650.

Nothnick WB, Healy C, Hong X. 2010. Steroidal regulation of uterine miRNAs is associated with modulation of the miRNA biogenesis components Exportin-5 and Dicer1. **Endocrine**. 37: 265-273.

Nothnick WB. 2008. Regulation of uterine matrix metalloproteinase-9 and the role of microRNAs. **Semin Reprod Med**. 26(6): 494-499.

Paris O, Ferraro L, Grober OM, Ravo M, De Filippo MR, Giurato G, Nassa G, Tarallo R, Cantarella C, Rizzo F, Di Benedetto A, Mottolese M, Benes V, Ambrosino C, Nola E, Weisz A. 2012. Direct regulation of microRNA biogenesis and expression by estrogen receptor beta in hormone-responsive breast cancer. **Oncogene**. 31(38): 4196-4206.

Pellegrino L, Jacob J, Roca-Alonso L, Krell J, Castellano L, Frampton AE. 2013. Altered expression of the miRNA processing endoribonuclease Dicer has prognostic significance in human cancers. **Expert Rev Anticancer Ther**. 13(1): 21-27.

Peng X, Vaishnav A, Murillo G, Alimirah F, Torres KE, Mehta RG. 2010. Protection against cellular stress by 25-hydroxyvitamin D₃ in breast epithelial cells. **J Cell Biochem.** 110(6): 1324-1333.

Pereira F, Larriba MJ, Muñoz A. 2012. Vitamin D and colon cancer. **Endocr Relat Cancer.** 19(3): R51-71.

Peterson SM, Thompson JA, Ufkin ML, Sathyanarayana P, Liaw L, Bates-Congdon C. 2014. Common features of microRNA target prediction tools. **Front Genet.** 5: 1-10.

Portales-Casamar E, Thongjuea S, Kwon AT, Arenillas D, Zhao X, Valen E, Yusuf D, Lenhard B, Wasserman WW, Sandelin A. 2010. JASPAR 2010: the greatly expanded open-access database of transcription factor binding profiles. **Nucleic Acids Res.** 38(Database issue): D105-110.

Qi X, Pramanik R, Wang J, Schultz RM, Maitra RK, Han J, DeLuca HF, Chen G. 2002. The p38 and JNK pathways cooperate to trans-activate vitamin D receptor via c-Jun/AP-1 and sensitize human breast cancer cells to vitamin D(3)-induced growth inhibition. **J Biol Chem.** 277(29): 25884-25892.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature.** 403: 901-906.

Riboldi E, Musso T, Moroni E, Urbinati C, Bernasconi S, Rusnati M, Adorini L, Presta M, Sozzani S. 2005. Cutting Edge: Proangiogenic Properties of Alternatively Activated Dendritic Cells. **J Immunol.** 175: 2788-2792.

Rössler OG, Hloch P, Schütz N, Weitzenegger T, Stahl H. 2000. Structure and expression of the human p68 RNA helicase gene. **Nucleic Acids Res.** 28: 932-939.

Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. 2007. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. **Nature.** 448: 83-86.

Sandelin A, Wasserman WW, Lenhard B. 2004. ConSite: web-based prediction of regulatory elements using cross-species comparison. **Nucleic Acids Res.** 32(Web Server issue): W249-252.

Sayed D, Abdellatif M. 2011. MicroRNAs in development and disease. **Physiol Rev.** 91: 827-887.

Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM. 2006. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. **Genes Dev.** 20(16): 2202-2207.

Trump DL, Deeb KK, Johnson CS. 2010. Vitamin D: considerations in the continued development as an agent for cancer prevention and therapy. **Cancer J.** 16(1): 1-9.

Tsai-Morris CH, Sheng Y, Gutti RK, Tang PZ, Dufau ML. 2010. Gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25): a multifunctional protein essential for spermatogenesis. **J Androl.** 31(1): 45-52.

van Kouwenhove M, Kedde M, Agami R. 2011. MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer. **Nat Rev Cancer.** 11(9): 644-656.

Wagner M, Rid R, Maier CJ, Maier RH, Laimer M, Hintner H, Bauer JW, Onder K. 2012. DDX5 is a multifunctional co-activator of steroid hormone receptors. **Mol Cell Endocrinol.** 361(1-2): 80-91.

Wang WL, Chatterjee N, Chittur SV, Welsh J, Tenniswood MP. 2011. Effects of $1\alpha,25$ dihydroxyvitamin D₃ and testosterone on miRNA and mRNA expression in LNCaP cells. **Mol Cancer.** 10: 58.

Warner DR, Bhattacharjee V, Yin X, Singh S, Mukhopadhyay P, Pisano MM, Greene RM. 2004. Functional interaction between Smad, CREB binding protein, and p68 RNA helicase. **Biochem Biophys Res Commun.** 324(1): 70-76.

Xie M, Steitz JA. 2014. Versatile microRNA biogenesis in animals and their viruses. **RNA Biol.** 11(6): 1-9.

Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR, Yao G, Medina A, O'brien-Jenkins A, Katsaros D, Hatzigeorgiou A, Gimotty PA, Weber BL, Coukos G. 2006. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. **Proc Natl Acad Sci USA**. 103(24): 9136-9141.

Zhao H, Jin X, Su H, Deng X, Fang Y, Shen L, Xie C. 2014. Down-regulation of Dicer expression in cervical cancer tissues. **Med Oncol**. 31(5): 937.

Zou A, Elgort MG, Allegretto EA. 1997. Retinoid X receptor (RXR) ligands activate the human 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase promoter via RXR heterodimer binding to two vitamin D-responsive elements and elicit additive effects with 1,25-dihydroxyvitamin D₃. **J Biol Chem**. 272: 19027-19034.

14. Apéndice.

14.1 Artículo publicado con resultados de la tesis para obtención del grado.

14.2 Artículo publicado de revisión breve.

14.3 Artículo publicado de divulgación científica.

14.4 Manuscrito aceptado para publicación con resultados de la tesis.

Calcitriol increases Dicer expression and modifies the microRNAs signature in SiHa cervical cancer cells

Ramiro José González-Duarte, Verna Cázares-Ordoñez, Sandra Romero-Córdoba, Lorenza Díaz, Víctor Ortiz, Julio Augusto Freyre-González, Alfredo Hidalgo-Miranda, Fernando Larrea, and Euclides Avila

Abstract: MicroRNAs play important roles in cancer biology. Calcitriol, the hormonal form of vitamin D₃, regulates microRNAs expression in tumor cells. In the present study we asked if calcitriol would modify some of the components of the microRNA processing machinery, namely, Drosha and Dicer, in calcitriol-responsive cervical cancer cells. We found that calcitriol treatment did not affect Drosha mRNA; however, it significantly increased Dicer mRNA and protein expression in VDR-positive SiHa and HeLa cells. In VDR-negative C33-A cells, calcitriol had no effect on Dicer mRNA. We also found a vitamin D response element in Dicer promoter that interacts in vitro to vitamin D and retinoid X receptors. To explore the biological plausibility of these results, we asked if calcitriol alters the microRNA expression profile in SiHa cells. Our results revealed that calcitriol regulates the expression of a subset of microRNAs with potential regulatory functions in cancer pathways, such as miR-22, miR-296-3p, and miR-498, which exert tumor-suppressive effects. In summary, the data indicate that in SiHa cells, calcitriol stimulates the expression of Dicer possibly through the vitamin D response element located in its promoter. This may explain the calcitriol-dependent modulation of microRNAs whose target mRNAs are related to anticancer pathways, further adding to the various anticancer mechanisms of calcitriol.

Key words: vitamin D, Dicer, Drosha, VDR, microRNA, cervical cancer.

Résumé : Les microARN exercent des rôles importants dans la biologie du cancer. Le calcitriol, la forme hormonale de la vitamine D₃, régule l'expression des microARN dans les cellules tumorales. Dans l'étude présente, les auteurs ont voulu savoir si le calcitriol modifiait certaines composantes de la machinerie de la maturation des microARN, notamment Drosha et Dicer, dans des cellules de cancer cervical répondant au calcitriol. Ils ont trouvé qu'un traitement au calcitriol n'affectait pas l'ARNm de Drosha; cependant, il accroissait significativement l'ARNm de Dicer et l'expression de la protéine dans les cellules exprimant le VDR, les cellules SiHa et HeLa. Chez les cellules C33-A négatives au VDR, le calcitriol n'avait pas d'effet sur l'ARNm de Dicer. Les auteurs ont aussi trouvé un élément de réponse à la vitamine D dans le promoteur de Dicer qui interagit in vitro avec les récepteurs de la vitamine D et des rétinoïdes X. Afin d'explorer la signification biologique de ces résultats, ils ont vérifié si le calcitriol modifie le profil d'expression des microARN des cellules SiHa. Leurs résultats révèlent que le calcitriol régule l'expression d'un sous-ensemble de microARN possédant des fonctions régulatrices potentielles dans les voies cancéreuses, comme miR-22, miR-296-3p et miR-498, qui exercent des effets suppresseurs des tumeurs. En résumé, les données indiquent que dans les cellules SiHa, le calcitriol stimule l'expression de Dicer, possiblement au moyen d'un élément de réponse à la vitamine D localisé dans son promoteur. Ceci peut expliquer la modulation dépendante du calcitriol des microARN dont les ARNm cibles sont reliés à des voies anticancéreuses, ce qui s'ajoute aux différents mécanismes anticancéreux du calcitriol. [Traduit par la Rédaction]

Mots-clés : vitamine D, Dicer, Drosha, microARN, cancer cervical.

Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding RNA molecules that bind to the 3'-untranslated region of target mRNAs resulting in gene silencing (Stroynowska-Czerwinska et al. 2014). They have fundamental roles in human biology, and their deregulation has been associated with several diseases, including cancer (De Santa et al. 2013). MiRNA biogenesis begins in the nucleus

with transcription, followed by multiple processing steps to produce mature miRNAs. Among these maturation steps, the catalytic activities of Drosha and Dicer ribonucleases are essential in the miRNA biogenesis. Deregulated levels of these key enzymes are associated with impaired miRNA maturation and tumorigenesis in animal models and in a variety of human cancers [reviewed in De Santa et al. (2013)].

Received 27 January 2015. Revision received 21 April 2015. Accepted 7 May 2015.

R.J. González-Duarte and V. Cázares-Ordoñez. Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga # 15, Col. Sección XVI, México, D.F. 14000, México; School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Interior, Ciudad Universitaria, Av. Universidad # 3000, México, D.F. 04510, México.

S. Romero-Córdoba and A. Hidalgo-Miranda. Laboratory of Cancer Genomics, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur # 4809, Col. Arenal Tepepan, México, D.F. 14610, México.

L. Díaz, F. Larrea, and E. Avila. Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga # 15, Col. Sección XVI, México, D.F. 14000, México.

V. Ortiz. Department of Physiology of Nutrition, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga # 15, Col. Sección XVI, México, D.F. 14000, México.

J.A. Freyre-González. Evolutionary Genomics Program, Center for Genomic Sciences, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad s/n, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, México.

Corresponding author: Euclides Avila (e-mail: euclides.avilac@incmnsz.mx).

Table 1. Primers and probes used in qPCR.

Gene (GenBank accession number)	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Position	Amplicon (nt)	Universal ProbeLibrary Probe
Drosha (NM_013235)	GGCCCGAGAGCCTTTTATAG	TGCACACGTCTAACTCTTCCAC	167–285	119	17
Dicer (NM_177438)	TCCGATGGTTCTCGAAGG	GCAAAGCAGGGCTTTTCAT	154–256	105	47
CYP24A1 (NM_000782)	CATCATGGCCATCAAAACAA	GCAGCTCGACTGGAGTGAC	1120–1184	65	88
GAPDH (AF261085)	AGCCACATCGCTGAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC	84–149	66	60

Numerous studies have suggested that vitamin D and its derivatives are useful agents for the prevention and therapy of several types of human cancer (Feldman et al. 2014). In general, calcitriol regulates many physiological processes, including cellular growth and differentiation, through the interaction of the heterodimer formed by the vitamin D receptor (VDR) and the retinoid X receptor (RXR) with specific sequences on target genes termed vitamin D response elements (VDREs) (Carlberg and Campbell 2013). In addition, calcitriol also modifies gene expression patterns by regulating miRNAs expression (Feldman et al. 2014), but the mechanism involved in this process is still unclear. It could be possible that calcitriol regulates miRNA biogenesis by acting over the key machinery components expression. Thus, the aim of the present study was to investigate if calcitriol affects the expression of Drosha and Dicer in calcitriol-responsive cervical cells and to evaluate its effects on miRNA differential expression. SiHa and HeLa cervical cell lines were considered calcitriol-responsive because they express the VDR (Avila et al. 2010; Kloss et al. 2010), whereas C33-A cervical cell line was considered calcitriol-unresponsive because it lacks the VDR (Cázares-Ordoñez et al. 2015).

Materials and methods

Cell culture

Cervical cancer cell lines SiHa, C33-A, and HeLa were obtained from the ATCC (Rockville, Maryland, USA) and cultured in DMEM containing 5% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 units/mL), and streptomycin (100 µg/mL) in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and 95% air at 37 °C. Calcitriol was donated from Hoffmann-La Roche Ltd (Basel, Switzerland). Cells were treated with 0.1% ethanol as vehicle or the indicated concentrations of calcitriol in DMEM, supplemented with charcoal-treated FBS.

mRNA expression analysis

Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) according to the protocol established by Chomczynski and Sacchi (1987). The concentration and quality assessment of RNA samples were determined by spectrophotometry and agarose gel electrophoresis, respectively. RNA was stored at –80 °C. The synthesis of cDNA was performed using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Germany) with the anchored-oligo(dT)18 priming method, for 90 min at 42 °C, using 3 µg of total RNA as template. Real-time PCR (qPCR) was carried out using the TaqMan Master System, using specific hydrolysis probes from the Universal ProbeLibrary set for human and the LightCycler 2.0 Instrument from Roche (Roche, Germany), as previously described (Avila et al. 2010). Targets accession number, hydrolysis probes number, primers sequences, and sizes of resulting amplicons are shown in Table 1. The PCR thermocycling parameters consisted of an initial denaturation step at 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles at 94 °C for 10 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 1 s, as described in the kit protocol from Roche. The expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used to normalize gene expression, given that it is not affected by calcitriol treatment in SiHa, HeLa, and C33-A cervical cancer cells (Avila et al. 2010; Cázares-Ordoñez et al. 2015). Data were analyzed using a relative quantification analysis with the LightCycler Software 4.05 (Roche, Germany).

Western blotting

Western blotting was performed as described previously (Cázares-Ordoñez et al. 2015). Proteins were separated onto 10% denaturing polyacrylamide gels and transferred by wet electroblotting overnight at 25 volts to nitrocellulose membranes. The primary antibodies used were: Dicer (sc-136980, 1:200) from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, California, USA) and as loading control GAPDH (MAB374, 1:10000) from Millipore (Billerica, Maryland, USA). The optical density of each protein band was quantitated using the Molecular Imager ChemiDoc XRS System and the Image Lab Software (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

In silico screening for VDREs in Dicer gene

Human and mouse Dicer genomic sequences (UC001ydx.2 and UC007oxi.1, respectively) were obtained from the UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) (Kent et al. 2002). The human sequence analyzed in this study comprised 5000 bp upstream from the Dicer transcription start site, corresponding to the gene promoter. The computational screening for VDREs in the human Dicer sequence was carried out using the Jaspar database version 4.0 (<http://jaspar.genereg.net/>) (Portales-Casamar et al. 2010). The matrix model MA0074.1 (specific for RXR-VDR) was used to identify putative VDREs. To highlight relevant VDREs, shared by orthologous human and mouse Dicer sequences, a phylogenetic footprinting analysis was performed using the ConSite program (<http://asp.ii.uib.no:8090/cgi-bin/CONSITe/consite>) (Sandelin et al. 2004).

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Nuclear extracts from SiHa cells treated during 3 h with 0.1 µmol/L calcitriol were prepared using the CellLytic NUCLEAR Extraction Kit (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) following manufacturer's instructions. Protein concentration was determined by the bicinchoninic acid protein assay. EMSAs were performed using the Gel Shift Assay System (Promega, Madison, Wisconsin, USA), as described by Cázares-Ordoñez et al. (2015), using double-stranded probes generated by mixing the complementary oligonucleotides (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa, USA), shown in Table 2. EMSAs were performed with ³²P end-labeled probes containing a canonical DR3-type VDRE as a positive control (DR3-VDRE) (Qi et al. 2002), the putative VDRE in the human Dicer gene promoter (Dicer-VDRE) or a mutant form of this VDRE (Dicer-VDRE-Mut). Six micrograms of SiHa nuclear extracts, 17.5 fmol of each labeled probe and 2 µg of poly(dI-dC) were added per reaction. For supershift assays, samples were pre-incubated during at least 30 min with 3 µg of specific antibodies against VDR or RXR before the incubation of the labeled probes with nuclear extracts. For competition studies, a 100-fold excess unlabeled double-stranded probe was added as a specific competitor in each reaction. The DNA-protein complexes were resolved on 4% non-denaturing polyacrylamide gels and visualized by autoradiography.

miRNA expression analysis

SiHa cells treated with ethanol as vehicle or 1 µmol/L calcitriol were incubated during 24 or 48 h, before total RNA was isolated using TRIzol reagent. Each experiment was performed with six replicates, and two independent experiments were performed. RNA concentration was determined using a NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA), and integrity was

Table 2. Primers used for EMSAs.

Double stranded probe	Complementary oligonucleotides sequences
Dicer-VDRE	5'-TGGCTGGGGGCGGGATTACCTT-3' 5'-AAGGTTAATCCCGGCCCCAGCCA-3'
Dicer-VDRE-Mut	5'-TGGCTtGGGGCCGttATTAACCTT-3' 5'-AAGGTTAATAACGGCCCAAAGCCA-3'
DR3-VDRE	5'-AGCTTCAGGTCAAGGAGGTCAGAGAGCT-3' 5'-AGCTCTCTGACCTCCTTGACCTGAAGCT-3'

evaluated on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA). Only RNA samples with a RNA integrity number greater than 9.0 were further processed for microarray analysis. From the two independent experiments, we prepared two pools for each microarray analysis ($N = 2$). Each RNA pool consisted of mixing equimolar concentrations of total RNA from six independent experimental replicates (three replicates from each of the independent experiments per condition). Thus, a total of 8 microarrays were used in this study. miRNA expression was evaluated with the Affymetrix GeneChip miRNA Arrays v 3.0, which analyzed 1733 mature miRNAs and 1658 premiRNAs (Affymetrix, Santa Clara, California, USA). Gene expression profiling was performed using the Affymetrix FlashTag Biotin HSR RNA labeling kit. Briefly, 1 μ g of total RNA was labeled with FlashTag HSR kit and hybridized to the Affymetrix GeneChip. Washing and staining processes were performed in a GeneChip Fluidics Station 450. The probe arrays were scanned using an Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G. Microarray experiments were done at the genotyping and gene expression core laboratory of the National Institute of Genomic Medicine in Mexico City. Microarray data were deposited in Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/summary/>) with accession number GSE61829. The computational analysis of the microarray data CEL files was processed with the Affy library in R Bioconductor. Microarray background correction and normalization was done using Robust Multichip Analysis (RMA) and quantile algorithm, respectively. Differentially expression patterns between calcitriol treatment and controls were determined using the Limma package to perform an adjusted Student's *t*-test, using a Bayesian estimation of the variance. To define the differentially expressed genes, a threshold of *P* value ≤ 0.05 and a fold change value of at least 1.4 were considered. Unsupervised hierarchical clustering analysis with the normalized values of the differentially expressed miRNAs was performed using the ggplots package in R, performing a Z-score scaling to avoid the dominance of extreme values.

