



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DEL CALCITRIOL Y TGF- β SOBRE LA SÍNTESIS DE LAS
METALOPROTEINASAS -2 Y -9 EN LA LÍNEA CELULAR PC-3**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

GARCÍA OLIVARES MITZI

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DAVID BARRERA HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. ELIZABETH LANGLEY McCARRON
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., FEBRERO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DEL CALCITRIOL Y TGF- β SOBRE LA SÍNTESIS DE LAS
METALOPROTEINASAS -2 Y -9 EN LA LÍNEA CELULAR PC-3**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

GARCIA OLIVARES MITZI

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DAVID BARRERA HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. ELIZABETH LANGLEY McCARRON
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, CD. MX., FEBRERO, 2018




Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 06 de noviembre de 2017, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **GARCÍA OLIVARES MITZI** con número de cuenta **307128607**, con la tesis titulada **"EFECTO DEL CALCITRIOL Y TGF- β SOBRE LA SÍNTESIS DE LAS METALOPROTEINASAS -2 Y -9 EN LA LÍNEA CELULAR PC-3"**, realizada bajo la dirección del **DR. DAVID BARRERA HERNÁNDEZ**:

Presidente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Vocal: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
Secretario: DRA. ELIZABETH LANGLEY McCARRON
Suplente: DRA. ELIZABETH ORTIZ SÁNCHEZ
Suplente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 22 de enero de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM** por haberme aceptado y permitido cursar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca, otorgada durante los dos años que cursé mis estudios de maestría. Número de becario 587887.

A los miembros del Comité Tutor

A mi tutor principal, **Dr. David Barrera Hernández**, y a los miembros del comité tutor, **Dra. Elizabeth Langley McCarron** y **Dra. Marcela Lizano Soberón** por su valiosa dirección y sus comentarios atinados en la revisión y mejora de este escrito, con lo que me permitieron mejorar en mi formación profesional y calidad de trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Gracias a **Dios y la vida** por permitirme pertenecer a una hermosa familia y haberme rodeado de grandes amigos que me dieron la fuerza para la realización de este trabajo.

Gracias papá **Javier García**, porque a través de tus palabras siempre me has animado a nunca rendirme, por enseñarme que a través del esfuerzo y dedicación se consiguen los sueños. Gracias por todo tu cariño y confianza que has depositado en mí. En verdad, estoy muy orgullosa de ser tu hija.

Gracias mamá **Herminia Olivares**, porque me has brindado todos tus cuidados y cariños durante mi formación personal y académica. Gracias por demostrarme que siempre estás a mi lado cuando requiero un abrazo, un consejo, una enseñanza y, por su pesto, un regaño. Eres la mejor mamá que la vida y Dios pudo haberme dado.

Gracias **Itzel Atyael** por ser mi hermana y amiga, por tu apoyo incondicional y por todas tus palabras, que son las más honestas y sinceras que nadie más podría decirme en la vida. Gracias por alegrar mis días y sabes, de sobra, que yo siempre estaré para ti cuando lo necesites.

Gracias a mis abuelitas **Rufina Becerril** y **Gloria Gutiérrez** porque siempre se han preocupado por los más mínimos detalles, que hacen sentir la persona más amada del mundo.

A mis amigas del Laboratorio de Biología de la Reproducción (**Andrea Olmos, Nancy Noyola, Mariana Segovia, Isela Martínez y Sofía López**) por escucharme y apoyarme cuando lo necesité, sobre todo porque soy la persona más despistada del mundo. Porque sin ustedes el trabajo de laboratorio no hubiera sido tan divertido como lo fue. Gracias por los consejos, aventuras y risas que vivimos juntas. Las quiero y las llevaré en el corazón por siempre.

A mis amigos **Brayan Barroso, Karla Hernández y Lizeth Urbina**, porque me han brindado su amistad incondicional por muchos años y me han animado, acompañado, escuchado, aconsejado y ayudado todo este tiempo. ¡Son los mejores!

Agradezco a la **Dra. Rocío García Becerra** por su valioso apoyo en el laboratorio y comentarios.

Agradezco infinitamente a la **Dr. David Barrera Hernández** por su apoyo y disposición en la dirección y realización de esta tesis, por darme la oportunidad de trabajar con él, de compartirme sus conocimientos y sobre todo su tiempo. Por su paciencia y dedicación gracias.

Al **Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ)** y por el apoyo en la realización de este trabajo.

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| 1. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS | I |
| 2. LISTA DE ABREVIATURAS | III |
| 3. RESUMEN | 1 |
| 4. ABSTRACT | 3 |
| 5. INTRODUCCIÓN | 4 |
| 5.1 Incidencia..... | 4 |
| 5.2 Generalidades del cáncer de próstata..... | 4 |
| 6. OBJETIVOS | 7 |
| 6.1 Objetivos particulares..... | 7 |
| 7. ANTECEDENTES | 8 |
| 7.1 Calcitriol en cáncer de próstata..... | 8 |
| 7.2 Metabolismo del calcitriol..... | 8 |
| 7.2.1 Mecanismos de acción del calcitriol..... | 10 |
| 7.2.2 Efectos antineoplásicos del calcitriol..... | 11 |
| 7.3 Factor de crecimiento transformante β (TGF- β)..... | 13 |
| 7.3.1 TGF- β y cáncer..... | 14 |
| 7.4 Metaloproteinasas de matriz (MMPs)..... | 16 |
| 8. METODOLOGÍA | 20 |
| 8.1 Cultivo celular..... | 20 |
| 8.2 Ensayos de crecimiento celular..... | 20 |
| 8.3 Estudios de expresión génica..... | 22 |
| 8.3.1 Extracción del RNA..... | 22 |
| 8.3.2 Obtención de DNA complementario (cDNA)..... | 23 |
| 8.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)..... | 24 |
| 8.4 Cuantificación de la secreción de la MMP-2 y MMP-9..... | 25 |
| 8.6 Análisis estadístico..... | 26 |

| | |
|--|----|
| 9. RESULTADOS | 27 |
| 9.1 Efecto del calcitriol, del TGF- β 1 y TGF- β 2 sobre el crecimiento celular del cáncer de próstata PC-3..... | 27 |
| 9.2 Efecto del calcitriol sobre la expresión génica del <i>CYP24A1</i> | 28 |
| 9.3 Efecto del tratamiento con calcitriol y del TGF- β 1 y TGF- β 2 sobre la expresión génica de la <i>MMP-2</i> y <i>MMP-9</i> | 29 |
| 9.4 Efecto del calcitriol, del TGF- β 1 y del TGF- β 2 solos o en combinación sobre la expresión génica del <i>TIMP-1</i> y <i>TIMP-2</i> | 30 |
| 9.5 Efecto del calcitriol, del TGF- β 1 y del TGF- β 2 solos y en combinación sobre la expresión génica de la <i>MMP-2</i> y <i>MMP-9</i> en la línea celular PC-3..... | 32 |
| 9.6 Efecto del calcitriol, del TGF- β 1 y del TGF- β 2 solos y en combinación sobre la producción de la <i>MMP-9</i> | 33 |
| 10. DISCUSIÓN | 34 |
| 11. CONCLUSIONES | 38 |
| 12. LITERATURA CITADA | 39 |

1. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1. Síntesis del calcitriol..... | 9 |
| Figura 2. Mecanismos de acción genómico del calcitriol | 11 |
| Figura 3. Efectos antineoplásicos del calcitriol en cáncer de próstata | 12 |
| Figura 4. Vías de señalización del TGF- β | 14 |
| Figura 5. Papel bifásico del TGF- β en la progresión tumoral..... | 16 |
| Figura 6. Estructura de las MMP-2 y MMP-9..... | 18 |
| Figura 7. Cajas de ensayo de proliferación..... | 21 |
| Figura 8. Extracción del RNA | 23 |
| Figura 9. Efecto del calcitriol y los TGF- β s en el crecimiento celular..... | 25 |
| Figura 10. Efecto del calcitriol en combinación con el TGF- β 1 y el TGF- β 2 en el crecimiento celular..... | 28 |
| Figura 11. Efecto del calcitriol sobre la expresión génica del <i>CYP24A1</i> | 29 |
| Figura 12. Efecto del calcitriol y de los TGF- β s sobre la expresión génica de las <i>MMPs</i> | 30 |
| Figura 13. Efecto del calcitriol y de los TGF- β s sobre la expresión génica de los <i>TIMPs</i> | 31 |

| | |
|--|----|
| Figura 14. El calcitriol revierte el efecto estimulador de las MMPs inducida por los TGF- β s..... | 32 |
| Figura 15. El calcitriol previene el aumento de la concentración y la secreción de la MMP-9 inducido por los TGF- β s | 33 |
| Tabla 1. Clasificación de las MMPs de acuerdo a especificidad de sustrato..... | 17 |
| Tabla 2. Efectos del calcitriol y del TGF- β sobre las MMPs y los TIMPs en líneas celulares de cáncer de próstata..... | 19 |
| Tabla 3. Protocolo de amplificación del cDNA por qPCR..... | 24 |
| Tabla 4. Secuencias de los iniciadores y sondas utilizadas en la qPCR..... | 25 |

2. LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| 5 α -DHT | 5 α -dihidrotestosterona |
| ADT | terapia de privación de andrógenos por sus siglas en inglés; androgen deprivation therapy |
| AJCC | por sus siglas en inglés: American Joint Committee on Cancer |
| ATCC | por sus siglas en inglés: American Type Culture Collection |
| CAPRA | por sus siglas en inglés: Cancer of the prostate Risk Assessment |
| CP | cáncer de próstata |
| CRPC | cáncer de próstata resistente a la castración, por sus siglas en inglés: castration resistant prostate cancer |
| CYP24A1 | 1,25-dihidroxitamina D ₃ -24 hidroxilasa |
| CYP27B1 | 25-hidroxitamina D ₃ -1 α hidroxilasa |
| CYPR21 | 25 -hidroxilasa |
| DBP | proteína de unión a vitamina D, por sus siglas en inglés: vitamin D binding protein |
| DEPC | dietilpirocarbonato |
| EMT | transición epitelio mesénquima, por sus siglas en inglés: epithelial to mesenchymal transition |
| JNK | c-jun N-terminal kinases |
| MAPK | proteína cinasa activada por mitógeno, por sus siglas en inglés: mitogen activated protein kinases |
| MEC | matriz extracelular |

| | |
|---------------|---|
| MMPs | metaloproteinasas de matriz, por sus siglas en inglés: matrix metalloproteinases |
| MT-MMPs | metaloproteinasas de matriz de tipo membranal, por sus siglas en inglés: membrane matrix metalloproteinases |
| NCCN | por sus siglas en inglés: National Comprehensive Network |
| PI3K | fosfatidilisitol-3-cinasa |
| PLC | fosfolipasa C |
| qPCR | reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, por sus siglas en inglés: real time polymerase chain reaction |
| RXR | receptor de retinoides X, por sus siglas en inglés: retinoid X receptor |
| SRB | sulfurodamina B |
| T β RI | receptor de TGF- β tipo I, por sus siglas en inglés: type I TGF- β receptor |
| T β RII | receptor de TGF- β tipo II, por sus siglas en inglés: type II TGF- β receptor |
| TGF- β | factor de crecimiento transformante β , por sus siglas en inglés: transforming growth factor β |
| TIMPs | inhibidores tisulares de metaloproteinasas, por sus siglas en inglés: tissue inhibitors of metalloproteinases |
| VDR | receptor a vitamina D, por sus siglas en inglés: vitamin D receptor |
| WHO | Organización Mundial de la Salud, por sus siglas en inglés: World Health Organization |

3. RESUMEN

El cáncer de próstata (CP) es la neoplasia más común en hombres mayores de 65 años y su tratamiento es difícil; ya que los pacientes desarrollan resistencia y progresan hacia un fenotipo con alta morbilidad denominada cáncer de próstata resistente a la castración, la cual tiene escasas opciones terapéuticas. No obstante, se ha reportado que el calcitriol tiene efectos anti-proliferativos en varios tipos de cáncer y se ha descrito que la acción anti-proliferativa del calcitriol en el CP puede ser mediada, al menos en parte, por el efecto estimulador del calcitriol sobre la síntesis del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).

Sin embargo, el calcitriol y el TGF- β regulan diferencialmente la actividad de las metaloproteasas de matriz (MMPs), las cuales están involucradas en diferentes eventos naturales como la angiogénesis, la invasión y la migración celular. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue investigar los efectos del calcitriol solo o en combinación con TGF- β 1 o TGF- β 2 sobre la proliferación celular, así como sobre la expresión génica de la *MMP-2*, *MMP-9* y sus reguladores *TIMP-1* y *TIMP-2* en la línea celular de cáncer de próstata humana PC-3.

Las células PC-3 fueron cultivadas y el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento celular fue evaluado mediante el método de sulforodamina B. La expresión génica fue evaluada por RT-PCR, incluyendo el análisis de la expresión del gen blanco del calcitriol; el *CYP24A1*. Adicionalmente, la secreción de las MMPs se determinó por el ensayo de ELISA.

Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que: 1) el calcitriol, el TGF- β 1 o el TGF- β 2 inhiben significativamente el crecimiento celular de la línea PC-3, 2) el crecimiento celular de las PC-3 es mayormente inhibido al ser co-tratadas con calcitriol y TGF- β 1 o TGF- β 2 en comparación con el control o con cada uno de tratamientos por separado, 3) el calcitriol inhibe mientras que los TGF- β s estimulan la expresión génica de las MMPs, 4) los TIMPs no son modificados por los tratamientos después de 24 h de incubación en ninguna condición probada y 5) el efecto estimulador de los TGF- β s sobre la expresión de los genes *MMP-2* y *MMP-9* así como la secreción de MMP-9 se revirtió significativamente cuando las células fueron co-tratadas con calcitriol.

En conclusión, los resultados sugieren que mantener concentraciones adecuadas de vitamina D podría regular las acciones del TGF- β y tener un impacto beneficioso contra el crecimiento e invasión de las células de cáncer de próstata humana.

4. ABSTRACT

Prostate cancer (PC) is the most common neoplasia in men over the age of 65 and its treatment is difficult due to patients developing resistance and progressing to a disease with high morbidity called castration resistant prostate cancer, which has few therapeutic options. Nevertheless, it has been reported that calcitriol has anti-proliferative effects in several types of cancer and it has been suggested that anti-proliferative action of calcitriol in PC could be mediated, at least in part, by the stimulatory effect of calcitriol on the synthesis of transforming growth factor beta (TGF- β).

However, calcitriol and TGF- β differentially regulate the activity of matrix metalloproteinases (MMPs), which are involved in different natural events such as angiogenesis, invasion and cell migration. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effects of calcitriol alone or in combination with TGF- β 1 or TGF- β 2 on cell viability as well as on the gene expression of MMP-2, MMP-9 and its regulators TIMP-1 and TIMP-2 in the PC-3 human prostate cancer cell line.

Cell cultures were performed and treatment effects on cell growth were assessed by the sulforhodamine B method. Gene transcription was measured by RT-PCR, including the expression of the target gene of calcitriol; the *CYP24A1*. Additionally, protein secretion of MMPs was determined by the ELISA assay.

The results obtained in the present study showed that: 1) calcitriol, TGF- β 1 or TGF- β 2 significantly inhibit the cell growth of PC-3 line, 2) PC-3 cell growth was highly inhibited by a combination of calcitriol with TGF- β 1 or TGF- β 2, as compared to the control or with each one of the treatments separately, 3) calcitriol inhibits while TGF- β s stimulate MMPs gene expression, 4) TIMPs are not modified by treatments after 24 h of incubation in any condition tested and 5) stimulatory effect of TGF- β s upon gene expression of *MMP-2* and *MMP-9*, as well as MMP-9 secretion, are significantly reverted when the cells were co-treated with calcitriol.

In conclusion, the results suggest that maintaining adequate concentrations of vitamin D could regulate the actions of TGF- β and have a beneficial impact against the cell viability and invasion of PC cells.

5. INTRODUCCIÓN

El cáncer se define como un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo y cuya característica principal es la proliferación de células anormales que se extienden más allá de sus tejidos de origen y en consecuencia pueden migrar a diferentes partes del cuerpo. Este proceso es conocido como metástasis y es la principal causa de muerte por cáncer [1, 2].

5.1 Incidencia

En general, el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo y de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (WHO) en el año 2015 ocasionó 8.8 millones de defunciones mundialmente, lo que implica que aproximadamente una de cada seis muertes en el mundo se debe a esta enfermedad [2] y se estima que en los próximos 20 años aumente hasta en un 70% el número de casos.