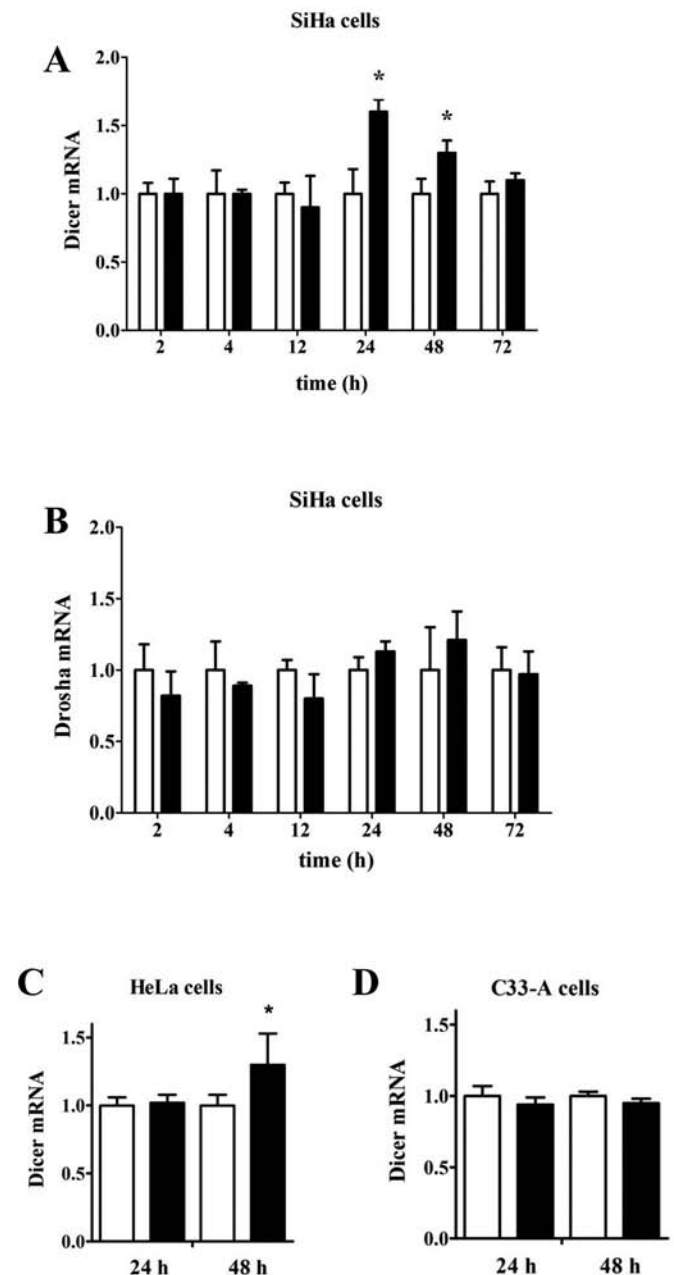
miRNA pathway analysis

To identify the biological processes in which the differentially expressed miRNAs genes might be involved, miWalk database (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>), which provides information on miRNA targets based in 10 algorithms (DIANA-mT, miRanda, miRDB, miRWalk, RNAhybrid, PICTAR v4 and v5, PITA, RNA22, and TargetScan), was used. Only target mRNAs predicted for at least 7 different algorithms were considered for the further pathway analysis. An enrichment analysis was done using the DAVID database (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) to provide a possible biological meaning behind the predicted target mRNAs. For pathway visualization, the Enrichment map plug-in of cytoscape was used.

Statistical analysis

The effect of calcitriol upon Dicer mRNA and protein was evaluated at least in three independent experiments in triplicate. The results were expressed relative to vehicle-treated controls (mean \pm SD). Statistical comparisons were assessed by a 2-tailed Student's *t*-test, and differences were taken to be statistically significant at $P < 0.05$.

Fig. 1. Time course of the effect of calcitriol on Dicer and Drosha mRNA levels in cervical cancer cells. SiHa cells were treated with 1 μ mol/L calcitriol (filled bars) or 0.1% ethanol as vehicle (open bars) for variable times before total RNA was isolated. For the qPCR assays, Dicer (A) or Drosha (B) mRNA levels were normalized to GAPDH mRNA and results were represented relative to values from vehicle-treated SiHa cells. HeLa (C) and C33-A (D) cells were incubated with calcitriol (filled bars) or its vehicle (open bars) during 24 or 48 h and then subjected to Dicer mRNA expression studies as described. Data are presented as mean \pm SD from 3 independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.05$ vs control at the same incubation time.



Results

Dicer mRNA and protein levels are induced by calcitriol

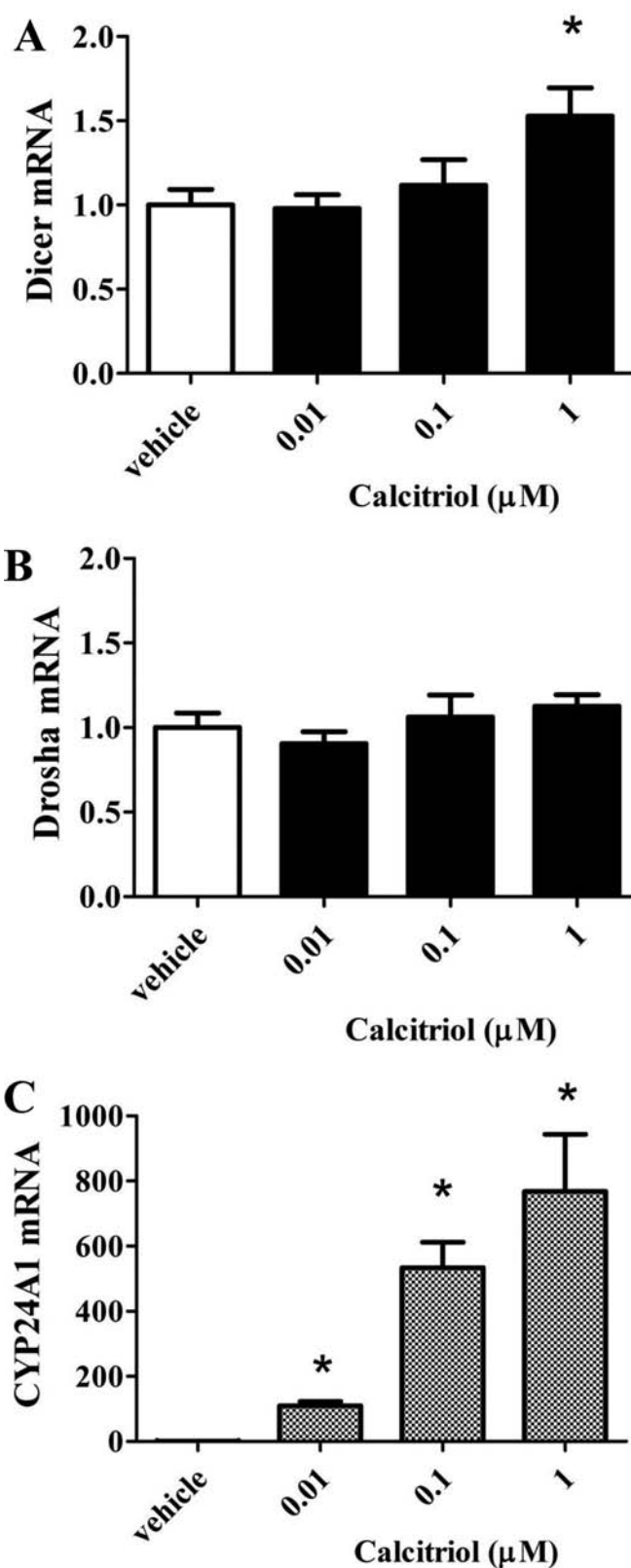
To investigate if Dicer and Drosha genes are regulated by calcitriol, qPCR analyses were performed in SiHa cervical cancer cells, which are known to be sensitive to the antiproliferative

Fig. 2. Dicer but not Drosha mRNA levels are stimulated by high-concentration calcitriol in VDR-positive SiHa cervical cells. SiHa cells were treated during 24 h with increasing concentrations of calcitriol (filled bars) or 0.1% ethanol as vehicle (open bars) before total RNA was isolated. For the qPCR assays, Dicer (A), Drosha (B), or CYP24A1 (C) mRNA levels were normalized to GAPDH mRNA and results were represented relative to values from vehicle-treated cells. Data are presented as mean \pm SD from 3 independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.05$ vs vehicle.

effects of calcitriol (Avila et al. 2010). The time-course of Dicer and Drosha mRNA expression in SiHa cells treated in the presence or absence of 1 $\mu\text{mol/L}$ calcitriol are shown in Figs. 1A and 1B, respectively. As depicted, Dicer mRNA was significantly upregulated in cells incubated during 24 and 48 h in the presence of calcitriol (60% and 30%, respectively), while Drosha mRNA remained unchanged throughout the experiment. To investigate if the regulatory effect of calcitriol upon Dicer gene was observed in other cervical cells, we performed incubations in HeLa and C33-A cervical cell lines with calcitriol during 24 and 48 h. In VDR-positive HeLa cells, the inductive effect of calcitriol upon Dicer mRNA was only observed at 48 h after incubation in the presence of calcitriol (Fig. 1C). In contrast, this calcitriol effect on Dicer mRNA was not observed in VDR-negative C33-A cells at any of the incubation times tested (Fig. 1D). When SiHa cells were incubated during 24 h with different calcitriol concentrations, we detected that calcitriol upregulated Dicer mRNA expression by 50% only at the highest concentration tested (Fig. 2A), while Drosha mRNA was not affected by the treatment (Fig. 2B). As a control of the dose-dependent studies, we performed simultaneous amplifications of CYP24A1, a well-known target of calcitriol (Avila et al. 2010). As depicted in Fig. 2C, calcitriol increased in a dose-dependent manner the expression of CYP24A1 in SiHa cells. Supporting these observations, increased Dicer protein expression was observed in SiHa cells incubated during 24 and 48 h with calcitriol, as well as in HeLa cells treated with the hormone during 48 h (Figs. 3A, 3D and 3B, 3E, respectively). On the other hand, and in accordance with the mRNA results, Dicer protein expression did not change in C33-A cells incubated with calcitriol at any of the incubation times tested (Figs. 3C and 3F).

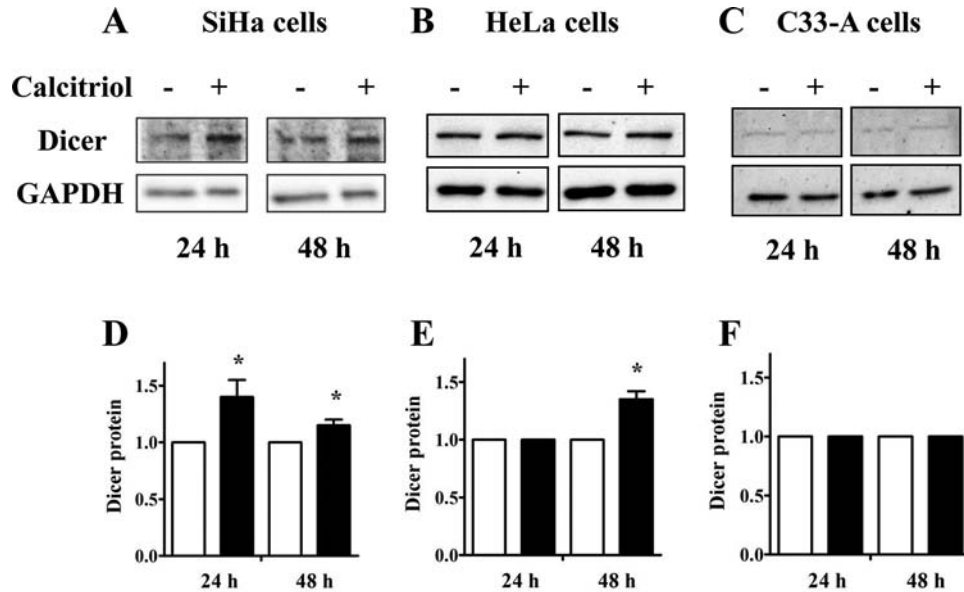
A VDRE in Dicer promoter interacts in vitro with VDR and RXR

The effect of calcitriol on Dicer expression was most probably through the classical mechanism of transcriptional activation of VDR, as seen on other calcitriol-regulated genes (Carlberg and Campbell 2013). On these bases, we hypothesize that the Dicer promoter contained *cis*-acting elements responsible of calcitriol effects upon transcription. Thus, an *in silico* analysis was performed in a genomic sequence of human chromosome 14, comprising the promoter region of Dicer gene. Our computational screening, using a position weight matrix specific for RXR-VDR combined with a phylogenetic footprinting analysis between orthologous human and mouse Dicer genomic sequences, allowed us to identify the sequence 5'-GGGGGGCCGGGATTA-3', which corresponds to a putative DR3-type VDRE, evolutionarily conserved between these organisms. The ability of SiHa nuclear proteins to bind this putative VDRE in the Dicer promoter was experimentally evaluated by electrophoretic mobility shift assay. As shown in Fig. 4A, lanes 2 and 3, both canonical DR3-VDR and the VDRE present in the Dicer promoter produced a DNA-protein complex when incubated in the presence of nuclear extract from SiHa cells. As expected, the presence of Dicer-VDRE-Mut reduced significantly the formation of the DNA-protein complex (lane 4). The use of an antibody against the three isoforms of RXR in the reaction mix resulted in an intense supershift (lane 6), and pre-incubation in the presence of an anti-VDR antibody resulted in a discrete supershifted band (lane 5). Figure 4B shows the specificity of the



complex formation as evaluated by competition studies. As shown in lane 5, in the presence of a 100-fold excess of unlabeled Dicer-VDRE, the intensity of the retarded band decreased when compared to incubation in the presence of only [^{32}P]-labeled Dicer-VDRE (lane 3). On the contrary, a 100-fold excess of unlabeled Dicer-VDRE-Mut (lane 6) did not change in a sig-

Fig. 3. Dicer protein levels are stimulated by calcitriol in VDR-positive cervical cells (SiHa and HeLa) but not in VDR-negative C33-A cervical cells. SiHa (A), HeLa (B), and C33-A (C) cells were treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ calcitriol or 0.1% ethanol as vehicle for 24 or 48 h before total cell lysates were obtained. For the western blot analysis, 100 μg of each cell lysate was used. Dicer protein (218 kDa) was normalized against GAPDH (37 kDa), used as loading control, and quantitative analysis of the protein expression measured by the optical density of each band was performed. Representative western blots are shown (A, B, and C). The ratios (mean \pm SD) of the optical densities from Dicer over GAPDH in the presence of calcitriol (filled bars) or its vehicle (open bars) are shown from 3 independent experiments in each cell line (D, E, and F). * $P < 0.05$ vs vehicle at the same incubation time.



nificant manner the intensity of the band, compared with that obtained with the radiolabeled probe. Finally, nuclear extracts, incubated in the presence of [^{32}P]-labeled Dicer-VDRE-Mut that resulted in a weak intensity band (lane 4), practically disappeared when a 100-fold excess of unlabeled Dicer-VDRE was added as a competitor (lane 7).

Calcitriol differentially regulates several miRNAs in SiHa cervical cells

To study if a high concentration of calcitriol was able to modify the miRNA expression pattern, we examined the expression of premiRNAs and mature miRNAs by using an Affymetrix miRNA microarray with RNA samples from SiHa cells incubated in the presence or absence of calcitriol. Genome-wide miRNA expression profiles of premiRNAs and mature miRNAs revealed a set of miRNA transcripts differentially expressed by calcitriol treatment (Supplementary data, Table S1¹). This analysis revealed 16 and 15 miRNAs downregulated in SiHa cells incubated with calcitriol during 24 and 48 h, respectively (Table 3). Interestingly, only miRNA-3921 was downregulated by calcitriol at both incubation times studied. From the total miRNAs analyzed, 8 premiRNAs were overexpressed after calcitriol treatment, while 31 mature miRNAs were upregulated at 24 h. An increased number of mature miRNAs were significantly upregulated at 48 h of incubation (55 mature miRNAs), while only 2 premiRNAs increased their expression in the same analysis. There were more overexpressed mature miRNAs than premiRNAs under calcitriol treatment, and their number was higher after a longer incubation time (Fig. 5A). Unsupervised clustering analysis, using the differentially overexpressed mature miRNAs, showed a clear difference between calcitriol-treated SiHa cells and those from control cells at both incubation times studied (Figs. 5 B and 5C). Analysis of overexpressed mature miRNAs at 24 h versus 48 h of calcitriol treatment allowed us to identify the enrichment of seven common miRNAs

that overlap between both experimental times (Fig. 5D). These common miRNAs were miR-22, 296-3p, 29c, 342-5p, 4455, 4462, and 4656.