De acuerdo a la WHO, el cáncer de próstata (CP) ocupa el segundo lugar de incidencia y el quinto en mortalidad entre la población masculina de entre 65 y 72 años de edad a nivel mundial [3]. En el caso particular de México, el CP representa el primer lugar de incidencia y mortalidad entre la población masculina [4, 5].

5.2 Generalidades del cáncer de próstata

El CP es un adenocarcinoma que en etapas tempranas requiere la presencia de andrógenos para su desarrollo y progresión [6]. En general, el andrógeno libre entra a la célula donde lleva a cabo sus acciones biológicas cuando se une al receptor de andrógenos [7]. Sin embargo, cuando existe un desequilibrio en su regulación se activan genes implicados en el desarrollo y progresión del CP [8]. Por otra parte, se han reportado genes que están asociados con la predisposición genética para el desarrollo del CP como el gen *BRCA2* y la fusión del gen *TMPRSS2:ERG*, ya que mutaciones en el *BRCA2* confiere un riesgo de hasta cinco a seis veces más de desarrollar CP [9] y en el caso de la fusión *TMPRSS2:ERG* se ha demostrado que tienen un peor pronóstico en términos de desarrollar metástasis [10].

Los principales parámetros para el diagnóstico del CP son: el tacto rectal, la concentración sérica de antígeno prostático y la toma de biopsia de próstata [11]. Actualmente existen diferentes esquemas para establecer el riesgo de CP basados en los parámetros anteriores como son: el NCCN (por sus siglas en inglés: National Comprehensive Network) y el CAPRA (por sus siglas en inglés: Cancer of the prostate Risk Assessment) [12, 13].

Determinar la etapa o grado del cáncer, permite al personal médico conocer la severidad de la enfermedad y así asignar el tratamiento o terapia adecuada para cada paciente. De esta manera, el CP es agrupado en cuatro grados o estadios clínicos con base en el sistema AJCC (por sus siglas en inglés: American Joint Committee on Cancer) en el cual, el grado es dependiente de la agresividad de la enfermedad. Este sistema se basa principalmente en: la extensión del tumor primario (T), la extensión del cáncer a nódulos linfáticos cercanos (N), la metástasis hacia pulmón y hueso (M), los niveles de antígeno prostático y el coeficiente de Gleason [14]. De lo anterior, cada parámetro es combinado para determinar la etapa o estadio del CP de cada paciente. Con base en el diagnóstico se establecen las terapias para un CP en etapas tempranas (vigilancia, radioterapia y extirpación de la próstata) o un CP avanzado (terapias hormonales y quimioterapia) [11, 15].

La terapia de privación de andrógenos (ADT por sus siglas en inglés, androgen deprivation therapy), resulta conveniente para aquellos pacientes que presentan CP metastásico o de recurrencia después del tratamiento [16]. La ADT reduce los niveles séricos de la hormona testosterona desde un nivel normal (500 a 600 ng / dl o 17.3-20.8 nmol / l) hasta niveles de castración (< 50 ng / dl o 1.73 nmol / l) con la finalidad de retrasar la progresión del CP, debido a que la progresión del CP en principio depende de la estimulación androgénica [17].

Aunque muchos pacientes inicialmente responden a la ADT, debido a la heterogeneidad de las células tumorales, los pacientes desarrollan resistencia al tratamiento y progresan hacia una enfermedad con alta morbilidad denominada CP resistente a la castración (CRPC por sus siglas en inglés: castration resistant prostate cancer), para lo cual existen pocas opciones terapéuticas [18-20].

El CRPC afecta del 10 al 20% de los pacientes con CP en un periodo de aproximadamente 5 años, cuya mortalidad aumenta del 40 al 50% en estos casos [21]. Por lo anterior, investigaciones que exploren a fondo las múltiples vías de activación celular y su regulación son de gran relevancia para proponer nuevas estrategias con tratamientos naturales como posibles potenciadores quimioterapéuticos que prevengan, retrasen o aminoren el desarrollo del CRPC, dentro de ellos se ha propuesto al calcitriol como una alternativa desde hace un par de décadas.

6. OBJETIVO

Evaluar el efecto del calcitriol sobre la proliferación celular así como sobre la expresión génica y proteica de la MMP-2 y MMP-9 y de sus reguladores *TIMP-1* y *TIMP-2* en ausencia y presencia del TGF- β en la línea celular metastásica de cáncer de próstata, PC-3.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Examinar el efecto del calcitriol, del TGF- β 1 y del TGF- β 2 solos y en combinación sobre el crecimiento celular de la línea de cáncer de próstata PC-3.
2. Indagar el efecto del calcitriol, del TGF- β 1 y del TGF- β solos y en combinación sobre la expresión génica de la *MMP-2* y *MMP-9* y de los *TIMP-1* y *TIMP-2*.
3. Evaluar el efecto del calcitriol, del TGF- β 1 y del TGF- β 2 sobre la MMP-2 y la MMP-9 secretadas en los medios de cultivo.

7. ANTECEDENTES

7.1 Calcitriol en cáncer de próstata

En los últimos 20 años, estudios observacionales han sugerido que la $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 (calcitriol; forma activa de la vitamina D) tiene un papel preventivo y protector contra diferentes tipos de cáncer incluyendo al CP [22].

Los primeros trabajos que proponen de forma indirecta una relación entre el calcitriol y CP, comenzaron con estudios epidemiológicos. Dichos trabajos sugirieron una relación inversa entre el nivel de radiación solar y la mortalidad por CP [23]. Dado que la fuente principal de esta hormona se da a través de la fotobiosíntesis inducida por la luz solar en la piel; se planteó que la diferencia en la mortalidad con respecto a diferentes regiones geográficas podría estar asociada con los niveles séricos de vitamina D.

En efecto, diversos trabajos epidemiológicos hallaron una relación inversa entre bajos niveles de vitamina D y el CP; es decir, la deficiencia de la 25-hidroxivitamina D (calcidiol; precursor del calcitriol) que es el metabolito de la vitamina D que se encuentra en mayor concentración en la circulación sanguínea (33-44 ng/mL), en un rango < 20 ng/mL, aumenta el riesgo de desarrollar CP hasta 1.6 veces [24]. Sin embargo, otros grupos han asociado altos niveles séricos de calcidiol con riesgo de desarrollar CP [25, 26]. De lo anterior, se recomienda que las personas con esta patología mantengan concentraciones óptimas de vitamina D, lo que podría resultar en una manera fácil, económica y segura para reducir la incidencia y mortalidad del CP de manera natural.

7.2 Metabolismo del calcitriol

La síntesis del calcitriol comienza a partir del 7-dehidrocolesterol, que por medio de la luz ultravioleta del sol (UV 291-315 nm) que incide sobre la piel dará lugar a la pre-vitamina D_3 , la cual a través de un reordenamiento estructural dependiente de la temperatura corporal formará a la vitamina D_3 (colecalfiferol) [27]. El colecalfiferol sintetizado, se traslada al hígado y ahí se hidroxila en el carbono 25 por la actividad enzimática del citocromo CYP21, dando lugar al calcidiol [28]. El calcidiol formado se transporta al riñón, lugar donde una segunda hidroxilación en el carbono 1 del anillo A por acción del CYP27B1 mitocondrial forma al calcitriol (Fig. 1) [29].

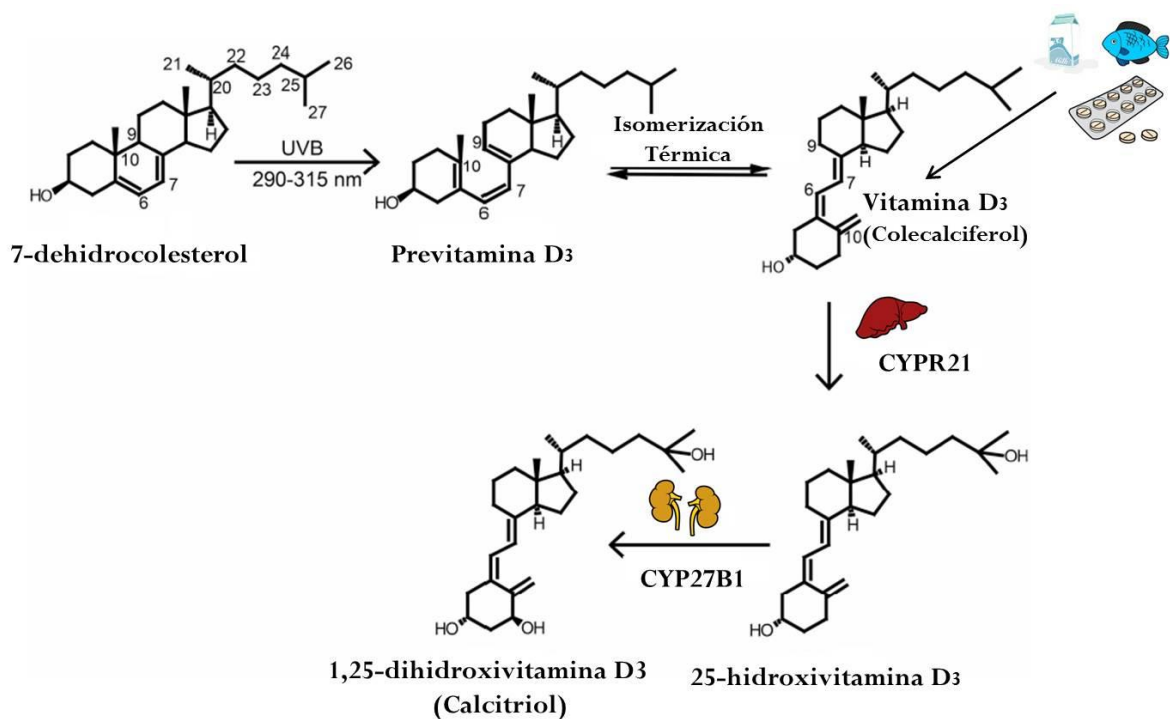


Figura 1. Síntesis del calcitriol. La exposición del 7-dehidrocolesterol a la UV en la piel rompe el anillo B de este precursor, formando la previtamina D₃, la cual por reordenamiento térmico forma la vitamina D₃. La vitamina D₃ se transporta al hígado y subsecuentemente al riñón para que por acción enzimática del CYP21 y del CYP27B1 se forme el calcidiol y el calcitriol respectivamente. Imagen modificada de Jäpelt et. al., 2013 [30].

El proceso catabólico del calcitriol es determinado por el CYP24A1, este citocromo regula las cantidades de calcitriol biodisponible mediante la inactivación y/o la degradación de este secoesteroide a través de la hidroxilación de sus carbonos 23 ó 24 y de subsecuentes oxidaciones y rompimientos estructurales de la molécula que concluyen en la formación de lactona y ácido calcitróico, respectivamente [31].

Aunque lo descrito anteriormente es la ruta clásica de síntesis y degradación del calcitriol, cabe señalar que los citocromos de su metabolismo (CYP27B1 y CYP24A1) han sido localizados en otros tipos celulares, incluyendo entre estos al tejido prostático y líneas celulares de cáncer de próstata [32], donde se ha reportado que el *CYP24A1* se encuentra sobre-expresado [32, 33].

7.2.1 Mecanismos de acción del calcitriol

El calcitriol es una hormona que participa en la regulación de un gran número de funciones en el organismo [22, 31, 34] y sus mecanismos de acción se pueden dividir en dos: el genómico y el no genómico.

En la vía clásica de acción genómica, el calcidiol es transportado por la proteína de unión a vitamina D (DBP por sus siglas en inglés: vitamin D binding protein) a la célula blanco, donde el calcidiol es liberado y difunde a través de la membrana celular debido a su naturaleza lipídica. Sin embargo, también puede entrar con la ayuda de proteínas transmembranales como es la megalina que actúa como un receptor de la DBP, facilitando así la internalización del calcidiol [27].

Una vez dentro de la célula, el calcidiol da lugar al calcitriol, el cual se une al receptor de vitamina D (VDR por sus siglas en inglés: vitamin D receptor), que pertenece a una familia de receptores nucleares y funciona como un heterodímero obligado con el receptor de retinoides RXR [35]. Este complejo (calcitriol/VDR/RXR) reconoce los elementos de respuesta a vitamina D en regiones promotoras de genes blancos, que ocasiona el reclutamiento de co-activadores o co-represores para inducir o reprimir genes, respectivamente (Fig. 2). Por ejemplo induce la expresión de proteínas transportadoras como calbindinas, péptidos antimicrobianos como catelicidina y enzimas como la P-450 aromataasa [27].

Por otro lado, se sabe que el calcitriol ejerce sus efectos biológicos a través de una vía no genómica que implica la activación de receptores membranales [36, 37]. Una vez que el calcitriol se une a este tipo de receptores, se pueden activar diferentes moléculas de señalización generando la producción de segundos mensajeros (Ca^{2+} , AMP cíclico, fosfatidilinositol 3,4,5 trisfosfato), seguida de la activación de proteínas cinasas (MAPK por sus siglas en inglés: mitogen-activated protein kinases) entre otros [35, 38].

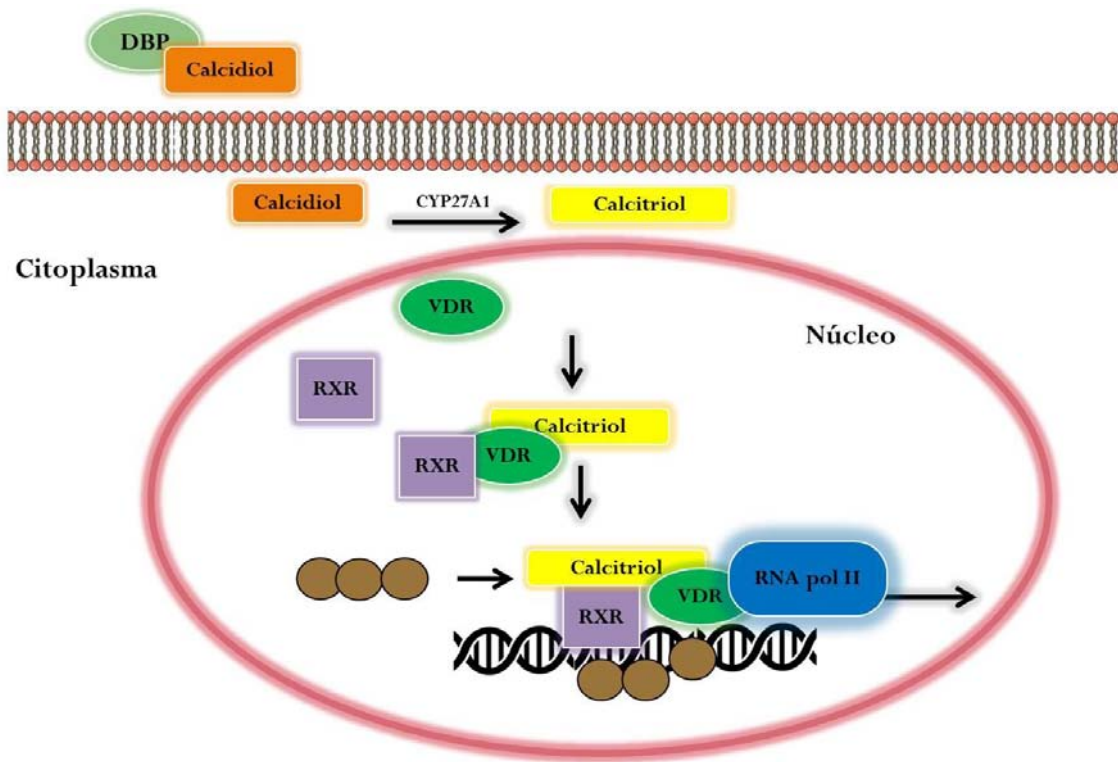


Figura 2. Mecanismo de acción genómico del calcitriol. El calcidiol en circulación es transportado por la DBP y liberada en su célula blanco, donde el calcidiol difunde a través de la membrana para ser convertido en su forma activa; el calcitriol, el cual tras su interacción con el VDR y el RXR se transloca al núcleo, para inducir o reprimir la transcripción de genes blancos.

7.2.2 Efectos antineoplásicos del calcitriol

El calcitriol es una hormona muy versátil al regular múltiples vías de señalización implicadas en la proliferación, apoptosis, diferenciación, inflamación, invasión y/o angiogénesis afectando directa e indirectamente el desarrollo y crecimiento del CP (Fig. 3) [39-47].