Differentially expressed miRNAs and their potential transcriptional targets

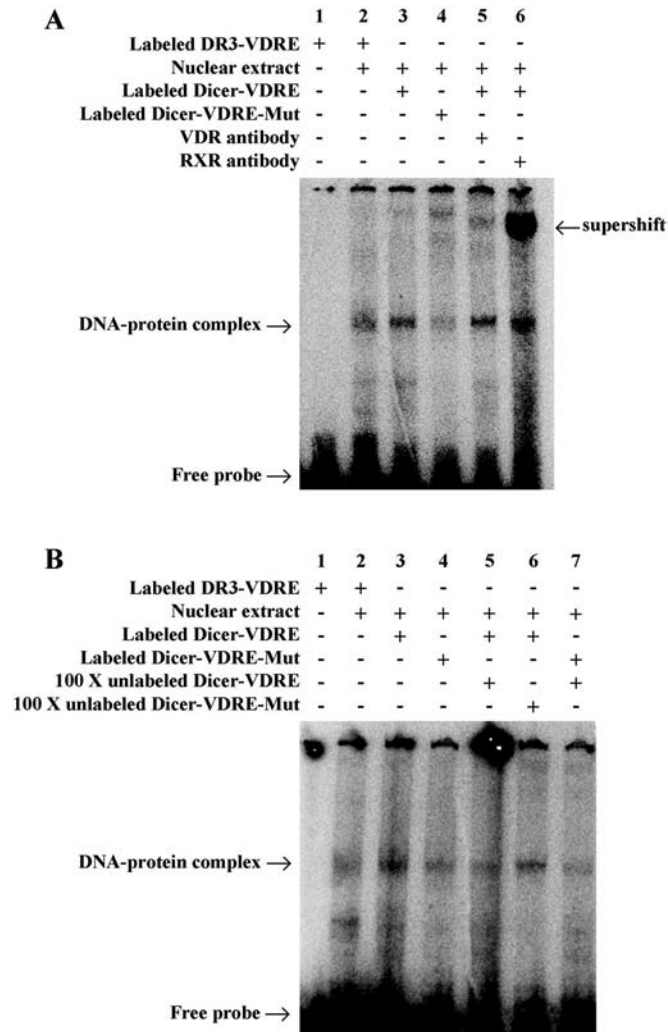
The calcitriol-upregulated miRNAs in SiHa cells include some with proven target mRNAs involved in cervical oncogenesis, such as that coding for ether-à-go-go 1 potassium channel (KCNH1) (Bai et al. 2013). To define possible target mRNAs for the differentially expressed miRNAs and their impact on potential cellular pathways, we performed a target mRNAs prediction analysis with at least 7 different algorithms followed by an enrichment analysis of the predicted target mRNAs using DAVID database. The predicted target mRNAs of the upregulated miRNAs by calcitriol in SiHa cells at 24 and 48 h of treatment are indicated in Supplementary data, Tables S2 and S3¹, respectively. The results of the enrichment analysis of the predicted target mRNAs by calcitriol-induced miRNAs are presented in Supplementary data, Table S4¹. Regarding the upregulated miRNAs by calcitriol, this analysis showed several significantly enriched pathways, such as those involved in transcriptional regulation, cell motion, and cellular organization, chromatin modification and regulation of apoptosis, among others (Fig. 6). In addition, some cell processes such as cell signaling, programmed cell death, and intracellular transport are predicted to be affected by the downregulated miRNAs in SiHa cells treated with calcitriol (Fig. 6).

Discussion

Despite the fundamental importance of Drosha and Dicer in biology, little is known about the regulatory processes controlling their expression. In particular, Drosha gene is modulated by c-Myc oncogene (Wang et al. 2013) and during hypoxia by a mechanism

¹Supplementary data are available with the article through the journal Web site at <http://nrcresearchpress.com/doi/suppl/10.1139/bcb-2015-0010>.

Fig. 4. Binding of VDR and RXR to a VDRE in the human Dicer gene promoter. (A) EMSA of nuclear extracts prepared from SiHa cells (treated with 0.1 $\mu\text{mol/L}$ calcitriol during 3 h) and incubated with ^{32}P -labeled double-stranded DNA probes containing a canonical DR3-type VDRE (DR3-VDRE, lane 2), the identified VDRE in Dicer promoter (Dicer-VDRE, lanes 3, 5, and 6), and a mutant form of this VDRE (Dicer-VDRE-Mut, lane 4). Supershift assay was performed by preincubating 3 μg of specific antibodies against VDR (lane 5) or RXR (lane 6) with 6 μg of nuclear extracts. (B) Competitive assays of labeled Dicer-VDRE with a 100-fold excess of either unlabeled Dicer-VDRE (lane 5) or unlabeled Dicer-VDRE-Mut (lane 6). Lane 7 shows the competitive assay of labeled Dicer-VDRE-Mut with a 100-fold excess of unlabeled Dicer-VDRE. Lane 1 in each panel corresponds to free probe as a negative control.



dependent of ETS1/ELK1 transcription factors (Rupaimoole et al. 2014), respectively. In this study we did not find a regulatory action of calcitriol upon Droscha expression in cancer cervical cells, which indicates that Droscha is not a calcitriol-target gene.

On the other hand, estradiol and progesterone, acting through its cognate nuclear receptors, have been identified as inducers of Dicer expression in reproductive tissues (Bhat-Nakshatri et al. 2009; Nothnick et al. 2010). Herein, we demonstrated that both Dicer mRNA and protein levels were moderately but significantly upregulated by a high-concentration of calcitriol in VDR-positive SiHa and HeLa cervical cancer cells.

Dicer induction by calcitriol was comparable to that observed with estradiol and progesterone (Bhat-Nakshatri et al. 2009;

Table 3. MiRNAs downregulated by calcitriol in SiHa cervical cancer cells.

24 h treatment	48 h treatment
miR-1249	miR-1292
miR-125b-1	miR-181c
miR-1262	miR-2277-3p
miR-150	miR-3162-3p
miR-199b-3p	miR-3201
miR-297	miR-3605-5p
miR-30b	miR-3613-5p
miR-3128	miR-3648
miR-362-3p	miR-3917
miR-3921	miR-3921
miR-4276	miR-4418
miR-606	miR-4423-3p
miR-663b	miR-4442
miR-720	miR-548a
miR-766	miR-551b
miR-769-3p	

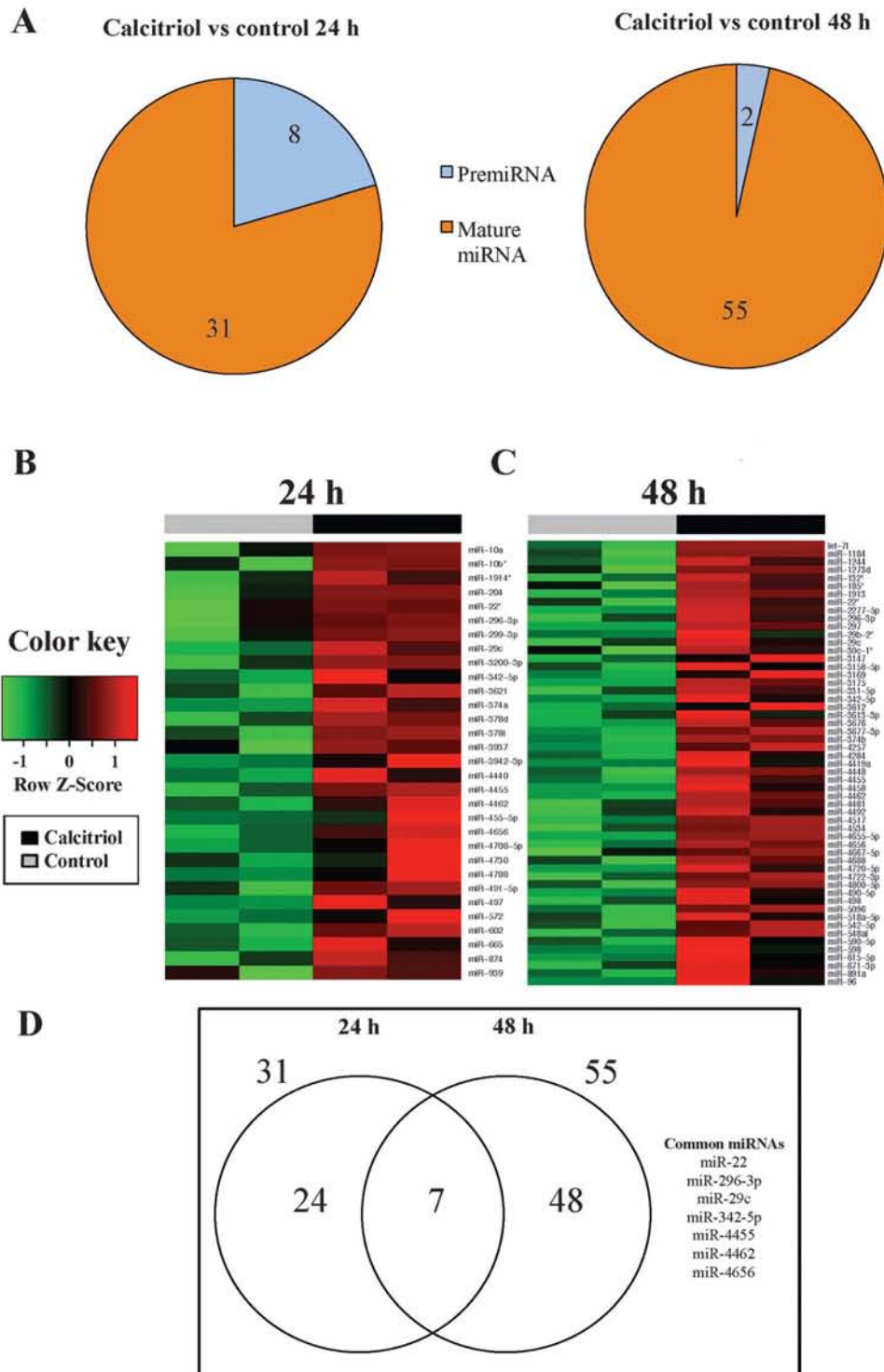
Nothnick et al. 2010). This evidence indicates that Dicer expression is hormonally regulated (Fletcher et al. 2014), and the low but significant induction of Dicer expression could be a consequence of a tight regulation in the cell by other cellular factors such as Tap63 (Su et al. 2010), the RNA-binding protein AUF1 (Abdelmohsen et al. 2012), and by miRNAs miR-103/107, miR-130a, and let-7 (Forman et al. 2008; Martello et al. 2010; Su et al. 2010; Tokumaru et al. 2008).

Our results suggest that the regulation of Dicer gene by calcitriol is a VDR-mediated process, since the inductive response in Dicer gene was not observed in VDR-negative C33-A cells. However, we cannot rule out a possible regulatory effect of oncogenes of high-risk papillomavirus (HPVs) on Dicer expression, because the upregulation was observed in SiHa and HeLa cells (containing HPV-16 and -18 (respectively) but not detected in HPV-free C33-A cells. Although the promoter of human Dicer gene has not been characterized, our *in silico* analysis revealed the presence of a putative VDRE, evolutionary conserved, in the promoter region of Dicer gene. The EMSA results demonstrated that this putative VDRE is recognized by nuclear proteins of SiHa cells, particularly the VDR and RXR. These *in vitro* results suggest that this interaction may be responsible of the induction of Dicer gene by calcitriol in VDR-positive cells.

The use of high concentrations of steroids (for instance, 1 $\mu\text{mol/L}$ estradiol) in miRNA profiling studies has been described and actually has shown some interesting findings on miRNAs and endometrial cancer regulation (Zhang et al. 2012). Herein we showed that calcitriol at high concentration upregulated and downregulated the expression of several miRNAs. Interestingly, the cellular processes and pathways potentially regulated by the calcitriol-mediated differential expression of miRNAs in SiHa cells are known to be involved in cancer development.

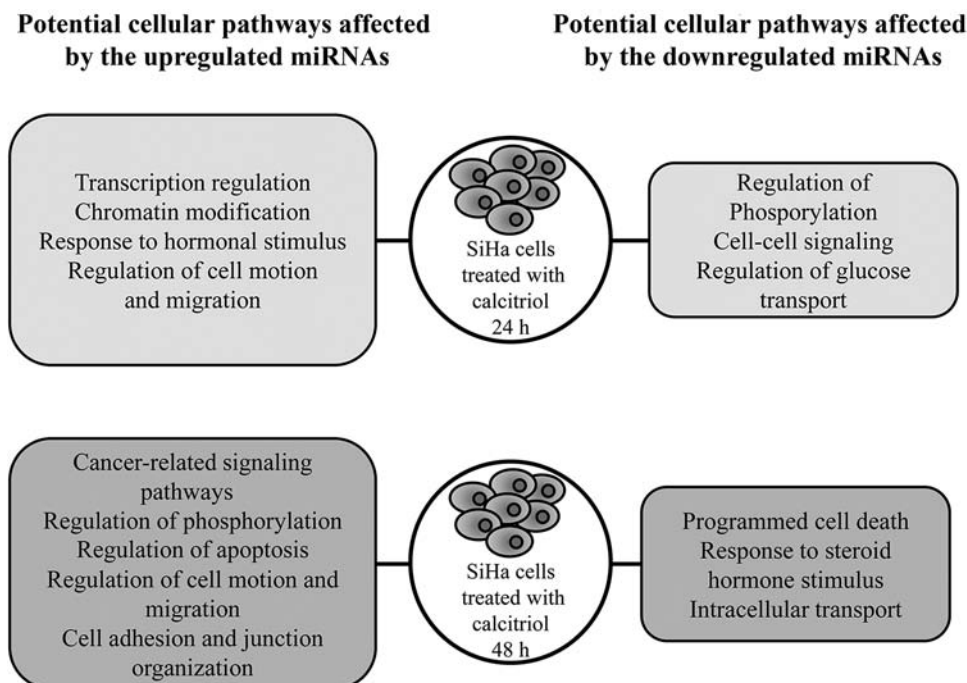
The only miRNA downregulated by calcitriol at both incubation times studied in SiHa cells was miRNA-3921, whose biological function remains unknown. There were no more common miRNAs between the incubation times tested, and neither of the miRNAs downregulated were previously reported to be regulated by calcitriol. Among the microRNAs downregulated by calcitriol, there are some with potential interest in cancer biology. The significance of these results awaits further studies. On the other hand, calcitriol increased the expression of some miRNAs in SiHa cervical cells that are potentially related to its antiproliferative effects. One of the miRNAs induced by calcitriol at 48 h was miRNA-498. This miRNA is involved in calcitriol downregulation of the human telomerase reverse transcriptase, which is essential for the growth of ovarian, breast, and endometrial tumors

Fig. 5. (Colour online) Differential expression of premiRNAs and mature miRNAs after calcitriol treatment in SiHa cervical cells. (A) Pie chart showing the upregulated premiRNAs and mature miRNAs after 24 and 48 h of calcitriol treatment versus their respective vehicle-treated (control) SiHa cells. Unsupervised hierarchical clustering of the upregulated mature miRNAs (fold change > 1.4, $P < 0.05$) in SiHa cells treated with calcitriol or its vehicle for 24 h (B) and 48 h (C). The normalized values of each miRNAs were plotted in rows, and columns represent independent experiments. These values, denoted as the row Z-score, are plotted in green–red colour scale, with green indicating low expression and red indicating high expression. Each condition (calcitriol and vehicle-treated cells) is presented from 2 independent experiments for each incubation time. (D) Venn diagrams showing the overlap between upregulated mature miRNAs in SiHa cell line treated during 24 and 48 h.



Biochem. Cell Biol. Downloaded from www.nrcresearchpress.com by UNAM PE8 on 07/23/15 For personal use only.

Fig. 6. Potential cellular pathways affected by differentially expressed miRNAs (upregulated and downregulated) in SiHa cervical cancer cells treated with calcitriol during 24 and 48 h. Cellular pathways analysis was performed using DAVID database, considering the target mRNAs (predicted by at least 7 algorithms from miRWalk database) of the differentially expressed miRNAs (upregulated and downregulated).



(Kasiappan et al. 2012). Among the seven miRNAs induced by calcitriol at 24 and 48 h, miRNA-22 was of particular interest, because its upregulation by calcitriol has been associated with anticancer actions in colon and prostate cancer cells (Alvarez-Diaz et al. 2012; Wang et al. 2011). Our study in SiHa cervical cancer cells is consistent with other reports showing that miRNA-498 and miRNA-22 are induced by calcitriol (Alvarez-Diaz et al. 2012; Kasiappan et al. 2012). These results suggest that these anti-cancer miRNAs might be part of a conserved group of calcitriol-regulated miRNAs in several types of human cancer.

Another interesting finding in this study was the upregulation by calcitriol of miRNA-296-3p. This miRNA has been associated with cell growth regulation and multi-drug resistance observed in some human cancers such as glioblastoma (Bai et al. 2013). It is worth mentioning that miRNA-296-3p may also act by targeting ether-à-go-go 1 potassium channel, whose aberrant expression is considered oncogenic. Indeed, ether-à-go-go 1 is an early marker of cervical cancer (Farias et al. 2004) and a promising anticancer target (Bai et al. 2013). Recent results from our group have demonstrated that calcitriol, through downregulating the ether-à-go-go 1 potassium channel (Cázares-Ordoñez et al. 2015), prevented cell proliferation of cervical cancer cells (Avila et al. 2010). These observations suggest that part of the calcitriol effects on cell proliferation may be through the upregulation of specific miRNAs, as mentioned above.

There are other studies reporting that calcitriol downregulates miRNA expression (Min et al. 2013). In our study, although there was a considerable number of repressed miRNAs, calcitriol increased a higher number of miRNAs than those downregulated. Thus in SiHa cells, calcitriol preferentially acts as an inducer of miRNA expression. Our results agree with several reports showing that different cell types treated with calcitriol express a higher number of miRNAs (Alvarez-Diaz et al. 2012; Gocek et al. 2011; Kasiappan et al. 2012; Komagata et al. 2009; Mohri et al. 2009; Padi et al. 2013; Ting et al. 2013; Wang et al. 2009).

Several mechanisms could lead to an increase in miRNA expression. One possibility is that the increase in miRNA expression

could be related to a higher expression of the miRNA biogenetic machinery. At least for Dicer, it has been proposed that its induction by progesterone in mouse uterus promoted the generation of mature miRNAs (Nothnick et al. 2010). Interestingly, our data suggest that although Dicer is an essential component of the canonical miRNA biogenesis machinery, the small increase in Dicer bioavailability was not enough to globally increase the levels of mature miRNAs. Therefore, the possibility exists that the specific miRNAs modulated by calcitriol might bear VDREs in their promoters, which deserves further study (Giangreco and Nonn 2013). Regarding the downregulation of miRNAs elicited by calcitriol, it seems that the mechanisms responsible are more complex than those operating in the miRNAs induction and include hypermethylation of miRNA genes. More study is needed to clarify this matter.

Overall, our results indicate that Dicer gene, expressed in human cervical cancer cells, is a calcitriol-regulated component of the miRNA biogenesis pathway. Taking into account that recent reports have described lower Dicer expression in human cancers, including cervical cancer (He et al. 2014; Pellegrino et al. 2013; Zhao et al. 2014), our findings might be of interest in the field of cancer biology. To our knowledge, this is the first report on the hormone calcitriol as a stimulator of Dicer expression in cervical cancer cells. We consider that our results provide the basis for further studies aimed at testing if calcitriol-mediated Dicer upregulation occurs in other cell types with lower concentrations of the hormone, compared to those we used with cervical cancer cell lines.

Conclusions

In summary, the present work showed that a high-dose of calcitriol in SiHa cervical VDR positive cells increased Dicer expression while modulating certain miRNAs with potential regulatory actions on cervical cancer. In contrast, the expression of Drosha was not affected by calcitriol in these cells.

Acknowledgements

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México), grant numbers 241034 and 153862 to EA and LD, respectively. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. This article is part of the doctoral thesis of RJGD, who is a Ph.D. student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas at School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México (Mexico) under a fellowship from CONACyT-207287.

References

Abdelmohsen, K., Tominaga-Yamanaka, K., Srikantan, S., Yoon, J.H., Kang, M.J., and Gorospe, M. 2012. RNA-binding protein AUF1 represses Dicer expression. *Nucleic Acids Res.* **40**(22): 11531–11544. doi:10.1093/nar/gks930. PMID: 23066106.

Alvarez-Diaz, S., Valle, N., Ferrer-Mayorga, G., Lombardia, L., Herrera, M., Dominguez, O., et al. 2012. MicroRNA-22 is induced by vitamin D and contributes to its antiproliferative, antimigratory and gene regulatory effects in colon cancer cells. *Hum. Mol. Genet.* **21**(10): 2157–2165. doi:10.1093/hmg/dds031. PMID:22328083.

Avila, E., Garcia-Becerra, R., Rodriguez-Rasgado, J.A., Diaz, L., Ordaz-Rosado, D., Zugel, U., et al. 2010. Calcitriol down-regulates human ether a go-go 1 potassium channel expression in cervical cancer cells. *Anticancer Res.* **30**(7): 2667–2672. PMID:20682996.

Bai, Y., Liao, H., Liu, T., Zeng, X., Xiao, F., Luo, L., et al. 2013. MiR-296-3p regulates cell growth and multi-drug resistance of human glioblastoma by targeting ether-a-go-go (EAG1). *Eur. J. Cancer.* **49**(3): 710–724. doi:10.1016/j.ejca.2012.08.020. PMID:22999387.

Bhat-Nakshatri, P., Wang, G., Collins, N.R., Thomson, M.J., Geistlinger, T.R., Carroll, J.S., et al. 2009. Estradiol-regulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **37**(14): 4850–4861. doi:10.1093/nar/gkp500. PMID:19528081.

Carlberg, C., and Campbell, M.J. 2013. Vitamin D receptor signaling mechanisms: integrated actions of a well-defined transcription factor. *Steroids.* **78**(2): 127–136. doi:10.1016/j.steroids.2012.10.019. PMID:23178257.

Cázares-Ordoñez, V., González-Duarte, R.J., Diaz, L., Ishizawa, M., Uno, S., Ortiz, V., et al. 2015. A cis-acting element in the promoter of human ether a go-go 1 potassium channel gene mediates repression by calcitriol in human cervical cancer cells. *Biochem. Cell Biol.* **93**(1): 94–101. doi:10.1139/bcb-2014-0073. PMID:25495694.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**(1): 156–159. doi:10.1016/0003-2697(87)90021-2. PMID:2440339.

De Santa, F., Iosue, L., Del Rio, A., and Fazi, F. 2013. microRNA biogenesis pathway as a therapeutic target for human disease and cancer. *Curr. Pharm. Des.* **19**(4): 745–764. doi:10.2174/138161213804581846. PMID:23016856.

Farias, L.M., Ocana, D.B., Diaz, L., Larrea, F., Avila-Chavez, E., Cadena, A., et al. 2004. Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer Res.* **64**(19): 6996–7001. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1204. PMID:15466192.

Feldman, D., Krishnan, A.V., Swami, S., Giovannucci, E., and Feldman, B.J. 2014. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat. Rev. Cancer.* **14**(5): 342–357. doi:10.1038/nrc3691. PMID:24705652.

Fletcher, C.E., Dart, D.A., and Bevan, C.L. 2014. Interplay between steroid signaling and microRNAs: implications for hormone-dependent cancers. *Endocr. Relat. Cancer.* **21**(5): R409–R429. doi:10.1530/ERC-14-0208. PMID:25062737.

Forman, J.J., Legesse-Miller, A., and Collier, H.A. 2008. A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**(39): 14879–14884. doi:10.1073/pnas.0803230105. PMID:18812516.

Giangreco, A.A., and Nonn, L. 2013. The sum of many small changes: microRNAs are specifically and potentially globally altered by vitamin D₃ metabolites. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **136**: 86–93. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.01.001. PMID:23333596.

Gocek, E., Wang, X., Liu, X., Liu, C.G., and Studzinski, G.P. 2011. MicroRNA-32 upregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human myeloid leukemia cells leads to Bim targeting and inhibition of AraC-induced apoptosis. *Cancer Res.* **71**(19): 6230–6239. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1717. PMID:21816906.

He, L., Wang, H.Y., Zhang, L., Huang, L., Li, J.D., Xiong, Y., et al. 2014. Prognostic significance of low DICER expression regulated by miR-130a in cervical cancer. *Cell Death Dis.* **5**: e1205. doi:10.1038/cddis.2014.127. PMID:24787017.

Kasiappan, R., Shen, Z., Tse, A.K., Jinwal, U., Tang, J., Lungchukiet, P., et al. 2012. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ suppresses telomerase expression and human cancer growth through microRNA-498. *J. Biol. Chem.* **287**(49): 41297–41309. doi:10.1074/jbc.M112.407189. PMID:23055531.

Kent, W.J., Sugnet, C.W., Furey, T.S., Roskin, K.M., Pringle, T.H., Zahler, A.M., and Haussler, D. 2002. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* **12**(6): 996–1006. doi:10.1101/gr.229102. PMID:12045153.

Kloss, M., Fischer, D., Thill, M., Friedrich, M., Cordes, T., Salehin, D., et al. 2010. Vitamin D, calcidiol and calcitriol regulate vitamin D metabolizing enzymes in cervical and ovarian cancer cells. *Anticancer Res.* **30**(11): 4429–4434. PMID: 21115889.

Komagata, S., Nakajima, M., Takagi, S., Mohri, T., Taniya, T., and Yokoi, T. 2009. Human CYP24 catalyzing the inactivation of calcitriol is post-transcriptionally regulated by miR-125b. *Mol. Pharmacol.* **76**(4): 702–709. doi:10.1124/mol.109.056986. PMID:19570947.

Martello, G., Rosato, A., Ferrari, F., Manfrin, A., Cordenonsi, M., Dupont, S., et al. 2010. A microRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell.* **141**(7): 1195–1207. doi:10.1016/j.cell.2010.05.017. PMID:20603000.

Min, D., Lv, X.B., Wang, X., Zhang, B., Meng, W., Yu, F., and Hu, H. 2013. Down-regulation of miR-302c and miR-520c by 1,25(OH)₂D₃ treatment enhances the susceptibility of tumour cells to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Br. J. Cancer.* **109**(3): 723–730. doi:10.1038/bjc.2013.337. PMID:23820258.

Mohri, T., Nakajima, M., Takagi, S., Komagata, S., and Yokoi, T. 2009. MicroRNA regulates human vitamin D receptor. *Int. J. Cancer.* **125**(6): 1328–1333. doi:10.1002/ijc.24459. PMID:19437538.

Nothnick, W.B., Healy, C., and Hong, X. 2010. Steroidal regulation of uterine miRNAs is associated with modulation of the miRNA biogenesis components exportin-5 and dicer1. *Endocrine.* **37**(2): 265–273. doi:10.1007/s12020-009-9293-9. PMID:20852728.

Padi, S.K., Zhang, Q., Rustum, Y.M., Morrison, C., and Guo, B. 2013. MicroRNA-627 mediates the epigenetic mechanisms of vitamin D to suppress proliferation of human colorectal cancer cells and growth of xenograft tumors in mice. *Gastroenterology.* **145**(2): 437–446. doi:10.1053/j.gastro.2013.04.012. PMID:23619147.

Pellegrino, L., Jacob, J., Roca-Alonso, L., Krell, J., Castellano, L., and Frampton, A.E. 2013. Altered expression of the miRNA processing endoribonuclease Dicer has prognostic significance in human cancers. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **13**(1): 21–27. doi:10.1586/era.12.150. PMID:23259424.

Portales-Casamar, E., Thongjuea, S., Kwon, A.T., Arenillas, D., Zhao, X., Valen, E., et al. 2010. JASPAR 2010: the greatly expanded open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* **38**(Database issue): D105–D110. doi:10.1093/nar/gkp950. PMID:19906716.

Qi, X., Pramanik, R., Wang, J., Schultz, R.M., Maitra, R.K., Han, J., et al. 2002. The p38 and JNK pathways cooperate to trans-activate vitamin D receptor via c-Jun/AP-1 and sensitize human breast cancer cells to vitamin D(3)-induced growth inhibition. *J. Biol. Chem.* **277**(29): 25884–25892. doi:10.1074/jbc.M203039200. PMID:11983707.

Rupaimoole, R., Wu, S.Y., Pradeep, S., Ivan, C., Pecot, C.V., Gharpure, K.M., et al. 2014. Hypoxia-mediated downregulation of miRNA biogenesis promotes tumour progression. *Nat. Commun.* **5**: 5202. doi:10.1038/ncomms6202. PMID: 25351346.

Sandelin, A., Wasserman, W.W., and Lenhard, B. 2004. ConSite: web-based prediction of regulatory elements using cross-species comparison. *Nucleic Acids Res.* **32**(Web Server issue): W249–W252. doi:10.1093/nar/gkh372. PMID: 15215389.

Stroynowska-Czerwinska, A., Fiszer, A., and Krzyzosiak, W.J. 2014. The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**(12): 2253–2270. doi:10.1007/s00018-013-1551-6. PMID:24468964.

Su, X., Chakravarti, D., Cho, M.S., Liu, L., Gi, Y.J., Lin, Y.L., et al. 2010. Tap63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs. *Nature.* **467**(7318): 986–990. doi:10.1038/nature09459. PMID:20962848.

Ting, H.J., Messing, J., Yasmin-Karim, S., and Lee, Y.F. 2013. Identification of microRNA-98 as a therapeutic target inhibiting prostate cancer growth and a biomarker induced by vitamin D. *J. Biol. Chem.* **288**(1): 1–9. doi:10.1074/jbc.M112.395947. PMID:23188821.

Tokumaru, S., Suzuki, M., Yamada, H., Nagino, M., and Takahashi, T. 2008. let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop. *Carcinogenesis.* **29**(11): 2073–2077. doi:10.1093/carcin/bgn187. PMID:18700235.

Wang, W.L., Chatterjee, N., Chittur, S.V., Welsh, J., and Tenniswood, M.P. 2011. Effects of 1 α ,25 dihydroxyvitamin D₃ and testosterone on miRNA and mRNA expression in LNCaP cells. *Mol. Cancer.* **10**: 58. doi:10.1186/1476-4598-10-58. PMID:21592394.

Wang, X., Gocek, E., Liu, C.G., and Studzinski, G.P. 2009. MicroRNAs181 regulate the expression of p27Kip1 in human myeloid leukemia cells induced to differentiate by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Cell Cycle.* **8**(5): 736–741. doi:10.4161/cc.8.5.7870. PMID:19221487.

Wang, X., Zhao, X., Gao, P., and Wu, M. 2013. c-Myc modulates microRNA processing via the transcriptional regulation of Drosha. *Sci. Rep.* **3**: 1942. doi:10.1038/srep01942. PMID:23735886.

Zhang, R., He, Y., Zhang, X., Xing, B., Sheng, Y., Lu, H., and Wei, Z. 2012. Estrogen receptor-regulated microRNAs contribute to the BCL2/BAX imbalance in endometrial adenocarcinoma and precancerous lesions. *Cancer Lett.* **314**(2): 155–165. doi:10.1016/j.canlet.2011.09.027. PMID:22014978.

Zhao, H., Jin, X., Su, H., Deng, X., Fang, Y., Shen, L., and Xie, C. 2014. Down-regulation of Dicer expression in cervical cancer tissues. *Med. Oncol.* **31**(5): 937. doi:10.1007/s12032-014-0937-0. PMID:24676997.



The microRNA biogenesis machinery: regulation by steroid hormones and alterations in cancer

Ramiro José González-Duarte*, Verna Cázares-Ordoñez*, Euclides Ávila-Chávez*

* Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

ABSTRACT

MicroRNAs are a class of non-coding RNAs that regulate gene expression at the post-transcriptional level. The major proteins of the canonical microRNA biogenesis pathway in human are: Drosha, DGCR8, DDX5, DDX17, Exportin 5, Dicer and Argonaute 2. Recent studies suggest that gene expression of some canonical microRNA biogenesis components could be regulated by steroid hormones. Furthermore, various alterations in microRNA biogenesis have been associated with diseases like cancer. Due to the importance of microRNAs in cell physiology, the study of the factors that regulate or affect their biogenesis is critical.

Key words. microRNA biogenesis. Steroid hormone. Gene expression. Post-transcriptional regulation. Cancer.

INTRODUCTION

One of the most meaningful advances in modern cell biology has been the discovery of small non-coding RNAs (~20-30 nucleotides) as genome regulators in both plants and animals.¹ In general, the effects of those non-coding RNAs on gene expression are inhibitory; therefore, they are considered part of RNA silencing. To exert their regulatory functions, small non-coding RNAs associate with proteins to produce the inhibitory effect on gene expression. In other words, the RNA molecules act as factors of specificity that direct bound effector proteins to target nucleic acids. So far, until today, there are three

La maquinaria de biogénesis de los microRNAs: regulación por hormonas esteroideas y alteraciones en el cáncer

RESUMEN

Los microRNAs son una clase de RNAs no codificantes que regulan la expresión génica en la etapa postranscripcional. Las principales proteínas de la vía canónica de biogénesis de los microRNAs en el humano son: Drosha, DGCR8, DDX5, DDX17, Exportina 5, Dicer y Argonauta 2. Estudios recientes sugieren que la expresión génica de algunos componentes de la biogénesis de los microRNAs podría ser blanco de las hormonas esteroideas. Por otro lado, diversas alteraciones en la biogénesis de los microRNAs han sido asociadas a padecimientos como el cáncer. Dada la importancia de los microRNAs en la fisiología celular, el estudio de los factores que regulan o afectan su biogénesis es fundamental.

Palabras clave. Biogénesis de microRNAs. Hormonas esteroideas. Expresión génica. Regulación postranscripcional. Cáncer.

major classes of small non-coding RNAs described in eukaryotes: short interfering RNAs (siRNAs), microRNAs (miRNAs) and piwi-interacting RNAs (piRNAs).² The microRNAs, mainly, represent the best characterized class of small RNAs and growing evidence supports their relevance in cell physiology. The microRNAs were discovered through genetic studies in nematode worm *Caenorhabditis elegans* as endogenous regulators for developmental timing.^{3,4} Later studies showed that plants and animals also require those RNAs as regulators in diverse physiological processes. In fact, it has been proposed that in humans, the microRNAs might regulate over half of the genome.⁵ Regulation of microRNA bio-

genesis is an important issue but has not been extensively studied. However, recent findings suggest that a complex network of interacting factors is involved in the regulation process. This review focuses on the regulation of microRNA biogenesis by steroid hormones, and also show information about alterations on microRNA biogenesis involved in cancer development.

MicroRNA biogenesis

The canonical pathway of microRNA biogenesis begins in the nucleus with the transcription, usually by RNA polymerase II, of long primary microRNAs (~1,000 nucleotides) that need to be sequentially processed to generate mature microRNAs (Figure 1). At the end of the process, the RNA Induced Silencing Complex (RISC) associates with the mature microRNAs to repress the translation of RNA messengers into proteins.⁶ It is important to note that the interaction between microRNAs and target messenger RNAs does not require total complementarity among the bases of both nucleic acids. Therefore one microRNA could regulate several messenger RNAs and, on the other hand, one messenger RNA

can be regulated by different microRNAs. This implicates a high complexity on the study of gene expression regulation by microRNAs.⁷

Interestingly, characterization of the interaction between microRNAs and target messenger RNAs has provided the basis for the development of computational programs to predict associations between microRNAs and their potential targets.⁸ However, experimental validation (*in vitro* and *in vivo*) is always necessary.

It is necessary to point out that microRNA biogenesis has alternative pathways. Several studies have shown that non-canonical pathways for microRNA biogenesis are conserved in different organisms. Although non-canonical microRNAs represent a small fraction of the total microRNAs, their discovery implicates that some microRNAs might be produced under specific developmental stages or altered cell conditions to achieve gene regulation.⁹

Regulation of microRNA biogenesis by steroid hormones

Steroid hormones regulate a wide diversity of fundamental processes in the organism. Recent studies

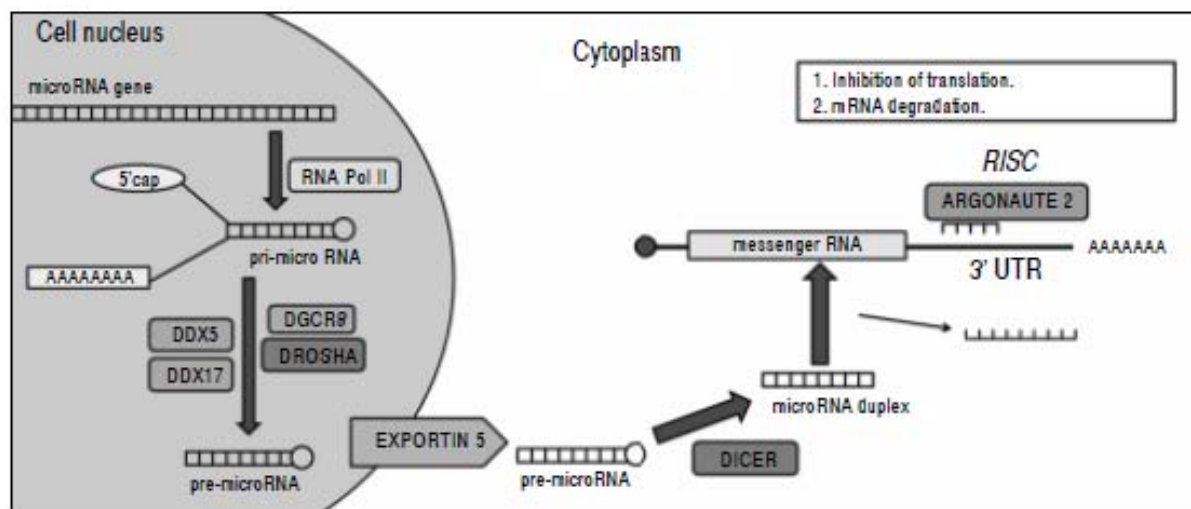


Figure 1. Canonical microRNA biogenesis pathway. Human genome encodes microRNA genes which are typically transcribed by RNA polymerase II to produce long, capped and polyadenylated, primary microRNA. The pri-microRNA stem-loop structure is processed by the microprocessor complex formed by: DGCR8, DROSHA and DDX5 and DDX17 RNA helicases. DROSHA enzyme crops the pri-microRNA into a hairpin-shaped precursor microRNA which is exported out of the nucleus by EXPORTIN 5. Once in the cytoplasm, DICER enzyme cleaves the loop from the pre-microRNA producing the mature microRNA (microRNA duplex). Only one strand of the microRNA duplex is loaded onto Argonaute 2 to form the RNA-induced silencing complex (RISC) to mediate gene silencing at the posttranscriptional level. microRNA binding sites in mRNAs generally lie in the 3' untranslated region (3' UTR). Partial complementarity between microRNA and target mRNA allows translational repression, without mRNA degradation. On the other hand, total complementarity allows mRNA degradation to produce the repressive effect.

Table 1. Effects of steroid hormones on canonical microRNA biogenesis pathway components.