Por ejemplo, se ha descrito que en las líneas celulares de cáncer de próstata humano; LNCaP y PC-3, el calcitriol induce al marcador epitelial E-cadherina involucrada en la adhesión celular [39]. Además, inhibe la motilidad e invasión celular mediante la supresión de la expresión de las metaloproteinasas de matriz -2 y -9 (MMPs, por sus siglas en inglés: matrix metalloproteinases) y catepsinas [40-43]. Asimismo, se ha descrito que el calcitriol

induce apoptosis al reducir la expresión de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-2, XIAP y cIAP, lo que en conjunto favorece la vía intrínseca de la apoptosis [44].

Con respecto a la proliferación, en este tipo de células, se ha reportado que el calcitriol favorece la expresión de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas como p21/Cip1, p27/Kip1, y p15/INK4b [45-47]. De manera interesante, Murthy y Weigel, en el 2004 reportaron que uno de los mecanismos utilizados por el calcitriol para inhibir la proliferación de las células PC-3 es mediante la inducción del factor de crecimiento transformante beta 1 y 2 (TGF- β 1 y TGF- β 2, por sus siglas en inglés: transforming growth factor). Lo anterior fue apoyado al incubar las células PC-3 con anticuerpos anti-TGF- β 1 y TGF- β 2, con lo cual el efecto inhibitorio del calcitriol sobre la proliferación se perdía [48]. La inducción del TGF- β por el calcitriol también se ha observado en queratinocitos, células óseas e incluso en células de cáncer de mama y colon, en las cuales el calcitriol también ha mostrado que inhibe su proliferación [49-52].

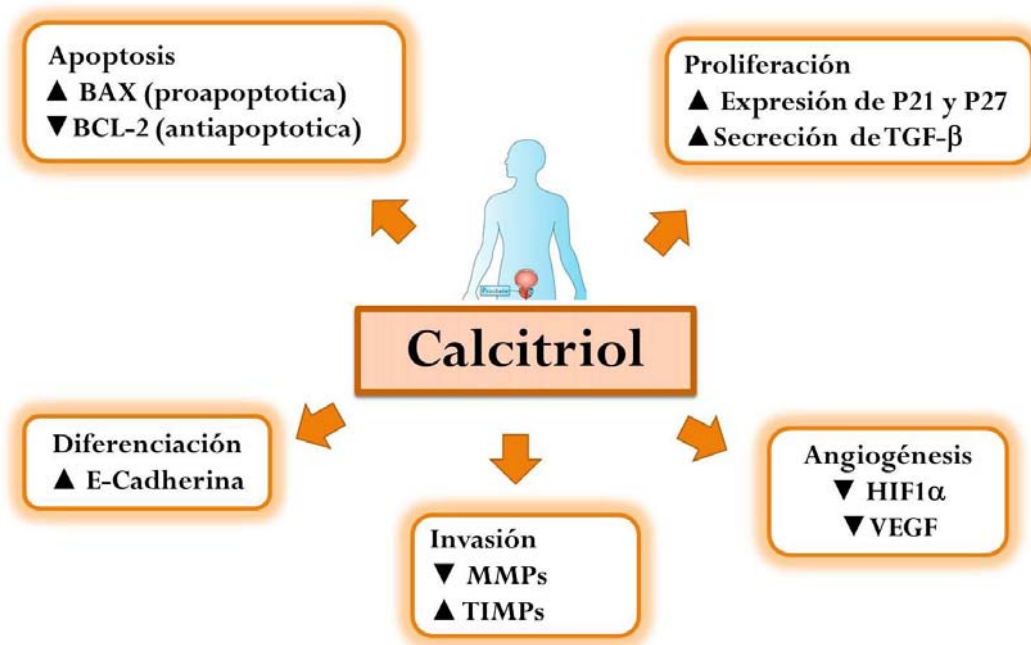


Figura 3. Efectos antineoplásicos del calcitriol en cáncer de próstata. Representación de genes modulados por el calcitriol implicados en vías moleculares clave del crecimiento, proliferación, invasión y/o muerte celular.

7.3 Factor de crecimiento transformante (TGF- β)

El TGF- β es una citocina que pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento transformante, la cual consiste en más de 35 polipeptidos secretados, incluyendo al TGF- β , las activinas y las proteínas morfogénicas del hueso [53]. Los miembros de la familia TGF- β tienen diferentes acciones en la regulación de funciones celulares como: la proliferación celular, la diferenciación, la migración y la deposición de matriz extracelular. Sin embargo, alteraciones en el número y funcionalidad de sus receptores, sus vías de señalización o la concentración de esta citocina, han sido implicados en condiciones patológicas como el cáncer [54, 55].

En los mamíferos, existen tres isoformas del TGF- β ($-\beta$ 1, $-\beta$ 2 y $-\beta$ 3), con un peso molecular de 25 kDa cada una, las cuales, son secretadas como un precursor inactivo llamado TGF- β latente. En condiciones fisiológicas los TGF- β s son activados por el microambiente celular ácido o por proteólisis por las MMPs. Una vez activado el TGF- β se une a sus receptores tipo I y II e inicia su vía de señalización canónica mediada por las proteínas denominadas SMAD [56]. No obstante, se ha descrito que también pueden activar otras vías de señalización pertenecientes a los miembros de las MAP cinasas como ERK1/2 (por sus siglas en inglés: extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinases) y p38 (mitogen activated protein kinases) entre otras [57, 58].

El mecanismo de activación de los receptores para las tres isoformas comienza en la membrana plasmática, cuando un dímero de TGF- β se une al receptor tipo II (T β RII) permitiendo que pueda interactuar con el receptor tipo I (T β R-I), formándose así un complejo heterotetramérico (dos moléculas de T β R-I y dos moléculas de T β R-II) [59]. Cuando esto ocurre, el receptor T β RII transfosforila al receptor tipo I en el dominio GS (llamado así por ser rico en glicinas y serinas), que se encuentra cerca de la región transmembranal. Esta fosforilación permite que el T β R-I se active y pueda transmitir las señales del TGF- β al interior celular por medio de la fosforilación de las proteínas SMAD reguladoras 2 y 3 (R-SMAD 2 y 3) que a su vez formaran un complejo con la SMAD 4 [59]. El complejo transcripcional formado se trasloca al núcleo llevando a cabo la regulación de genes específicos (Fig. 4).

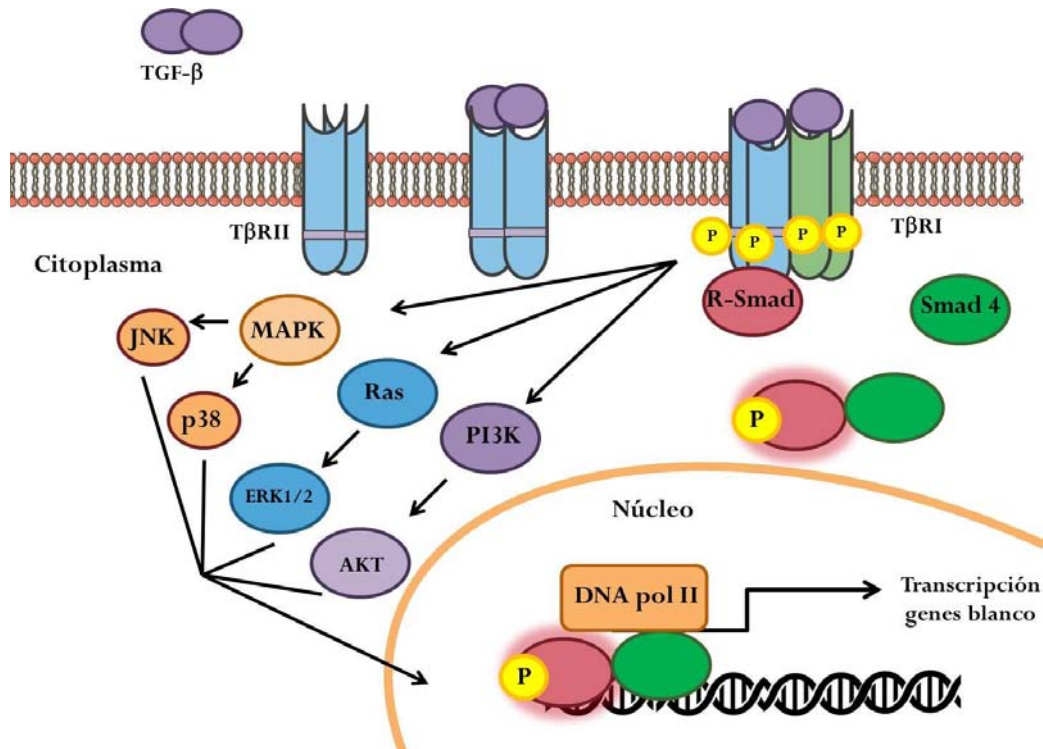


Figura 4. Vías de señalización del TGF-β. Cualquiera de las tres isoformas del TGF-β se unen al receptor TβRII. La unión del ligando a TβRII produce la fosforilación y activación de TβRI por TβRII. Después de la fosforilación (P), las R-SMADs (SMAD2 y SMAD3) son fosforiladas y se asocian la SMAD4, los cuales se translocan al núcleo. En el núcleo, los complejos heteroméricos SMAD junto con otros factores de transcripción interactúan con promotores que responden al TGF-β para regular la transcripción de genes blancos. Adicionalmente, el TGF-β puede activar otras vías como ERK, AKT y MAPKs.