Pathway component	Hormone	Tissue or cell line	Effect	Reference
Drosha	Estradiol and progesterone	Mouse uterus	No effect	13
DGCR8	Estradiol and progesterone	Mouse uterus	Messenger RNA increased (estradiol only)	13
DDX5	No reports have been published			
DDX17	No reports have been published			
Exportin 5	Estradiol and progesterone	Mouse uterus	Messenger RNA and protein increased	13
Dicer	Progesterone	Mouse uterus	Messenger RNA and protein increased	13
	Estradiol	MCF-7 cells	Messenger RNA increased	12
Argonaute 2	No reports have been published			

have demonstrated that hormonal effects also regulate microRNA expression. For example: estradiol stimulates or suppress microRNA expression in human breast cancer cells, endometrial cells, rat mammary gland and mouse uterus.¹⁰ On the other hand, a study performed with calcitriol (the hormonal form of vitamin D₃) and testosterone, in human prostate cancer cells, evaluated both messenger RNAs expression profile and microRNAs expression profile showing that both hormones regulate messenger RNA degradation by microRNAs action. Those observations revealed feedback loops that result in global changes in messenger RNA and protein levels.¹¹

As it was previously mentioned, in the canonical microRNA biogenesis pathway, many proteins participate coordinately from nucleus to cytoplasm. The genes that codify those proteins have been identified, but the factors that regulate their expression are little known. Although the regulation of microRNA biogenesis machinery components is in an early stage of study, some works suggest that hormonal action might have a major role. One of the first studies about this topic demonstrated that human Dicer gene expression is induced by estradiol. The study showed estradiol induced Dicer messenger RNA levels in MCF-7 human breast cancer cells. The authors described that estradiol modified the expression of several microRNAs and also induced the expression of Dicer enzyme, which is essential for the general mechanism of RNA silencing. These results indicate that estradiol may modulate microRNA biogenesis.¹²

Another important work explored the steroidal regulation of the microRNA biogenesis machinery components *in vivo*, using mouse uterus. In this study, estradiol and progesterone effects on Drosha, DGCR8, Exportin 5 and Dicer expression were evaluated. The authors described that estradiol and pro-

gesterone increased Exportin 5 messenger RNA expression, while only progesterone increased Dicer messenger RNA expression. They also observed the corresponding increment at protein level, in both genes.¹³ To determine if the detected induction on Exportin 5 and Dicer expression were associated with microRNA processing, authors evaluated microRNA-451 expression, which they had previously described as an inducible microRNA by estradiol in uterine tissue.¹⁴ They observed that microRNA-451 expression was increased by both hormones at the same treatment times where the induction of Exportin 5 and Dicer was detected. Therefore the authors suggest that their findings represent an additional mechanism by which steroid hormones may increase microRNAs processing.¹³ The general findings from the mentioned studies are summarized in table 1.

Either DDX5 or DDX17 RNA helicases are also components of microRNA biogenesis, forming part of microprocessor complex.¹⁵ It has been described that DDX5 is a multifunctional protein that interacts with other proteins as SMADs (the signal transducers of the TGF- β family of signaling pathways) and the tumor suppressor p53. In addition, DDX5 functions as a co-activator of several nuclear receptors as estrogen receptor α , androgen receptor and the vitamin D receptor.¹⁶ Both DDX5 and DDX17 associate with estrogen receptor α upon estradiol stimulation.¹⁷ That information indicates that both RNA helicases participate in the cell response upon hormonal stimulus and rise the question about if DDX5 and DDX17 could be target of hormones. At present, GRTH/DDX25 RNA helicase, which is essential for spermatogenesis, is the only RNA helicase known to be hormonally regulated.¹⁸

In general, the genomic effects exerted by hormones implicate the participation of specific nuclear receptors that regulate the transcription of target genes. The information presented in this brief re-

view shows that steroid hormones modify both protein coding genes and microRNA coding genes. Several works indicate that steroid hormones regulate microRNA expression through nuclear receptor mediated pathways. However, other possibility implicates that some of the microRNA biogenesis machinery components have hormonal response elements in specific genomic regions (as the gene promoter) and an induction in their expression may contribute to an induction in microRNA processing. It is clear that the precise mechanism by which steroid hormones regulate microRNA expression is not completely defined.

microRNA biogenesis alterations in cancer

A fundamental finding in cancer biology has been the observation of microRNA deregulation in human tumors compared with normal tissue.^{19,20} Later studies demonstrated the accumulation of pri-microRNAs in cancer cells, which indicate an alteration in the microRNA biogenesis pathway.²¹ The evidence that supports this observation was the abnormalities in the copy number of Dicer, Exportin 5 and Argonaute 2 genes described in breast and ovarian cancer, as well as in melanoma.^{22,23} Furthermore, the reduction on microRNA biogenesis components expression has been associated with bad prognosis in hepatocellular carcinoma.²⁴ A key study in this context demonstrated that the depletion of Drosha, DGCR8 or Dicer drastically promoted tumor formation and invasion.²⁵ As previously mentioned, Dicer ribonuclease is a key component of the microRNA biogenesis machinery. Interestingly, a low Dicer expression has been described in several tumors and has been related to bad prognosis in patients.²⁶⁻²⁸ Moreover, the downregulation of Dicer expression has been associated with metastasis.²⁹

DDX5 and DDX17 RNA helicases are multifunctional proteins, ubiquitously expressed in tissues, which participate in transcription, RNA processing and microRNA biogenesis. Studies performed in cell lines have linked both helicases with cell proliferation and differentiation, however the precise roles of DDX5 and DDX17 in those cellular processes remains unclear.³⁰ Altered expression and/or function of both RNA helicases has been related with cancer progression.

Indeed, some studies indicate that DDX5 and DDX17 induce cell proliferation and may be oncogenic; however there are other works that indicate the opposite, showing both DDX5 and DDX17 as tu-

mor suppressors with inhibitory actions on cell proliferation. Even when those data appear to be contradictory, is important to point out that the precise function of both helicases may depend on tumor cell type and the expression of other proteins which interact with DDX5 and DDX17.^{30,31} Reports that associate cancer progression with alterations on microRNA biogenesis machinery components represent valuable information to propose those genes, and their proteins, as potential cancer biomarkers and also as therapeutic targets.³²⁻³⁴ Finally, as previously mentioned, some microRNA biogenesis pathways does not require canonical components as DGCR8, Exportin 5, Dicer or Argonaute 2 which adds a new level of complexity to cancer research.³⁵ Probably, future studies will reveal the role of those microRNAs in human cancer and contribute to understand the regulation of their biogenesis in cells.

CONCLUSIONS

The regulation of the microRNA biogenesis machinery is an emerging field of study that suggests a complex process in which many cellular factors participate. A recent body of experimental evidence shows that steroid hormones may increase microRNA maturation by stimulating the biosynthesis of some key components of microRNAs biogenesis machinery. A better understanding on how microRNA biogenesis is regulated will help to define its role in human diseases as cancer and also to design novel strategies to modify microRNAs expression for therapeutic purposes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We want to thank Dr. Diego Arenas Aranda and Dr. Emilio Rojas del Castillo for critical review of the manuscript. We also thank Dra. Claudia Dolores Pérez Ortega for review the English version of the manuscript.

REFERENCES

1. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 2004; 116: 281-97.
2. Carthew R, Sontheimer E. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009; 136: 642-55.
3. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-54.
4. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Ruvkun AE, Horvitz HR, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403: 901-6.

5. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136: 215-33.
6. Finnegan EF, Pasquinelli AE. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2013; 48: 51-68.
7. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19(1): 92-105.
8. Peterson SM, Thompson JA, Ufkin ML, Sathyanarayana P, Liaw L, Bates-Congdon C. Common features of microRNA target prediction tools. *Front Genet* 2014; 5: 1-10.
9. Xie M, Steitz JA. Versatile microRNA biogenesis in animals and their viruses. *RNA Biology* 2014; 11(6): 1-9.
10. Klinge CM. miRNAs and estrogen action. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23(5): 223-33.
11. Wang WL, Chatterjee N, Chittur SV, Welsh J, Tenniswood MP. Effects of 1 α ,25 dihydroxyvitamin D3 and testosterone on miRNA and mRNA expression in LNCaP cells. *Mol Cancer* 2011; 10: 58.
12. Bhat-Nakshatri P, Wang G, Collins NR, Thomson MJ, Geistlinger TR, Carroll JS, Brown M, et al. Estradiol-regulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(14): 4850-61.
13. Nothnack WB, Healy C, Hong X. Steroidal regulation of uterine miRNAs is associated with modulation of the miRNA biogenesis components Exportin-5 and Dicer1. *Endocr* 2010; 37: 265-73.
14. Nothnack WB. Regulation of uterine matrix metalloproteinase-9 and the role of microRNAs. *Semin Reprod Med* 2008; 26(6): 404-9.
15. Fukuda T, Yamagata K, Fujiyama S, Matsumoto T, Koshida I, Yoshimura K, Mihara M, et al. DEAD-box RNA helicase subunits of the Droscha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 604-11.
16. Wagner M, Bid R, Maier CJ, Maier RH, Laimer M, Hintner H, Baner JW, Onder K. DDX5 is a multifunctional co-activator of steroid hormone receptors. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 361(1-2): 80-91.
17. Yamagata K, Fujiyama S, Ito S, Ueda T, Murata T, Naitou M, Takeyama K, et al. Maturation of microRNA is hormonally regulated by a nuclear receptor. *Mol Cell* 2009; 36(2): 340-7.
18. Tsai-Morris CH, Sheng Y, Gutti RK, Tang PZ, Dufan ML. Gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25): a multifunctional protein essential for spermatogenesis. *J Androl* 2010; 31(1): 45-52.
19. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435(7043): 834-8.
20. Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Mol Oncol* 2012; 6(6): 590-610.
21. Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev* 2006; 20(16): 2202-7.
22. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(24): 9136-41.
23. Kim MS, Oh JE, Kim YR, Park SW, Kang MR, Kim SS, Ahn CH, et al. Somatic mutations and losses of expression of microRNA regulation-related genes AGO2 and TNRC6A in gastric and colorectal cancers. *J Pathol* 2010; 221(2): 139-46.
24. Kitagawa N, Ojima H, Shirakihara T, Shimizu H, Kokubo A, Urushidate T, Totoki Y, et al. Downregulation of the microRNA biogenesis components and its association with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2013; 104(5): 543-51.
25. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 2007; 39(5): 673-7.
26. Merritt WM, Lin YG, Han LY, Kamar AA, Spannath WA, Schmandt R, Urbaner D, et al. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med* 2008; 359(25): 2641-50.
27. Guo X, Liso Q, Chen P, Li X, Xiong W, Ma J, Li X, et al. The microRNA-processing enzymes: Drosha and Dicer can predict prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138(1): 49-56.
28. He L, Wang HY, Zhang L, Huang L, Li JD, Xiong Y, Zhang MY, et al. Prognostic significance of low DICER expression regulated by miR-130a in cervical cancer. *Cell Death Dis* 2014; 1(5): e1205.
29. Martello G, Rosato A, Ferraro F, Manfrin A, Cordenonzi M, Dupont S, Enzo E, et al. A microRNA targeting Dicer for metastasis control. *Cell* 2010; 141(7): 1195-207.
30. Fuller-Pace F, Moore H. RNA helicases p68 and p72: multifunctional proteins with important implications for cancer development. *Future Oncology* 2011; 7(2): 239-51.
31. Paris O, Ferraro L, Grober OM, Ravo M, De Filippo MR, Giustini G, Navas G, Tacalla R, et al. Dicer1 regulation of microRNA biogenesis and expression by estrogen receptor beta in hormone-responsive breast cancer. *Oncogene* 2012; 31(38): 4196-206.
32. van Kouwenhove M, Kedde M, Agami R. MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(9): 644-56.
33. Diaz-Garcia CV, Agudo-López A, Pérez C, López-Martín JA, Rodríguez-Peralto JL, de Castro J, Cortijo A, et al. DICER1, DROSHA and miRNAs in patients with non-small cell lung cancer: implications for outcomes and histologic classification. *Carcinogenesis* 2013; 34(5): 1031-8.
34. De Santa F, Iouze I, Del Rio A, Fazi F. microRNA Biogenesis Pathway as a Therapeutic Target for Human Disease and Cancer. *Curr Pharm Des* 2013; 19(4): 743-64.
35. Havens MA, Reich AA, Dnelli DM, Hastings ML. Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(10): 4626-40.

Reimpresos:

Ramiro José González-Duarte

Departamento de Biología de la Reproducción
 Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
 Salvador Zubirán
 Vasco de Quiroga, Núm. 15
 14000, México, D.F.
 Tel.: 52 (55) 5487-0900, Ext. 2418
 Correo electrónico: ramiron2@yahoo.com.mx

Recibido el 09 de junio 2014.
 Aceptado el 17 de septiembre 2014.

Una vitamina que no es

La molécula que evita el raquitismo podría también protegernos de ciertos tipos de cáncer.

A finales del siglo XIX una enfermedad que en la antigüedad era poco común adquirió proporciones de epidemia en Europa; en Inglaterra llegó a ser tan grave que se le conocía como la “enfermedad inglesa”. Se trataba del raquitismo, que puede afectar a los niños en etapa de crecimiento desde una edad muy temprana. Los bebés con este padecimiento tienen huesos débiles y blandos como cartílagos, que les dificultan sentarse, gatear y por supuesto empezar a caminar; en los niños se observan piernas arqueadas y proyección del esternón hacia adelante (“pecho de paloma”). Además, en casos graves, pueden sufrir espasmos dolorosos en las manos, los pies y la laringe; si no se atiende, esta condición puede llevar a la muerte. En los adultos hay un padecimiento similar llamado osteomalacia que se caracteriza por dolor, a veces agudo, en los huesos de la pelvis, en la parte baja de la espalda y en las piernas. La prevención del raquitismo y la osteomalacia es muy sencilla: exponer moderadamente la piel al Sol (de ahí que los pediatras recomienden dar baños de Sol a los bebés y a los niños diariamente

Vitamina D3,
colecalfiferol.

vitamina

Ramiro José González Duarte

por unos minutos). ¿Por qué entonces el raquitismo asoló Europa?

La revolución industrial europea ocasionó que una gran cantidad de personas dedicadas a la actividad agrícola cambiaran su estilo de vida emigrando a las ciudades. La densa nube de humo negro producida por las fábricas que trabajaban con carbón, provocó que en las ciudades hubiera mucho menos Sol; aunado a esto, adultos y niños empezaron a trabajar largas jornadas, de la mañana a la noche, en recintos cerrados. Todo esto acompañado por el hecho de que en el norte de Europa el Sol “brilla por su ausencia” una parte considerable del año.

El camino a un hallazgo

En 1822 el médico polaco Jędrzej Śniadecki observó que en los ambientes conta-

UN BUEN BAÑO DE SOL

El 90% de la vitamina D que nuestro cuerpo requiere puede producirse en la piel ante la exposición a la luz solar, por lo tanto es importante salir a que nos dé el Sol. Sin embargo, el riesgo de padecer cáncer de piel por exposiciones constantes y prolongadas a la luz solar implica que debemos hacerlo con moderación. Se considera que periodos de exposición de cinco a 10 minutos al día (abarcando brazos y piernas) entre las 10 a.m. y la 3:00 p.m. son apropiados para satisfacer los requerimientos de vitamina D en la mayoría de las personas.

Es importante proteger la cara ya que es la parte del cuerpo más frecuentemente expuesta al Sol aunque sólo representa del cinco al 9% de la superficie corporal total. El uso de bloqueadores UV nos protege contra las quemaduras solares y el cáncer de piel, pero también disminuye la síntesis de la vitamina D, por lo cual se recomienda para exposiciones al Sol más prolongadas.

minados y las viviendas sombrías de Varsovia había muchos niños con raquitismo, mientras que en las zonas rurales y a las afueras de la ciudad, no. Él asoció el problema con la falta de exposición al Sol, pero sus recomendaciones fueron desatendidas y olvidadas por mucho tiempo. En 1919 el pediatra alemán Kurt Huldshinsky demostró claramente que la exposición de la piel a la radiación ultravioleta curaba el raquitismo. Utilizando luz ultravioleta generada por una lámpara eléctrica de mercurio, Huldshinsky curaba a los niños. Dos

años más tarde, los investigadores Alfred Hess y Lester Unger realizaron un estudio donde pusieron a un grupo de niños raquícticos a tomar sol en la azotea de un hospital de la ciudad de Nueva York, y demostraron que la luz solar curaba el raquitismo en cuatro meses.

Por otro lado, el médico inglés Sir Edward Mellanby consideró que la deficiencia dietética era la causa del raquitismo. En 1918 realizó experimentos con perros a los que alimentaba exclusivamente con avena (un alimento básico en la Escocia de ese tiempo). Pero, sin proponérselo, mantuvo a los animales en espacios interiores durante el experimento y les provocó raquitismo. Mellanby utilizó aceite de hígado de bacalao para dárselo a los perros de su experimento y según él logró curarles la enfermedad sólo con el aceite. Atribuyó



Obtenemos el 90% de la vitamina D que requerimos con sólo 10 minutos de exposición al Sol. (Olivos con cielo amarillo y Sol, Vincent van Gogh, 1889).



El pescado contiene vitamina D en forma natural. (Naturaleza muerta con macarelas, limones y tomates, Vincent van Gogh, 1886).

la cura a la vitamina A (la primera en conocerse) que había sido identificada en ese aceite. Posteriormente el bioquímico Elmer McCollum retomó la información recabada por Mellanby y demostró que en el aceite de hígado de bacalao había otro nutrimento distinto de la vitamina A, responsable de curar el raquitismo. Siguiendo la designación de las vitaminas en orden alfabético, y como recientemente se habían nombrado las vitaminas B y C, nombró al nuevo compuesto químico, vitamina D.

En ese tiempo ya se sabía algo de la función en el organismo de la vitamina D pero aún no se conocía su identidad. El gran químico alemán Adolf Windaus logró en 1928 aislar tres formas de vitamina D: dos derivadas de plantas, que denominó como D₁ y D₂, y una derivada

VITAMINA D Y DIETA

El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán recomienda para la población mexicana una ingesta diaria de vitamina D de:

- 10 microgramos en niños de 7 a 12 meses.
- 5 microgramos en niños mayores de 1 año y en adultos menores de 50 años.
- 10 microgramos en adultos de 50 a 70 años.
- 15 microgramos en adultos mayores de 70 años.

Los alimentos que contienen vitamina D en forma natural son los pescados como el atún, el salmón y la sardina, y en menor proporción el huevo y las setas. Los lácteos son los principales alimentos que se enriquecen o fortifican con esta vitamina.

ALIMENTO	PORCIÓN	CONTENIDO DE VITAMINA D (MICROGRAMOS)
Sardinas enlatadas	100 g	7.5
Aceite de hígado de bacalao	1 cucharadita	10.0
Yema de huevo	1 yema	0.5
Leche fortificada	236 mL (un vaso)	2.5

de piel animal, denominada D_3 . Ocho años después logró deducir la estructura química de la vitamina D_3 , ahora conocida como colecalciferol. Este conocimiento permitió sintetizar la vitamina D_3 en grandes cantidades, suplementar alimentos y combatir el raquitismo con mayor eficiencia.