7.3.1 TGF-β y cáncer

Aunque es catalogado como un factor de crecimiento, el TGF-β, es un potente supresor de tumores e inhibidor de la proliferación celular por su capacidad para inhibir el crecimiento de las células epiteliales y linfoides, de las que surgen la mayoría de los cánceres humanos. Esto lo hace mediante la inducción de la expresión de p21 y p15 por la activación de las proteínas SMADs [55]. En particular, se ha reportado que en la línea celular de próstata RWPE-1 y células epiteliales de rata, el TGF-β inhibe la proliferación e induce la apoptosis celular respectivamente [60, 61].

No obstante, el papel que tiene el TGF- β en la carcinogénesis es complejo ya que puede provocar un efecto supresor o promotor de tumores y esto depende de la etapa de carcinogénesis y la capacidad de respuesta de la célula tumoral [54]. En etapas iniciales del tumor y en células epiteliales normales, se ha observado que TGF- β funciona como un factor anti-proliferativo; ya que inhibe el crecimiento celular por inducir la apoptosis y la detención del ciclo celular (Fig. 5) [55].

Sin embargo, la pérdida de la respuesta anti-proliferativa al TGF- β se considera a menudo como un paso importante en la progresión del cáncer [62]. Se ha reportado que uno de los mecanismos por los cuales las células evaden la respuesta al TGF- β es por la pérdida de la expresión de sus receptores [62-64]. En particular, la línea celular de cáncer de próstata humano LNCaP no expresa el receptor T β RII y en consecuencia no responde al efecto anti-proliferativo del TGF- β [63]. Además, algunos estudios han identificado altas concentraciones plasmáticas del TGF- β 1 como predictor de la progresión del CP hacia estados más agresivos e invasivos como el CRPC [65-67]. No obstante, usando las líneas celulares DU-145 y PC-3, ambas con un estado de agresividad mayor a las LNCaP, se han reportado datos controversiales; ya que contrario a lo esperado, ambas líneas han mostrado ser sensibles al efecto anti-proliferativos del TGF- β [48, 68, 69]. Sin embargo, el papel del TGF- β en estas líneas celulares sigue controversialmente discutido [57, 60].

Por otro lado, el TGF- β conduce a la progresión de la transición epitelio-mesenquima (EMT por sus siglas en inglés: epithelial-to-mesenchymal transition) en CP, este proceso implica la pérdida de la expresión de genes epiteliales como E-cadherina y la adquisición de la expresión de los genes mesenquimales como la vimentina, que propicia que las células tumorales adquieran motilidad e invasividad [54, 70]. Además, el TGF- β aumenta la expresión y la actividad enzimática de la MMP-2 y MMP-9, en las líneas PC-3, DU-154 y LNCaP entre otros [71-75] (Tabla 1).

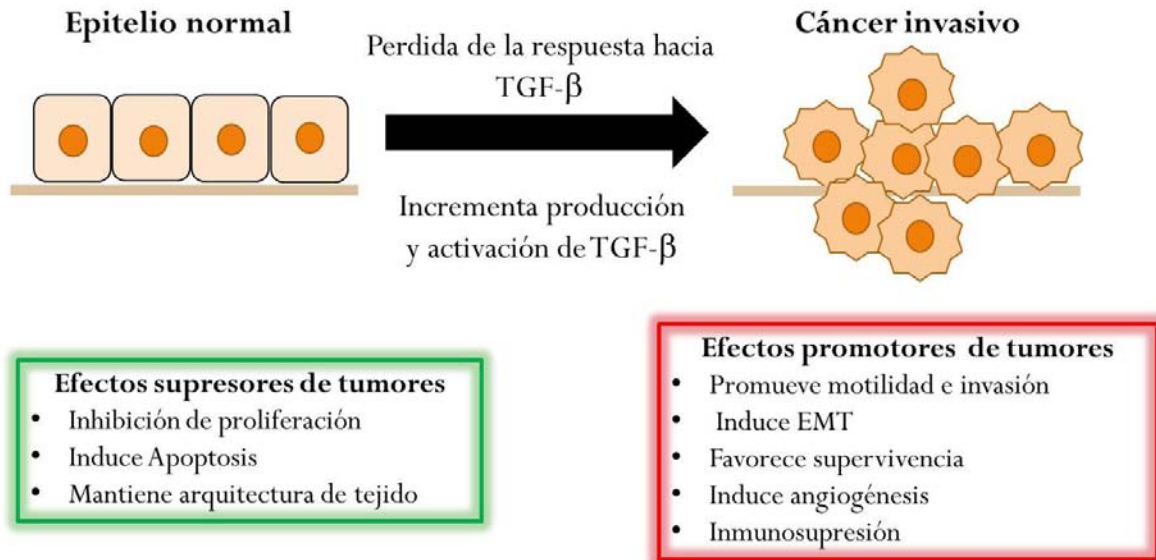


Figura 5. Papel bifásico de TGF- β en la progresión tumoral. El TGF- β ejerce efectos antiproliferativos en las células epiteliales normales y en el desarrollo temprano del tumor. Sin embargo, a medida que los tumores se desarrollan, comienzan a producir más TGF- β y se vuelven resistentes a los efectos supresores del crecimiento.

7.4 Metaloproteinasas de matriz (MMPs)

Las MMPs son una familia de endopeptidasas (escinden enlaces peptídicos internos) dependientes de iones Zn^{2+} cuya función normal es remodelar la matriz extracelular para la reparación de heridas, crecimiento y desarrollo de organismos, así como la respuesta inmune. Sin embargo, su producción exacerbada está implicada en el desarrollo de distintas enfermedades desde trastornos pulmonares hasta la progresión de cáncer [76]. La degradación e invasión de la membrana basal y matriz extracelular por las células tumorales, disminuye la adhesión celular y promueve la motilidad e invasión que le permitirán diseminarse a través de los vasos y torrente sanguíneos para colonizar tejidos distantes de los que les dieron origen (metástasis) [77, 78]. En este proceso intervienen las MMPs y en particular la exacerbada producción de la MMP-2 y la MMP-9 se ha asociado con la progresión del CP [79-82].

En el humano existen al menos 23 MMPs y se clasifican en colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matrilisinas y las de tipo membranales (MT-MMPs por sus siglas en inglés membrane-type MMPs) [83] (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las MMPs de acuerdo a su especificidad de sustrato, (modificada de Nagese et. al., 2006 [83]).

| Grupo | MMP | Principales sustratos |
|------------------------------|------------|--|
| Colagenasas | | Colágenos fibrilares tipos I, II, III, VII, VIII y X, gelatina, agrecano |
| Colagenasa 1 | MMP-1 | |
| Colagenasa 2 | MMP-8 | |
| Colagenasa 3 | MMP-13 | |
| Gelatinasas | | Gelatina, tipos de colágeno IV, V, VII, X y XIV, gelatina, elastina, galectina-3, agrecano, fibronectina |
| Gelatinasa A | MMP-2 | |
| Gelatinasa B | MMP-9 | |
| Estromelisinias | | Proteoglicanos, fibronectina, laminina, caseína, gelatina, colágeno de los tipos III, IV, IX y X |
| Estromelisinina 1 | MMP-3 | |
| Estromelisinina 2 | MMP-10 | |
| Matrilisinias | | Fibronectina, laminina, colágeno tipo IV, proteoglicanos, VE-cadherina |
| Matrilisinina 1 | MMP-7 | |
| Matrilisinina 2 | MMP-26 | |
| Estromelisinina 3 | MMP-11 | |
| MMPs de tipo membrana | | Fibronectina, laminina |
| MT1-MMP | MMP-14 | |
| MT2-MMP | MMP-15 | |
| MT3-MMP | MMP-16 | |
| MT4-MMP | MMP-17 | |
| MT5-MMP | MMP-24 | |
| MT6-MMP | MMP-25 | |

La mayoría de las MMPs son secretadas como zimógenos y comparten estructuras similares que constan de cinco elementos estructurales. En primer lugar, el dominio N-terminal que contiene un péptido señal que dicta la localización de la MMP. En segundo lugar, el dominio pro-péptido (80 aa de longitud) con un residuo de cisteína que interactúa con el ion Zn^{2+} catalítico, impidiendo su asociación con una molécula de agua y, por tanto, inactivando a la MMP hasta que este es eliminado. En tercer lugar, el dominio catalítico (170 aa aproximadamente) que contiene dos iones de Zn^{2+} (uno catalítico y uno estructural) que se coordinan con el motivo de unión de zinc HEXXHXXGXXH. La tercera subunidad de las MMPs es una región enlazadora de longitud variable. Por último, el dominio de hemopexina (200 aa de longitud) que forma una estructura de paleta de hélice la cual les confiere especificidad de sustrato [76, 84, 85].

Algunos miembros de la familia tienen ligeras diferencias en su organización subunitaria; en el caso particular la MMP-2 y MMP-9 contienen tres repeticiones de un motivo de fibronectina tipo II dentro del extremo N-terminal que se unen a gelatina (Fig. 6) [86].

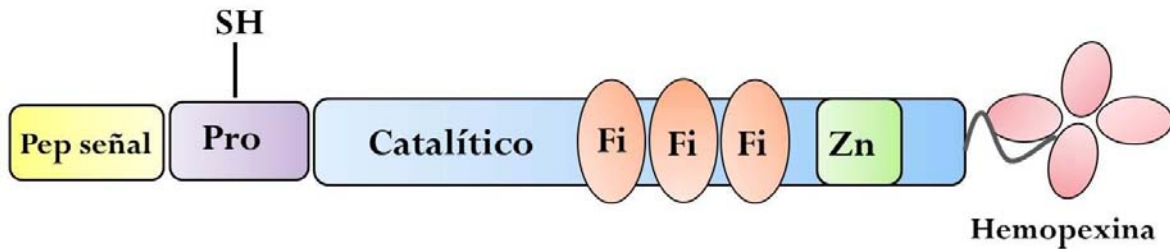


Figura 6. Estructura de la MMP-2 y la MMP-9

La actividad catalítica de las MMPs es controlada por sus inhibidores tisulares específicos (TIMPs por sus siglas en inglés: tissue inhibitors of metalloproteinases). En los humanos se han caracterizado cuatro TIMPs designados como TIMP-1, -2, -3 y -4. Estos pueden estar en forma soluble como el TIMP-1, -2 y -4, o estar unidas a la matriz extracelular como el TIMP-3 [87].

Estructuralmente, los cuatro TIMPs, tienen una longitud de 184-194 aa y contienen dos dominios (un dominio N-terminal y uno C-terminal) y cada uno contiene tres enlaces disulfuro conservados. En particular el dominio N-terminal se pliega específicamente dentro de sí mismo y es responsable de bloquear el sitio activo de las MMPs en relación 1:1 [86, 88].

De manera general, todos los TIMPs son capaces de inhibir la actividad de todas las MMPs conocidas; sin embargo, la eficacia de la inhibición de MMP varía con cada TIMP. Por ejemplo, el TIMP-1 es un fuerte inhibidor de muchas MMPs pero se une preferentemente a la forma activa e inactiva de la MMP-9 [89]. Por otro lado el TIMP-2 se une a la pro-MMP-2 y MMP-2 activa [83, 90, 91].

Lo anterior es importante, ya que estudios recientes han demostrado que la disminución en la expresión de los TIMPs, está relacionada con la diseminación de diferentes tipos de cáncer como el de pulmón, colon, mama y próstata [92, 93]. De hecho, en el CP se ha detectado baja expresión proteínica del TIMP-1 y TIMP-2 [92, 94]. Por el contrario, se ha reportado que el aumento de los niveles exógenos del TIMP-1 en las células PC-3, disminuye la diseminación de esta línea celular [95]. Lo cual destaca la importancia

de los TIMPs para mediar el proceso invasivo de células cancerosas y así conservar la homeostasis del tejido prostático al restringir la actividad de las MMPs.

Considerando diferentes estudios *in vitro*, en los cuales se ha reportado que el TGF- β 1 y TGF- β 2 promueven la expresión, secreción y actividad de la MMP-2 y MMP-9 mientras que el calcitriol las inhibe [41, 43, 71-75, 96] (Tabla 2), resulta interesante indagar si la combinación de estos compuestos regulan la expresión génica y proteica de la MMP-2 y MMP-9 así como de sus principales inhibidores (TIMP-1 y TIMP-2) en esta línea celular de CP.

Tabla 2. Efectos del calcitriol y del TGF- β sobre las MMPs y los TIMPs en líneas celulares de cáncer de próstata.

| Molécula | Calcitriol // Tipo celular | TGF- β 1 y - β 2// Tipo celular |
|----------|--|--|
| MMP-2 | ▼ Actividad enzimática // LNCaP, PC-3 y DU-145 [42]. | ▲ Actividad enzimática// PC-3 y Tsu-Pr1 [72,74]. |
| MMP-9 | ▼ Expresión génica // LNCaP, PC-3 y DU-145 [41]. | ▲ Expresión génica // ND-1, Tsu-Pr1 y DU-145 [72]. |
| | ▼ Actividad enzimática // PC-3 y DU-145 [41, 43]. | ▲ Producción protéica // PC-3 y DU-145 [74,80]. |
| | | ▲ Secreción protéica // PC-3 [68,71]. |
| | | ▲ Actividad enzimática // PC-3 [72,74]. |
| TIMP-1 | ▲ Producción protéica // PC-3 [41]. | ▲ Expresión génica // MDA-MB-231* [75]. |
| TIMP-2 | --- | --- |

▲ Aumenta

▼ Disminuye

* Línea celular de cáncer de mama

8. METODOLOGÍA

8.1 Cultivo celular

En este estudio se utilizó como modelo biológico a la línea celular de cáncer de próstata humana PC-3 (CRL-1435™) con bajo número de pase (5-10 pases). Las células PC-3 fueron obtenidas de ATCC (por sus siglas en inglés; American Type Culture Collection) y mantenidas en medio RPMI 1640 (Gibco®, EE. UU.) suplementado con 5 % de suero fetal bovino (SFB) (Biowest, EE. UU.), 100 mg/mL de penicilina estreptomycin (Gibco® EE. UU.) e incubadas a 37°C en una atmósfera de 5 % CO₂ y 96 % de humedad.

8.2 Ensayos de crecimiento celular

El crecimiento celular se evaluó mediante la técnica de la sulforodamina B (SRB) de acuerdo al protocolo de Vichai y Kirtikara [97]. De manera general, se sembró en cajas de 96 pozos de poliestireno (Costar 3590, EE. UU.), una curva estándar de 250, 500, 1250, 1500, 1750 y 2000 células en pozos por triplicado y un total de 1250 células por pozo en el resto de la caja, dejando la periferia libre de células (Fig. 7). Las placas fueron incubadas por 24 h a 37°C a una atmósfera de 5 % CO₂ y 96 % de humedad. Para los ensayos, las células fueron tratadas por sextuplicado con una curva de calcitriol (0.1 – 100 nM) (Sigma, EE. UU.) y TGF-β1 y TGF-β2 (0.1, 1, 5, 10 y 50 ng/mL) (Prepro Tech, EE. UU.). Adicionalmente, se utilizó el calcitriol (10 nM) con TGF-β1 o TGF-β2 (200 pM) para realizar los ensayos de co-incubación. Los tratamientos se realizaron en medio DMEM (Gibco®, EE. UU.) suplementado con 5 % de SFB y 100 mg/ml de penicilina-estreptomycin y las células fueron incubadas durante 6 días, sin cambio de medio.