Que la vitamina D_3 se encontrara en la piel de animales (primero se halló en cerdos y ratas, después en humanos) implicaba que el organismo de éstos podía producirla; las observaciones sobre el raquitismo y los experimentos de Windaus y otros científicos permitieron saber que esa producción de vitamina D ocurría en la piel cuando era expuesta a la luz del Sol. Pero si el organismo puede producirla, entonces ya no es una vitamina; recordemos que una vitamina se define como una sustancia que el organismo requiere pero no puede producir en cantidades suficientes y por lo tanto debe obtenerla de los alimentos. Entonces ¿qué es esta sustancia que seguimos llamando vitamina D?

Molécula reguladora

Gracias al arduo trabajo de los científicos, y al desarrollo y aplicación de nuevas técnicas experimentales, ahora sabemos que la vitamina D es el principal regulador de los niveles de calcio en el organismo y es particularmente importante en el desarrollo del esqueleto y en la minerali-

zación de los huesos. También sabemos que debe ser modificada químicamente en el organismo para realizar su importante función. La vitamina D_3 o colecalciferol es primero transformada en el hígado y se genera un nuevo compuesto (25-hidroxicolecalciferol) que luego es modificado en los riñones y se produce finalmente el 1,25-dihidroxicolecalciferol, también conocido como *calcitriol*, la forma activa de la vitamina D_3 . El calcitriol es una

hormona y su función es regular el metabolismo del calcio.

Las hormonas son moléculas que produce el organismo y sirven para regular muchos procesos vitales como el mantenimiento del volumen y la presión sanguíneos, la diferenciación sexual y la reproducción. Una característica importante de las hormonas es que se producen

en un sitio del organismo y son transportadas en la sangre a otro sitio en donde actúan como flechas que dan en el blanco. El calcitriol generado en los riñones viaja por la sangre y actúa en células del intestino para favorecer la absorción del calcio.

Los efectos biológicos de las hormonas dependen de la unión con una molécula denominada receptor que está en las células del organismo. Cada receptor tiene una forma que le permite unirse específicamente a la hormona que le corresponde, como una llave a su cerradura. Debido a esto las células responden a cantidades de hormonas sumamente pequeñas. El receptor de calcitriol se conoce como receptor a vitamina D (RVD) y se considera que la mayoría de los efectos biológicos de esta hormona están mediados por la acción del RVD.

Existe una rara enfermedad hereditaria en la que los individuos tienen alterado el RVD y presentan un raquitismo grave, niveles de calcio anormalmente bajos y en algunos casos alopecia (ausencia de cabello) parcial o total. La razón de la alopecia aún se desconoce pero nos da una



Hoy en día, muchos alimentos lácteos están fortificados con vitamina D. (Naturaleza muerta con cafetera, loza y frutas, Vincent van Gogh, 1888).

pista de que el RVD participa en más procesos fisiológicos y no sólo en los relacionados con el metabolismo del calcio.

Bondades del calcitriol

El calcitriol mantiene los niveles de calcio y de fósforo en el organismo, lo que sustenta la mineralización de los huesos y otros procesos vitales como el funcionamiento del sistema nervioso y de los músculos. Por ejemplo, si una persona tiene muy poco calcio en la sangre, sus células nerviosas y musculares se ven afectadas y pueden presentarse convulsiones.

El RVD se ha detectado en prácticamente todos los tejidos del cuerpo y no sólo en el intestino y los huesos. Esto implicaría que el papel de la vitamina D es mucho más amplio de lo que se pensó al principio. Ya hay evidencia experimental y clínica de la participación del calcitriol y su receptor en el funcionamiento cardiovascular, en la producción de insulina y en la respuesta inmunológica. Como se trata de procesos muy diversos, ha crecido el interés en el estudio de esta hormona.

En nuestro país hay un grupo de investigación en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, dirigido por el Dr. Fernando Larrera, que se ha dedicado al estudio de la vitamina D y sus implicaciones en la preeclampsia, el cáncer y la respuesta inmune. En el año 2000 se publicó un trabajo en la revista *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* donde estos investigadores compararon los niveles sanguíneos

de calcitriol de mujeres embarazadas sanas con los de mujeres embarazadas con preeclampsia (hipertensión en la madre) y observaron que aquéllas con el padecimiento tenían una deficiencia de vitamina D. Lo anterior sugiere que el mantenimiento de los niveles fisiológicos de vitamina D es un factor importante para la prevención de esa peligrosa enfermedad.

Diversos estudios epidemiológicos han revelado que la deficiencia de vitamina D está asociada, además, con el riesgo de padecer cáncer de colon. Uno de los trabajos fundamentales sobre este tema fue publicado en 1980 en la revista *International Journal of Epidemiology* por Cedric Garland y Frank Garland, del Departamento de Epidemiología de la Universidad Johns Hopkins, en Estados Unidos. Ellos analizaron la distribución geográfica de las muertes por cáncer de colon en ese país y descubrieron que en las regiones del noreste, donde la población está poco expuesta a la luz del Sol, había una mayor tasa de mortalidad en comparación con las regiones del sur y del oeste, donde la gente está más expuesta a la radiación solar. Concluyeron que la exposición al Sol podía reducir el riesgo de cáncer de colon.

A raíz del hallazgo anterior, se han realizado múltiples estudios de laboratorio que muestran que el calcitriol tiene propiedades anticancerígenas. De particular importancia son los trabajos de Donald L. Trump y su grupo de investigación en el Instituto de Cáncer Roswell Park, en Estados Unidos. Ellos llevan más de una década evaluando los efectos anticancerígenos del calcitriol y han encontrado que cuando éste se combina con algunos medicamentos utilizados contra el cáncer (en la quimioterapia), el efecto de dichos fármacos aumenta. Actualmente se están desarrollando varios estudios clínicos para determinar si un nuevo tratamiento, que demostró ser seguro en animales, también



La vitamina D se produce en la piel cuando es expuesta a la luz del Sol. (*Sauces a la puesta del Sol*, Vincent van Gogh, 1888).

puede administrarse a los humanos. Los pacientes que participan en este tipo de estudios clínicos, denominados de fase 1, reciben una dosis del medicamento que se va aumentando gradualmente; con esto se puede encontrar la dosis que da los mejores resultados sin producir efectos secundarios graves.

Uno de los factores que limitan el uso del calcitriol en la terapia contra el cáncer es que se requieren dosis altas y éstas pueden provocar hipercalcemia, es decir, exceso de calcio en la sangre, lo que afecta el funcionamiento de los riñones y del corazón. Esto podría solucionarse con los deltanoïdes, moléculas diseñadas y producidas en laboratorio que son químicamente similares al calcitriol pero con algunas modificaciones en su estructura molecular que las hacen actuar de manera distinta. Lo que se busca con ellas es que tengan un efecto anticancerígeno como el del calcitriol pero sin producir hipercalcemia. Ya se han producido miles de deltanoïdes, pero se requieren más estudios de laboratorio y clínicos para garantizar su eficacia y seguridad en la administración a los pacientes con cáncer. 🐼

Agradecemos al Dr. Ali Halhali del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán la revisión de este artículo.

Ramiro José González Duarte es estudiante del Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM. Es coautor del libro *Ciencia y ficción*, editado por la Unidad de Difusión y Extensión del Campus Morelos de la UNAM.

MÁS INFORMACIÓN

- Latham, M. (2002). "Raquitismo y osteomalacia". Depósito de documentos de la FAO: *Nutrición humana en el mundo en desarrollo*, en: www.fao.org/DOCREP/006/W0073S/w0073s0m.htm#bm22x
- Conlan, R. y Sherman, E. (2000). "El enigma de la vitamina D. Más allá del descubrimiento: El sendero desde la investigación hacia el beneficio de la humanidad", en: www7.nationalacademies.org/spanishbeyonddiscovery/bio_008721.html#TopOfPage

Artículo aceptado en: Molecular and Cellular Biochemistry, ISSN: 0300-8177, Impact Factor (2014): 2.393, First online: 28 August 2015, <http://link.springer.com/journal/11010>

The expression of RNA helicase DDX5 is transcriptionally upregulated by calcitriol through a vitamin D response element in the proximal promoter in SiHa cervical cells

Ramiro José González-Duarte^{1,3}, Verna Cázares-Ordoñez^{1,3}, Lorenza Díaz¹, Víctor Ortíz², Fernando Larrea¹, Euclides Avila^{1,*}

¹Departments of Reproductive Biology and ²Physiology of Nutrition, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga # 15, Col. Sección XVI, México, D.F. 14080, Mexico; ³School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Interior, Ciudad Universitaria, Av. Universidad # 3000, México, D.F. 04510, Mexico.

*Corresponding author: Euclides Avila, PhD, Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga # 15, Col. Sección XVI, México, D.F. 14080, México. Tel. (52) 5487 0900 ext 2418; E-mail: euclides.avilac@incmnsz.mx

Abstract

The DEAD box RNA helicase DDX5 is a multifunctional protein involved in the regulatory events of gene expression. Herein, we presented evidence indicating that DDX5 is transcriptionally upregulated by calcitriol, the hormonal form of vitamin D₃. *In silico* analysis revealed the presence of two putative vitamin D response elements (VDREs) in the DDX5 promoter region. By using luciferase reporter assays, we demonstrated that the DDX5 promoter containing these putative VDREs significantly increased the luciferase activity in vitamin D receptor (VDR)-positive SiHa cells upon calcitriol treatment. Electrophoretic mobility shift assays showed the ability of VDR and retinoid X receptor to interact only with the most proximal VDRE, while chromatin immunoprecipitation analysis confirmed the occupancy of this VDRE by the VDR. Finally, we demonstrated that calcitriol significantly increased both DDX5 mRNA and protein in SiHa cells. In summary, this study shows that DDX5 gene is transcriptionally upregulated by calcitriol through a VDRE located in its proximal promoter. Given the importance of DDX5 as a master regulator of differentiation programs, our study suggests that the pro-differentiating properties of calcitriol may be related with the induction of DDX5.

Keywords

Vitamin D, RNA helicase, nuclear receptor, VDR, cervical cancer

1. Introduction

The ATP-dependent RNA helicases containing the DEAD motif (Asp-Glu-Ala-Asp) play fundamental roles in cellular processes involving the folding dynamics of RNA structures. Among these proteins, DDX5, and its highly related paralog DDX17, have emerged as essential factors in all steps of gene expression [1]. Indeed, it has been demonstrated that DDX5 is a coactivator for several transcription factors including the vitamin D receptor (VDR) [2-9]. Furthermore, DDX5 plays a pivotal role in RNA processing at the level of splicing, transport and translation [10-14]. In addition, by interacting with the ribonuclease Drosha and the RNA-binding protein DGCR8 in the microprocessor complex, DDX5 and DDX17 act as regulators of microRNA biogenesis [1].

Calcitriol or 1,25-dihydroxyvitamin D₃, is the natural activator of the VDR, a nuclear receptor involved in a diverse array of biological processes including cell proliferation and differentiation. Once liganded with calcitriol, VDR associates with the retinoid X receptor (RXR) and the heterodimer recognizes specific sequences termed vitamin D response elements (VDREs). By using this general mechanism, the activated VDR directly modifies the expression of calcitriol-target genes [15]. Furthermore, calcitriol can indirectly affect gene expression programs acting through intermediate molecules such as microRNAs [16]. In fact, we have recently described that calcitriol modifies the microRNA signature in SiHa cervical cancer cells [17]. Importantly, in that study we also demonstrated that calcitriol increased the mRNA and protein levels of Dicer, one of the essential ribonucleases in microRNA maturation [17]. Herein, we present experimental evidence supporting that DDX5, a nuclear component of microprocessor complex, is also a target gene for calcitriol in SiHa cervical cells.

2. Materials and methods

2.1 Cell culture

VDR-positive SiHa and VDR-negative C33-A cervical cells [18, 19] were purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, USA). Cells were cultured for 24 h prior calcitriol treatment in DMEM supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin under standard culture conditions. Cells were incubated in the presence of different concentrations of calcitriol (0.01 µM, 0.1 µM and 1.0 µM) or 0.1% ethanol as vehicle in DMEM supplemented with charcoal-treated FBS for the indicated times.

2.2 Construction of the luciferase reporter plasmid with DDX5 promoter

A luciferase reporter plasmid bearing an 860 bp fragment of the human DDX5 gene proximal promoter was constructed taking into account the sequence reported by Rossler *et al* [20]. This DNA fragment was amplified by PCR using as a template human genomic DNA purified from peripheral blood mononuclear cells from a healthy male donor. For this, the following primers were used: 5'-ATTCTCGAGGCCTGCCATGTTTC-3' (forward) and 5'-TTCTCGAGGACACCAGCCGAAG-3' (reverse) [20]. The PCR product was cloned into the XhoI site in the pGL4.10 reporter vector (Promega, Madison, USA), upstream of the firefly luciferase gene, to obtain the DDX5 promoter-luciferase plasmid. The resulting construct was confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing analysis.

2.3 Transient transfection and dual-luciferase reporter gene assays

SiHa or C33-A cells were seeded in 6-well plates 1 day prior to transfection and then transfected with FuGENE HD reagent (Promega). One microgram of the DDX5 promoter-luciferase plasmid was used for transfection in each well (during 24 h) and the *Renilla* luciferase plasmid was used as internal control for normalization. After the transfection procedure, cells were treated with calcitriol (1 µM) or ethanol (0.1% as vehicle) in DMEM supplemented with 5% charcoal-treated FBS during 24 h. The cells were lysed with 1 X passive lysis buffer, harvested and analyzed using a dual-luciferase reporter system according to the manufacturer's guidelines (Promega).

2.4 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

EMSAs were performed as previously described [19]. Table 1 shows the complementary oligonucleotides (for double-stranded DNA probes) obtained from Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, USA). EMSAs were performed with ³²P end-labeled probes containing a consensus VDRE DR4-type as a positive control, the putative VDREs in the human DDX5 gene proximal promoter or mutant forms of both VDREs. Five micrograms of SiHa nuclear extracts, 17.5 fmol of each labeled probe and 2 micrograms of poly(dI-dC)

were added per reaction. For supershift assays, samples were incubated during at least 30 min with 3 µg of specific antibodies against VDR or RXR before the incubation of the labeled probes with nuclear extracts. The antibodies against VDR (sc-13133 X), RXR (sc-774 X) and a nonspecific mouse IgG (sc-2025) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA). For competition studies, a 100-fold excess of unlabeled double-stranded probe was added as a specific competitor in each reaction. The DNA-protein complexes were resolved on 4% non-denaturing polyacrylamide gels and visualized by autoradiography.

2.5 Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP)

Confluent SiHa and C33-A cells incubated with 0.1 µM calcitriol or ethanol as vehicle for 3 h were used for ChIP as previously described [19]. Immunoprecipitation was performed using an antibody against the VDR or nonspecific mouse IgG. After recovery and purification of the DNA, PCR analysis was performed using primer pairs designed to amplify each VDRE located in the proximal promoter region of the DDX5 gene [21]. The following primers were used: 5'-CGGGGCGATTAGGTCATAGA-3' and 5'-GAGGAAGGACACCGATGACA-3' to amplify 157 bp encompassing the VDRE-1; and 5'-TGCTTGAGGTGTGGAAAGAC-3' and 5'-CGCTCTATGACCTAATCGCC-3' that span the VDRE-2 sequence to obtain a 183 bp PCR product. PCR was performed as follows: 95 °C for 2 min, 30 cycles at 95 °C for 1 min, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s and a final extension at 72 °C for 30 s. PCR products were analyzed in 2 % agarose gels.

2.6 Reverse transcription and real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR)

RT-qPCR assays were carried out as previously described [18]. Briefly, total RNA was used for cDNA synthesis (performed for 90 min at 42°C) and qPCR was performed using the TaqMan Master System and specific probes from the Universal ProbeLibrary set for human (Roche, Germany). The expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) reference gene was used to normalize gene expression. Primers for qPCR were designed online using the ProbeFinder Assay Design Software from Roche (<http://qpcr.probefinder.com>). The following primers were used in these experiments: DDX5 primers: 5'-GCCATGTCGGGTTATTCG-3' (forward) and 5'-GGTTTCCAAACTTCTTTCCAGA-3' (reverse); GAPDH primers: 5'-AGCCACATCGCTGAGACAC-3' (forward) and 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3' (reverse). The reference sequences were NM_004396 for DDX5 and AF261085 for GAPDH, obtained from the GenBank.

2.7 Western Blot

Western blot was performed as previously described [18]. Briefly, 20 µg of protein samples were used to detect DDX5 by SDS-PAGE and semidry electroblotting (1 h at 15 volts). The primary antibodies used were: DDX5 (sc-166167, 1:200) from Santa Cruz Biotechnology

and GAPDH (MAB374, 1:10,000) from Millipore (Billerica, USA). Blots were incubated overnight with primary antibodies and then incubated with a secondary antibody (sc-2055, 1:10,000, Santa Cruz Biotechnology) for 1 hour. GAPDH protein was used as internal control for normalization. The optical density of each protein band was quantitated using the Molecular Imager ChemiDoc XRS System and the Image Lab Software (Bio-Rad, Hercules, USA).

2.8 Statistical analysis

Each experiment was conducted at least three times. The results were expressed relative to vehicle-treated cells (mean \pm S.D.). Statistical comparisons were assessed by a 2-tailed Student's t test and differences were considered significant at $P < 0.05$.

Table 1. Oligonucleotides used in EMSAs. The putative DR4-type VDREs are underlined. The mutated nucleotides are indicated with lowercase letters.

Double-stranded probe name	Complementary sequences
VDRE (DR4-type) consensus sequence	5'- AGCTTC <u>CGGTCC</u> CACTGGTCCAGAGAGC -3' 5'- GCTCTCTGGACCAGTGTGGACCGAAGCT -3'
VDRE-1	5'- CTGCGG <u>CGTAGG</u> AGGCGGTCCAGACTAT -3' 5'- ATAGTCTGGACCGCCTCCTACGCCGAG -3'
VDRE-2	5'- GGGAGGGG <u>TGAAAGCGCGG</u> GATCCTGG -3' 5'- CCAGGATCGCCGCGCTTTCACCCCTCCC -3'
VDRE-1 mut	5'- CTGCGG <u>gacTAGG</u> AGG <u>cc</u> TCCAGACTAT -3' 5'- ATAGTCTGGAGGGCCTCCTAGTCCGCAG -3'
VDRE-2 mut	5'- GGGAGG <u>gccTGAAAGCGacGCG</u> GATCCTGG -3' 5'- CCAGGATCGCGTCGCTTTCAGGCCTCCC -3'

Results

3.1 The *DDX5* proximal promoter contains two putative VDREs

Analysis of a 860 bp genomic region encompassing the human *DDX5* proximal promoter with MatInspector (<http://www.genomatix.de>) [22] revealed the presence of two putative VDREs. The identified sequences corresponded to DR4-type VDREs and were located from -34 to -49 (VDRE-1: 5'-CGTAGGAGGCGGTCCA-3') and from -134 to -149 (VDRE-2: 5'-GGTGAAAGCGCGGCGA-3') upstream from the reported transcriptional start site of *DDX5* gene (Fig. 1a) [20]. An alignment between orthologous human, chimpanzee and mouse *DDX5* sequences using the ClustalW2 program (<http://ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) revealed that VDRE-1 was more similar between these species than VDRE-2, depicting more evolutionary variation in the latter *versus* the more evolutionary conserved VDRE-1 (Fig. 1b). A luciferase reporter plasmid bearing both VDREs of the *DDX5* promoter was transfected into VDR-positive SiHa cells and transactivation studies were performed in response to calcitriol treatment. Fig. 1c, in filled bars depicts a significant 40% increase in luciferase activity in SiHa cells incubated with calcitriol compared to cells treated only with vehicle. Interestingly, calcitriol was unable to affect luciferase activity in VDR-negative C33-A cervical cells (Fig. 1c, open bars) [19].

3.2 The most proximal VDRE in *DDX5* promoter interacts *in vitro* with VDR and RXR

EMSA were performed with both VDRE-1 and VDRE-2-*DDX5* promoter elements to determine if these sequences interact with endogenous VDR. Incubation of *DDX5* VDRE-1 with nuclear extracts from SiHa cells preincubated with calcitriol resulted in the formation of a DNA-protein complex of similar size to that formed using a consensus VDRE of DR4-type [23] used as positive control (Fig. 2a lanes 2 and 4). A mutant form of *DDX5* VDRE-1 (VDRE-1 mut) reduced the formation of the DNA-complex (Fig. 2a lane 5). A decrease in DNA-protein complex formation was also observed in experiments incubated with a 100-fold excess of unlabeled *DDX5* VDRE-1, but no effect was seen in the presence of a 100-fold excess unlabeled VDRE-1 mut, suggesting the specificity of DNA-protein interaction (Fig. 2b lanes 3 and 4). To demonstrate binding of VDR/RXR heterodimer to the VDREs sequences, we carried out EMSAs in the presence of antibodies against these transcription factors. Fig. 2a,c depict a reduction in the intensity of DNA-complexes when anti-VDR or anti-RXR antibodies were used, alone or in combination, suggesting that both nuclear receptors form part of the complexes (Fig. 2a lanes 3 and 6 and Fig. 2c lanes 3, 4, 6, 7 and 9). On the other hand, the use of mouse IgG, as negative control, did not affect the complex formation (Fig. 2a lane 7 and Fig. 2c lane 8). Interestingly, the *DDX5* VDRE-2 did not form DNA-protein complexes with SiHa nuclear extracts (Fig. 2a lanes 8 and 10).

3.3 The VDR is recruited in vivo to the most proximal VDRE in DDX5 promoter

ChIP assays were carried out to investigate if VDR is recruited to DDX5 VDRE-1 in the cells. Thus, SiHa cells were incubated in the presence or absence of calcitriol. Fig. 3a shows a 157 bp PCR product in immunoprecipitates with the VDR antibody in SiHa cells treated only with calcitriol but not in cells incubated in the presence of vehicle or the non-specific IgG. In contrast, this PCR product was not detected in C33-A cells incubated with calcitriol and immunoprecipitated with the antibody against VDR (Fig. 3c). The input DNA controls amplified the appropriate product, validating the PCR in this cell line (Fig. 3c). As expected from EMSA results, the VDR antibody failed to immunoprecipitate a region of DDX5 promoter containing the VDRE-2, whereas the respective input controls showed the expected 183 bp PCR product (Fig. 3b).

3.4 DDX5 gene expression is stimulated by calcitriol in SiHa cervical cells

We investigated if the observed effect of calcitriol upon the DDX5 promoter correlates with changes in DDX5 gene expression. For this, SiHa cells were incubated during different periods of time with calcitriol or its vehicle, and DDX5 and GAPDH mRNA levels were analyzed by RT-qPCR. Fig. 4a depicts the time-course of DDX5 mRNA expression and shows a significant increase of approximately 30% in DDX5 mRNA after 3 h of treatment in the presence of calcitriol. Fig. 4b shows that 1 μ M calcitriol was the unique effective concentration to significantly upregulate DDX5 mRNA in SiHa cells. Western blot analysis demonstrated that calcitriol increased 30% the immunoreactive DDX5 in SiHa cells incubated with the hormone during 5 h (Fig. 4c).

3. Discussion

The RNA helicase DDX5 is involved in essential processes in mammals such as embryogenesis and cellular growth [24]. Recent observations have connected this helicase with the pleiotropic actions of calcitriol. In fact, DDX5 is a coactivator for the VDR-calcitriol complex [5]. Herein, we demonstrated the ability of calcitriol to induce the expression of DDX5 in SiHa cervical cancer cells. In a previous report we showed that SiHa cervical cells express a functional VDR and are growth-inhibited by calcitriol [18]. On the other hand, we also demonstrated that C33-A cervical cells are refractory to calcitriol actions because they do not express the VDR [19]. In this work, transactivation studies using both cell lines and a calcitriol-driven-luciferase reporter containing the DDX5 promoter region described by Rössler [18] suggested that the inductive effect of calcitriol upon DDX5 gene expression requires the VDR. Furthermore, the induction of DDX5 mRNA was seen in SiHa cells incubated during 3 h with calcitriol. The short time in which the induction occurs suggests that DDX5 gene promoter contains *cis* acting elements, which directly interact with activated VDR. Our bioinformatical data, together with the results from EMSA and ChIP assays supported this hypothesis. Indeed, a pair of putative DR4-type VDREs was found in the DDX5 proximal promoter. The results obtained from EMSA and ChIP assays revealed that only the VDRE located in the vicinity of the DDX5 transcriptional start site is functional. Indeed, this evolutionarily conserved among human, mouse and chimpanzee VDRE-1 showed to be able to interact with VDR and RXR *in vitro*. Most important, this VDRE-1 recruits the VDR in the presence of calcitriol *in vivo*. These observations agreed with the canonical mechanism of transcriptional regulation by VDR activated with calcitriol, in which the heterodimer VDR-RXR recruits coactivators and transcriptional modulators into the DDX5 promoter region (see model in Fig. 5) [15]. The fact that VDRE-1 is functional and evolutionary conserved suggests that it may play an important role in the regulation of DDX5 gene expression. The effects of calcitriol on DDX5 expression might be of relevance considering the critical role of this RNA helicase as a master regulator of cell differentiation at the level of transcription, splicing, RNA transport, decay, ribosome assembly and microRNA maturation. In this regard, the combined induction of DDX5 and Dicer by calcitriol may be involved in the overall changes on microRNA expression observed previously in calcitriol-treated SiHa cells [17]. On the other hand, it has been reported that DDX5 activity is also modulated by several posttranslational modifications including SUMOylation, phosphorylation and acetylation [25-28]. In addition, interactions with other proteins are reported to regulate the localization and function of DDX5 [29].

Although it has been reported that the DDX5 expression is growth- and developmentally regulated, little is known about the factors mediating this process [24, 30]. There are multiple reports showing DDX5 differential expression in a variety of cancer cells suggesting that DDX5 expression may be important in tumorigenesis (reviewed in [1]). On the other hand, it has been described that DDX5 controls its own expression, including that

of its paralog DDX17 by a mechanism involving the activation of non-sense-mediated mRNA decay machinery [31]. Given that DDX5 is a coactivator for the VDR-calcitriol complex [5], the results in this study also suggest that DDX5 might control its own expression in cervical cells by interacting with the calcitriol-VDR-RXR complex in the VDRE-1 located in its promoter as suggested in Fig. 5; which deserves to be further investigated.

Several mitogens for keratinocyte lineage such as serum, keratinocyte growth factor, epidermal growth factor, transforming growth factor- α , together with pro-inflammatory cytokines such as interleukin 1 β , tumor necrosis factor α and interferon γ are inducers of DDX5 expression during skin repair [24, 32]. Interestingly, some of these factors are also inducers of the calcitriol-activating enzyme CYP27B1 and the VDR in vascular tissue and skin [33, 34], suggesting that under conditions of wound healing both DDX5 and calcitriol are needed for this process to proceed, and that, as the results herein presented suggest, DDX5 is a target of calcitriol. Indeed, herein we demonstrated that DDX5 is induced by calcitriol, which to our knowledge is the first description of DDX5 regulation by a member of the nuclear receptor superfamily. Additionally, our findings contribute to increase the understanding about the hormonal regulation of RNA helicases, that with the exception of testis-specific GRTH/DDX25 [35], very little is known on the mechanism involved in their gene regulation.

Of note, a previous report concluded that DDX5 mRNA and protein expression was not affected in both HaCaT keratinocytes and HEK293AD cells incubated with 0.2 μ M calcitriol during 16 h [5]. In contrast, in this study, we detected a transient and moderate upregulation of DDX5 mRNA and protein by calcitriol (aprox. 1.3-fold) in SiHa cells incubated with 1 μ M calcitriol during 3 h and 5 h, respectively. However, the expression of DDX5 mRNA was unaffected by calcitriol when using lower concentrations than 1 μ M or longer incubation times than 3 h. These differences in incubation times and concentrations tested might explain the discrepancy between previous results [5] and ours.

4. Conclusions

The DDX5 gene is upregulated by calcitriol in SiHa cells through a mechanism involving the interaction of VDR with a VDRE DR4-type in the proximal promoter. Our results suggest that within the actions of calcitriol, those related to regulation of DDX5 expression may play a significant physiological role in cell differentiation mechanisms.

Figure 1.

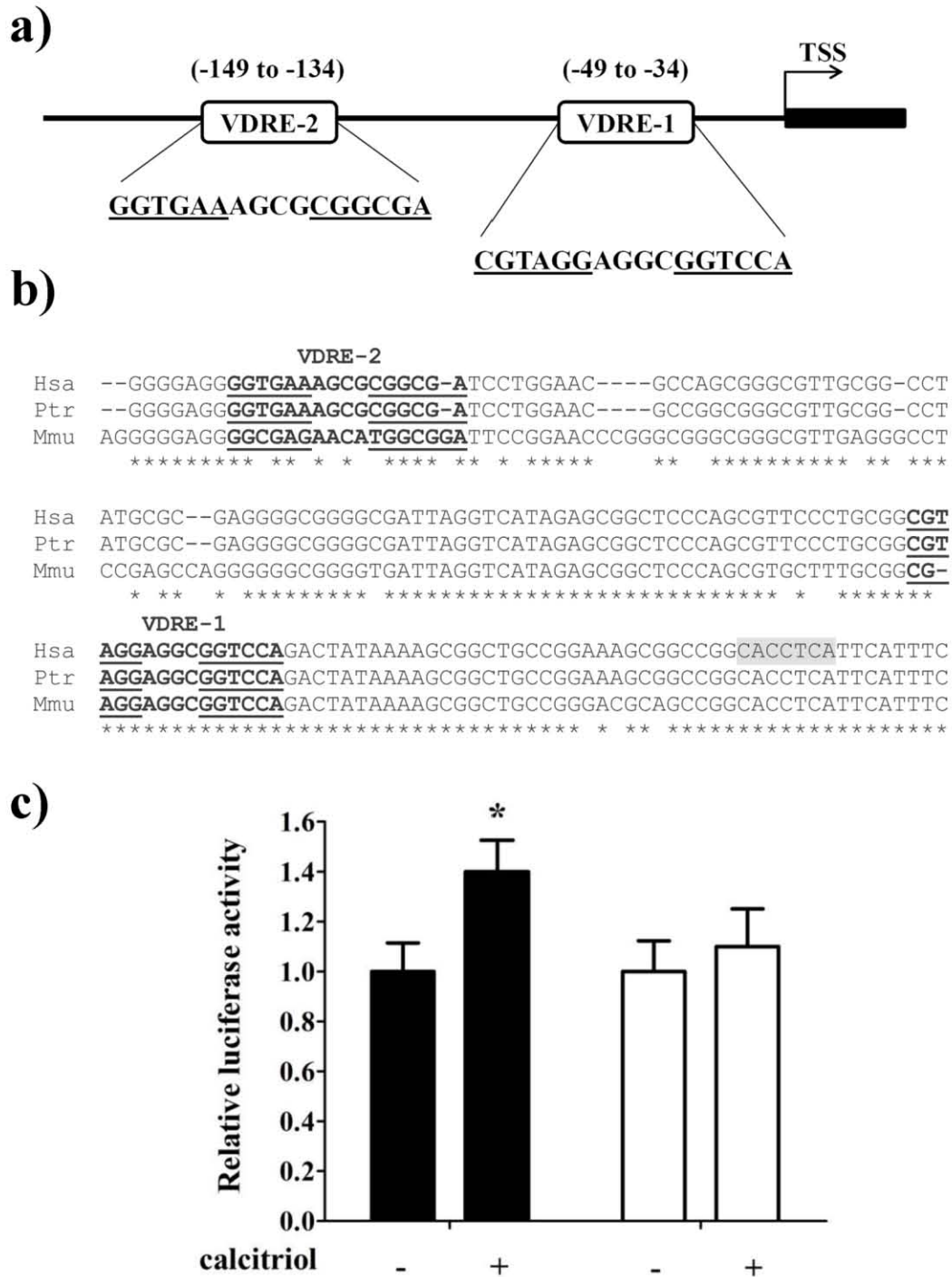


Figure 2.

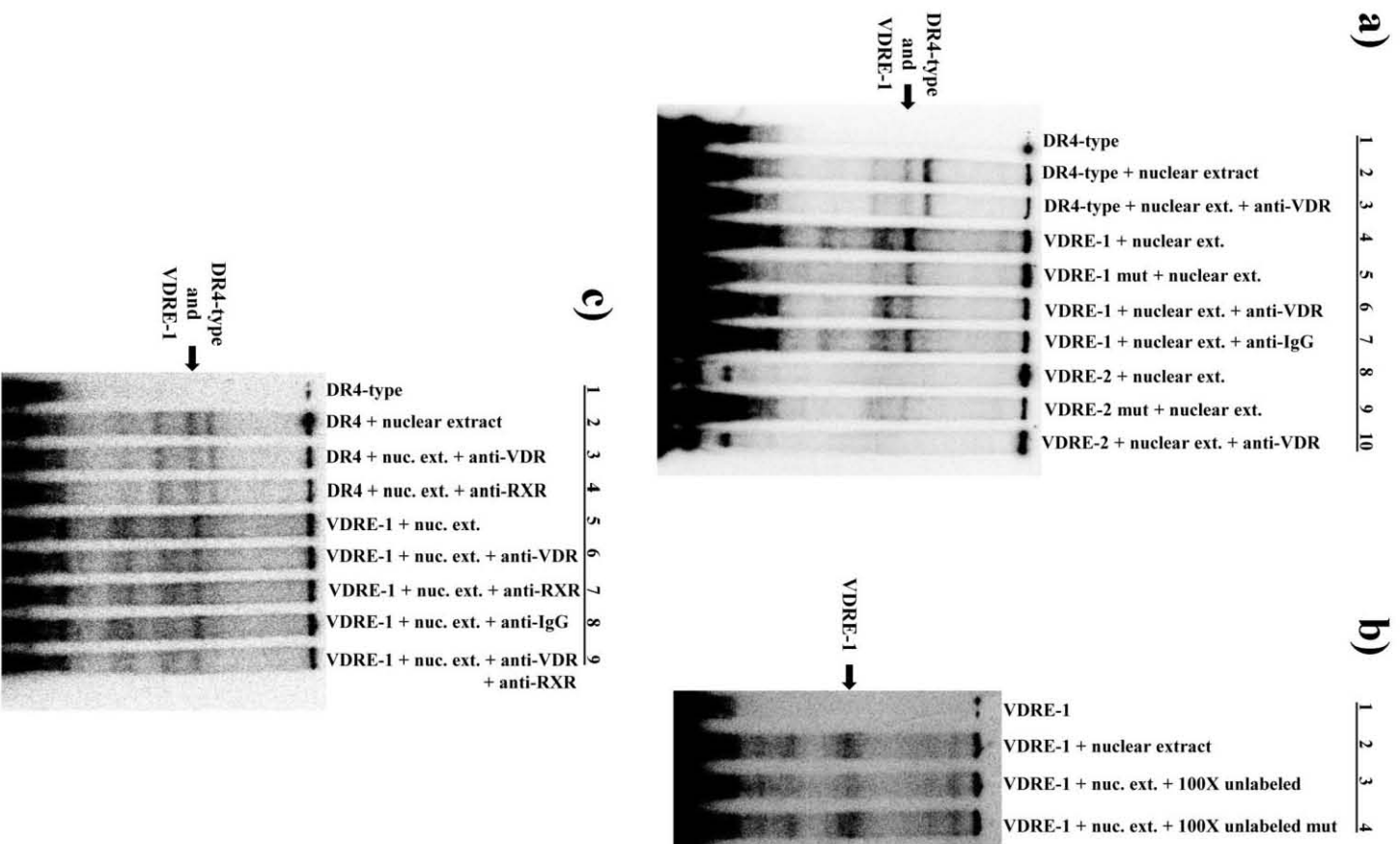
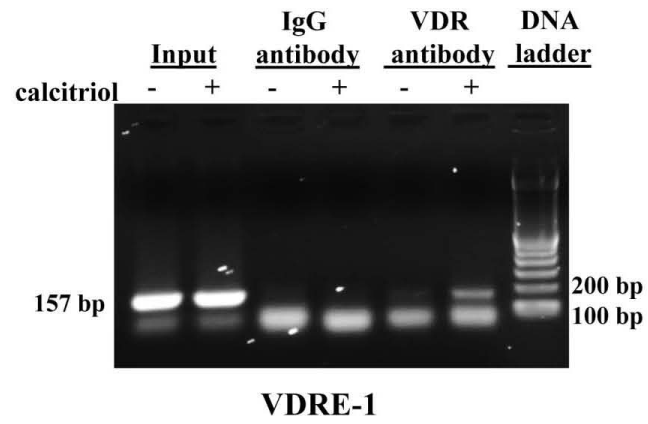
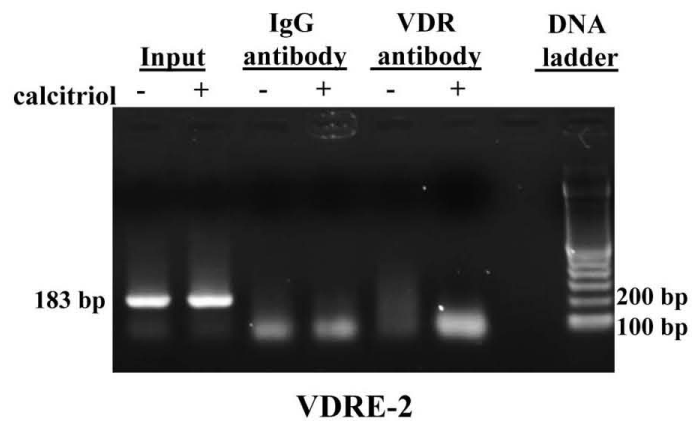


Figure 3.

a)



b)



c)

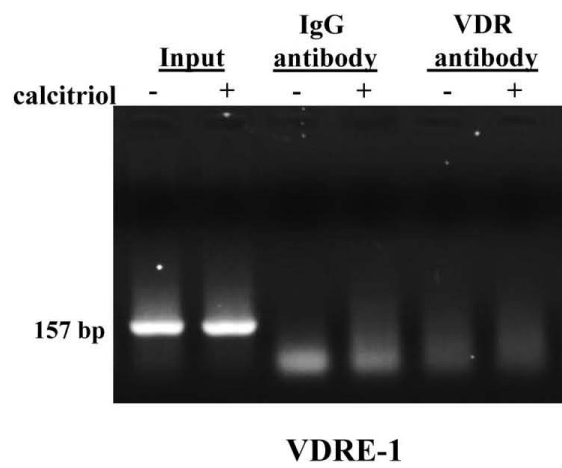


Figure 4.

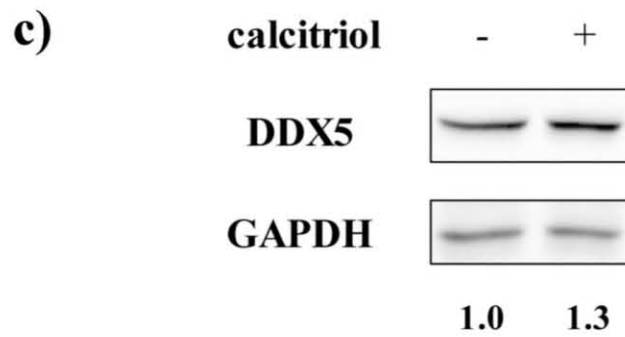
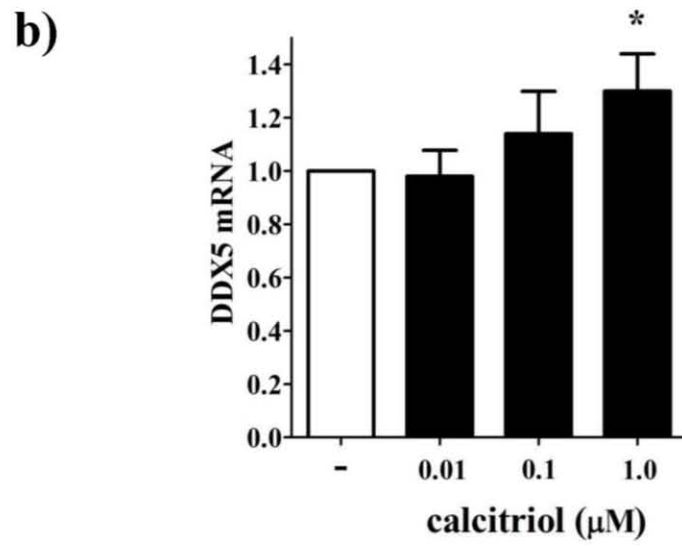
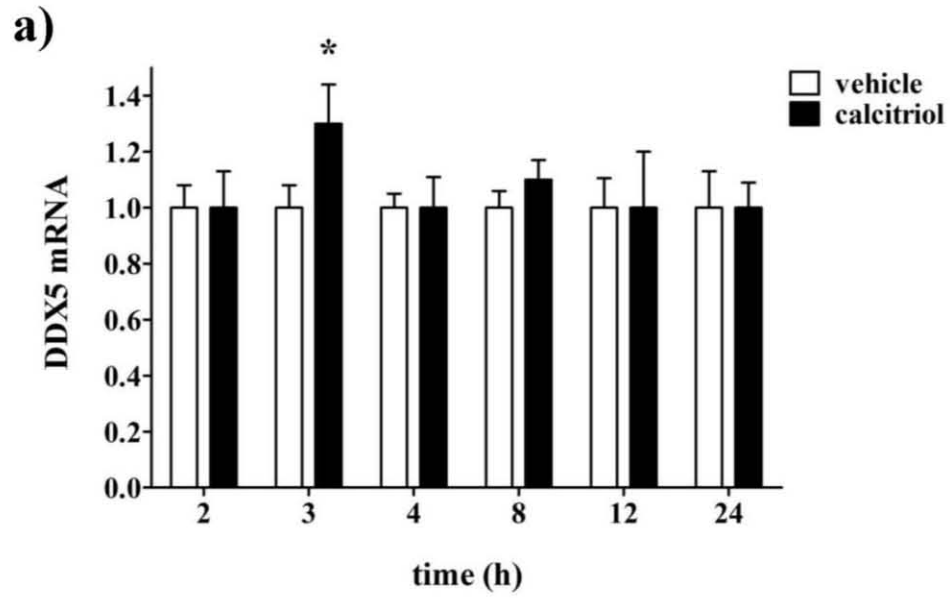


Figure 5.

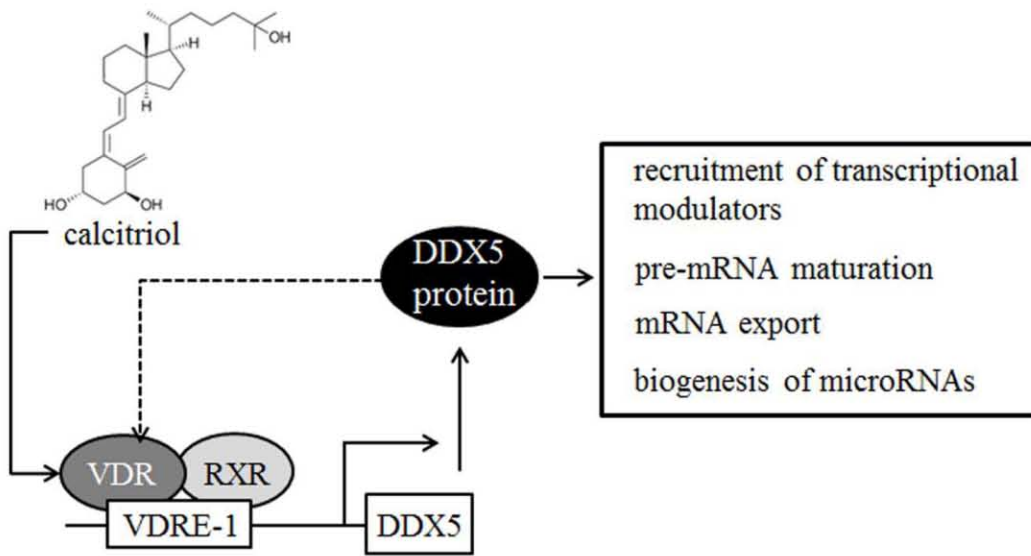


Figure captions

Fig. 1 The human DDX5 promoter contains two putative vitamin D responsive elements, of which the VDRE-1 is functional and the most evolutionary conserved. a) Schematic representation of the DDX5 gene depicting both VDREs, referred as proximal (VDRE-1) or distal (VDRE-2). TSS is the transcriptional start site. b) Nucleotide sequence alignment of the VDREs located in the proximal DDX5 promoter from three different species (*Homo sapiens*, Hsa; *Pan troglodytes*, Ptr and *Mus musculus*, Mmu). The VDREs are shown in bold letters and the hexanucleotide repeats are underlined. Asterisks indicate identity among the three species and the Inr sequence described in human DDX5 gene promoter is highlighted. c) Calcitriol transactivates the DDX5 promoter in VDR-positive SiHa cells but not in VDR-negative C33-A cells. Luciferase reporter assays were performed in SiHa cells (filled bars) or in C33-A cells (open bars) transfected with DDX5 luciferase reporter plasmid. Transfected cells were incubated during 24 h in the presence of 1 μ M calcitriol (+) or ethanol as its vehicle (-). Results are expressed as the ratio of dual luciferase activities. Bars represent the mean \pm SD of three independent experiments. * P <0.05 vs vehicle

Fig. 2 The proximal VDRE in the DDX5 promoter interacts *in vitro* with endogenous VDR and RXR in SiHa cervical cells. a) Nuclear extracts of SiHa cells treated with 0.1 μ M calcitriol were incubated with the indicated radiolabeled-probes for a canonical DR4-VDRE or wild-type and mutant forms of both VDREs (VDRE-1 and VDRE-2) in the DDX5 promoter. A VDR antibody or an unspecific mouse IgG was used. b) Before the incubation of SiHa nuclear extracts with a radiolabeled-probe for wild type VDRE-1, EMSA reactions were preincubated with either an excess of unlabeled wild type VDRE-1 or an excess of unlabeled mutant form of this VDRE-1. c) EMSA reactions on labeled wild type VDRE-1 were performed with SiHa nuclear extracts in the presence of VDR and RXR antibodies. In all cases, representative EMSAs are shown

Fig. 3 The proximal VDRE in the DDX5 promoter interacts *in vivo* with VDR in SiHa cells but not in C33-A cells. Chromatin immunoprecipitation analysis were performed on SiHa cells incubated in the presence of 1 μ M calcitriol (+) or ethanol as its vehicle (-) during 2 h. Soluble chromatin was immunoprecipitated with an antibody against VDR and subjected to PCR analysis with appropriate set of primers flanking the VDRE-1 (a) or VDRE-2 (b) in the DDX5 promoter. A non-specific IgG was used as negative control. c) A similar experiment was performed in C33-A cervical cells for VDRE-1

Fig. 4 Calcitriol increases both DDX5 mRNA and protein expression in SiHa cervical cells. SiHa cells were incubated during variable times in the presence of 1 μ M calcitriol or 0.1% ethanol as its vehicle (a), or incubated with increasing calcitriol concentrations or 0.1% ethanol as its vehicle (b) before total RNA isolation. DDX5 mRNA levels were normalized to GAPDH mRNA and results were represented relative to values from vehicle-treated cells, which were set to 1. Data are presented as mean \pm SD from three independent experiments performed in triplicate. * P <0.05 vs vehicle. c) Western blot analysis to detect DDX5 (68 kDa) was performed in SiHa cells treated with 1 μ M calcitriol or 0.1% ethanol as its vehicle for 5 h. GAPDH (37 kDa) was used as a loading control. A representative western blot is shown. Numbers indicate relative levels of DDX5 after normalization to endogenous GAPDH (n=3)

Fig. 5 Schematic illustration of the VDRE-dependent induction of the human DDX5 gene by calcitriol. The activation of VDR by calcitriol promotes the interaction of the heterodimer VDR-RXR with the DDX5 human proximal promoter via a conserved VDRE. This interaction promotes the recruitment of coactivators and transcriptional modulators, which in turn increases the transcription of DDX5 gene. The higher bioavailability of DDX5 protein might be involved in transcriptional regulation and transcript processing of calcitriol-responsive genes. As a coactivator, DDX5 might regulate its own gene transcription (dotted line)

Compliance with Ethical Standards

Disclosures

This article is part of the doctoral thesis of R.J.G.D., at Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México (México) under a fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (fellowship 207287).

Funding

This study was funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México), grants number 241034 and 153862 to EA and LD, respectively. CONACyT had no role in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the article for publication.

Disclosure of potential conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Research involving Human Participants and/or Animals

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

1. Fuller-Pace FV and Moore HC (2011) RNA helicases p68 and p72: multifunctional proteins with important implications for cancer development. *Future Oncol* 7:239-51.
2. Jung C, Mittler G, Oswald F and Borggrefe T (2013) RNA helicase Ddx5 and the noncoding RNA SRA act as coactivators in the Notch signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1833:1180-9.
3. Warner DR, Bhattacharjee V, Yin X, Singh S, Mukhopadhyay P, Pisano MM and Greene RM (2004) Functional interaction between Smad, CREB binding protein, and p68 RNA helicase. *Biochem Biophys Res Commun* 324:70-6.
4. Clark EL, Fuller-Pace FV, Elliott DJ and Robson CN (2008) Coupling transcription to RNA processing via the p68 DEAD box RNA helicase androgen receptor co-activator in prostate cancer. *Biochem Soc Trans* 36:546-7.

5. Wagner M, Rid R, Maier CJ, Maier RH, Laimer M, Hintner H, Bauer JW and Onder K (2012) DDX5 is a multifunctional co-activator of steroid hormone receptors. *Mol Cell Endocrinol* 361:80-91.
6. Bates GJ, Nicol SM, Wilson BJ, Jacobs AM, Bourdon JC, Wardrop J, Gregory DJ, Lane DP, Perkins ND and Fuller-Pace FV (2005) The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor. *Embo J* 24:543-53.
7. Caretti G, Schiltz RL, Dilworth FJ, Di Padova M, Zhao P, Ogryzko V, Fuller-Pace FV, Hoffman EP, Tapscott SJ and Sartorelli V (2006) The RNA helicases p68/p72 and the noncoding RNA SRA are coregulators of MyoD and skeletal muscle differentiation. *Dev Cell* 11:547-60.
8. Jensen ED, Niu L, Caretti G, Nicol SM, Teplyuk N, Stein GS, Sartorelli V, van Wijnen AJ, Fuller-Pace FV and Westendorf JJ (2008) p68 (Ddx5) interacts with Runx2 and regulates osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 103:1438-51.
9. Wang R, Jiao Z, Li R, Yue H and Chen L (2012) p68 RNA helicase promotes glioma cell proliferation in vitro and in vivo via direct regulation of NF-kappaB transcription factor p50. *Neuro Oncol* 14:1116-24.
10. Jalal C, Uhlmann-Schiffler H and Stahl H (2007) Redundant role of DEAD box proteins p68 (Ddx5) and p72/p82 (Ddx17) in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Nucleic Acids Res* 35:3590-601.
11. Rössler OG, Straka A and Stahl H (2001) Rearrangement of structured RNA via branch migration structures catalysed by the highly related DEAD-box proteins p68 and p72. *Nucleic Acids Res* 29:2088-96.
12. Saporita AJ, Chang HC, Winkeler CL, Apicelli AJ, Kladney RD, Wang J, Townsend RR, Michel LS and Weber JD (2011) RNA helicase DDX5 is a p53-independent target of ARF that participates in ribosome biogenesis. *Cancer Res* 71:6708-17.
13. Liu ZR (2002) p68 RNA helicase is an essential human splicing factor that acts at the U1 snRNA-5' splice site duplex. *Mol Cell Biol* 22:5443-50.
14. Zonta E, Bittencourt D, Samaan S, Germann S, Dutertre M and Auboeuf D (2013) The RNA helicase DDX5/p68 is a key factor promoting c-fos expression at different levels from transcription to mRNA export. *Nucleic Acids Res* 41:554-64.
15. Carlberg C and Campbell MJ (2013) Vitamin D receptor signaling mechanisms: integrated actions of a well-defined transcription factor. *Steroids* 78:127-36.
16. Giangreco AA and Nonn L (2013) The sum of many small changes: microRNAs are specifically and potentially globally altered by vitamin D3 metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol* 136:86-93.
17. González-Duarte RJ, Cázares-Ordoñez V, Romero-Córdoba S, Díaz L, Ortiz V, Freyre-González JA, Hidalgo-Miranda A, Larrea F and Avila E (2015) Calcitriol increases Dicer expression and modifies the microRNAs signature in SiHa cervical cancer cells. *Biochem Cell Biol* 93:376-84.
18. Avila E, Garcia-Becerra R, Rodriguez-Rasgado JA, Diaz L, Ordaz-Rosado D, Zugel U, Steinmeyer A, Barrera D, Halhali A, Larrea F and Camacho J (2010) Calcitriol down-

regulates human ether a go-go 1 potassium channel expression in cervical cancer cells. *Anticancer Res* 30:2667-72.

19. Cázares-Ordoñez V, Gonzalez-Duarte RJ, Diaz L, Ishizawa M, Uno S, Ortiz V, Ordonez-Sanchez ML, Makishima M, Larrea F and Avila E (2015) A cis-acting element in the promoter of human ether a go-go 1 potassium channel gene mediates repression by calcitriol in human cervical cancer cells. *Biochem Cell Biol* 93:94-101. doi: 10.1139/bcb-2014-0073

20. Rossler OG, Hloch P, Schutz N, Weitzenegger T and Stahl H (2000) Structure and expression of the human p68 RNA helicase gene. *Nucleic Acids Res* 28:932-9.

21. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M and Rozen SG (2012) Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40:e115. doi: 10.1093/nar/gks596

22. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M and Werner T (2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21:2933-42. doi: 10.1093/bioinformatics/bti473

23. Deeb KK, Trump DL and Johnson CS (2007) Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 7:684-700. doi: 10.1038/nrc2196

24. Stevenson RJ, Hamilton SJ, MacCallum DE, Hall PA and Fuller-Pace FV (1998) Expression of the 'dead box' RNA helicase p68 is developmentally and growth regulated and correlates with organ differentiation/maturation in the fetus. *J Pathol* 184:351-9.

25. Jacobs AM, Nicol SM, Hislop RG, Jaffray EG, Hay RT and Fuller-Pace FV (2007) SUMO modification of the DEAD box protein p68 modulates its transcriptional activity and promotes its interaction with HDAC1. *Oncogene* 26:5866-76. doi: 10.1038/sj.onc.1210387

26. Mooney SM, Grande JP, Salisbury JL and Janknecht R (2010) Sumoylation of p68 and p72 RNA helicases affects protein stability and transactivation potential. *Biochemistry* 49:1-10.

27. Mooney SM, Goel A, D'Assoro AB, Salisbury JL and Janknecht R (2010) Pleiotropic effects of p300-mediated acetylation on p68 and p72 RNA helicase. *J Biol Chem* 285:30443-52. doi: 10.1074/jbc.M110.143792

28. Yang L, Lin C and Liu ZR (2006) P68 RNA helicase mediates PDGF-induced epithelial mesenchymal transition by displacing Axin from beta-catenin. *Cell* 127:139-55.

29. Gustafson EA and Wessel GM (2010) DEAD-box helicases: posttranslational regulation and function. *Biochem Biophys Res Commun* 395:1-6.

30. Seufert DW, Kos R, Erickson CA and Swalla BJ (2000) p68, a DEAD-box RNA helicase, is expressed in chordate embryo neural and mesodermal tissues. *J Exp Zool* 288:193-204.

31. Geissler V, Altmeyer S, Stein B, Uhlmann-Schiffler H and Stahl H (2013) The RNA helicase Ddx5/p68 binds to hUpf3 and enhances NMD of Ddx17/p72 and Smg5 mRNA. *Nucleic Acids Res* 41:7875-88.
32. Kahlina K, Goren I, Pfeilschifter J and Frank S (2004) p68 DEAD box RNA helicase expression in keratinocytes. Regulation, nucleolar localization, and functional connection to proliferation and vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem* 279:44872-82.
33. Zehnder D, Bland R, Chana RS, Wheeler DC, Howie AJ, Williams MC, Stewart PM and Hewison M (2002) Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) by human endothelial cells is regulated by inflammatory cytokines: a novel autocrine determinant of vascular cell adhesion. *J Am Soc Nephrol* 13:621-9.
34. Schaubert J, Dorschner RA, Coda AB, Buchau AS, Liu PT, Kiken D, Helfrich YR, Kang S, Elalieh HZ, Steinmeyer A, Zugel U, Bikle DD, Modlin RL and Gallo RL (2007) Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J Clin Invest* 117:803-11. doi: 10.1172/JCI30142
35. Tsai-Morris CH, Sheng Y, Gutti RK, Tang PZ and Dufau ML (2010) Gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25): a multifunctional protein essential for spermatogenesis. *J Androl* 31:45-52. doi: 10.2164/jandrol.109.008219