Concluido el tiempo de incubación y sin retirar el medio, a cada pozo se le añadió 100 µl de ácido tricloroacético al 10 % y se incubaron a 4°C por 1 h para fijar las células. Posteriormente, las placas se lavaron con agua corriente tres veces y se esperó a que secaran a temperatura ambiente. Una vez secas para teñir las células se añadieron 100 µl de la solución SRB (0.057 % SRB, 1 % ácido acético) a cada pozo, ya que éste compuesto se une a los aminoácidos básicos en condiciones ligeramente ácidas. Se incubó por 30 min a temperatura ambiente y los pozos se lavaron con 300 µl de ácido acético al 1% para eliminar el exceso de SRB. Las placas se sacudieron y se secaron a temperatura ambiente dejando invertida la placa sobre una cama de papel.

Posteriormente, se añadió a cada pozo 200 µl de una solución de Tris-Base 10 mM con la finalidad de disolver la SRB adherida a las células y se dejaron en agitación suave durante 20 min. En breve, la placa fue leída en el espectrofotómetro Synergy HT (Biotek, EE. UU.) a una densidad óptica de 510 nm en donde la absorbancia fue directamente proporcional a la cantidad de células por pozo.

Con o sin células

Solución salina

Blanco /medio

Curva celular

Caja 0

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|---|------|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | 250 | | | | | | | | | | |
| C | | 500 | | | | | | | | | | |
| D | | 1250 | | | | | | | | | | |
| E | | 1500 | | | | | | | | | | |
| F | | 1750 | | | | | | | | | | |
| G | | 2000 | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Caja de tratamientos (Tx)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|---|------|---|---|--------------|---|---|---|--------------|----|----|----|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | 250 | | | Vehículo | | | | TGF-β2 | | | |
| C | | 500 | | | 1250 células | | | | 1250 células | | | |
| D | | 1250 | | | Cal -8 | | | | Cal-8/TGF-β1 | | | |
| E | | 1500 | | | 1250 células | | | | 1250 células | | | |
| F | | 1750 | | | TGF-β1 | | | | Cal-8/TGF-β2 | | | |
| G | | 2000 | | | 1250 células | | | | 1250 células | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Figura 7. Cajas de ensayos de proliferación.

8.3 Estudios de expresión génica

En cajas de 6 pozos (Thermo Fisher, Corea) fueron sembradas 250 mil células y 24 h después de la siembra las células fueron tratadas e incubadas con calcitriol, TGF- β 1 y TGF- β 2, solos (curva de cada uno) o en combinación a las concentraciones antes descritas por 24 h adicionales.

8.3.1. Extracción del RNA

Para la extracción del RNA se utilizó el reactivo comercial Trizol (Sigma-Aldrich, EE. UU.) de acuerdo a la técnica de Chomczynski y Sacchi [98]. Para ello, a cada pozo se les añadió 600 μ l de Trizol y las células fueron raspadas y recolectadas en tubos de 1.5 ml, a los cuales se les adicionó 200 μ l de cloroformo frío, se les agitó con un vortex y se centrifugaron (microcentrífuga Eppendorf 5417R, EE. UU.) por 20 min a 13672 g a 4°C. A continuación se recuperó la fase acuosa transparente superior de cada tubo y se transfirió cada muestra a un nuevo tubo de forma independiente y se les adicionó a cada tubo 500 μ l de isopropanol frío, se les agito y se centrifugaron por 20 min más a 13672 g a 4°C. Concluido el tiempo, se decantó el sobrenadante y el botón celular formado se resuspendió en 1 ml de etanol al 75% mediante agitación con el uso del vortex, y se centrifugó por 20 min a 13702 rpm a 4 °C. Al término se decantaron los tubos y se dejaron invertidos para secar el exceso de etanol (Fig.8). Finalmente, el precipitado de RNA antes de su secado total se resuspendió con 21 μ l de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

La cuantificación del RNA se evaluó en el espectrofotómetro Synergy HT (BioTek, EE. UU) para lo cual se usaron 2 μ l de la muestra en la placa y se dió paso a la lectura. Éste equipo reporta de forma automática la concentración del RNA en μ g/ μ l y la relación de la absorbancia a 260/280 nm. El valor de esta relación se utilizó como indicador de pureza del RNA, en la cual un valor de 1.8-2.0 fue considerado para hacer el DNA complementario correspondiente.

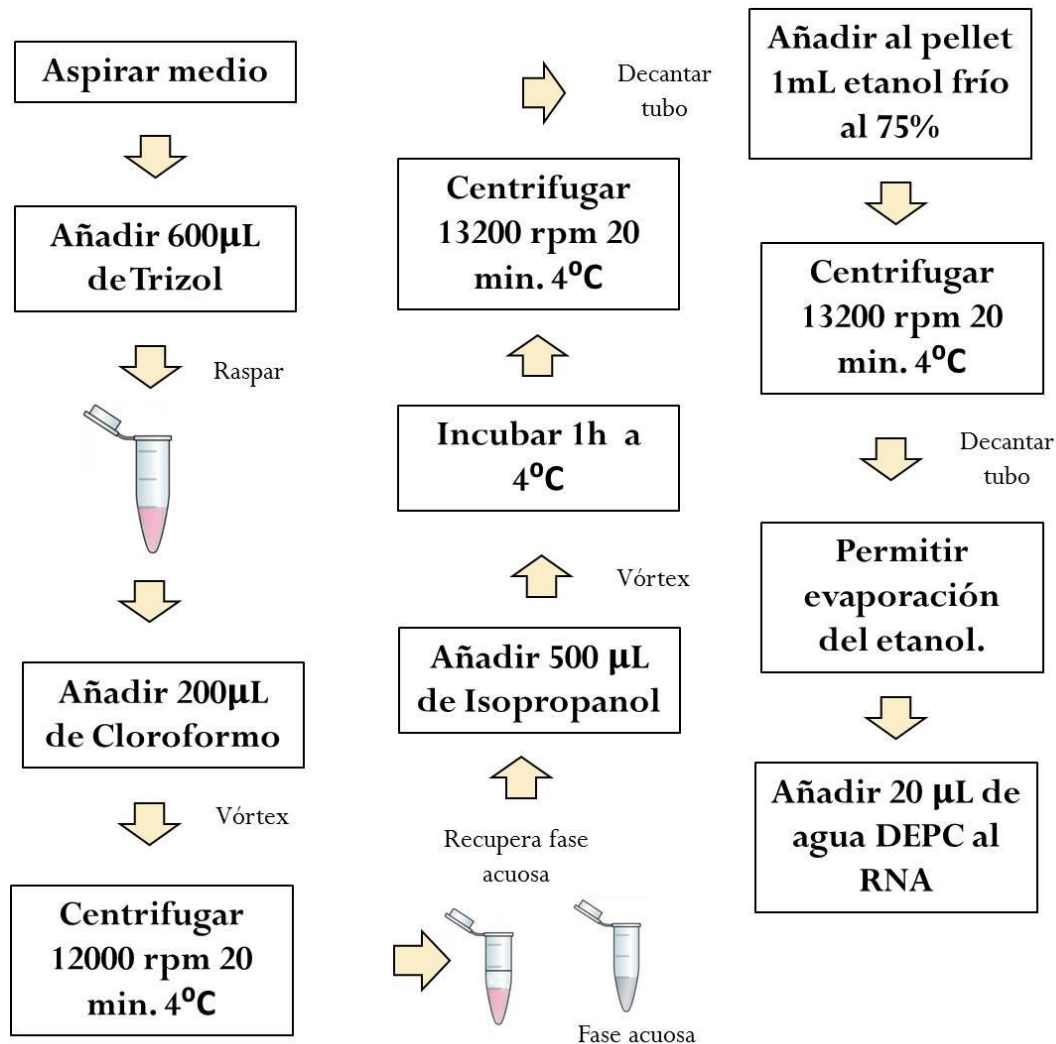


Figura 8. Extracción del RNA mediante la técnica de Chomczynski y Sacchi [98].

8.3.2 Obtención del DNA complementario

Para la síntesis del DNA complementario (cDNA) se empleó el kit comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche, Alemania). De acuerdo a las instrucciones del fabricante, en un tubo estéril de 200 µl se colocaron 2 µg de RNA junto con 1 µl de Oligo dT 50 µM y agua grado PCR para ajustar un volumen final de 15 µl por tubo. Posteriormente, los tubos fueron colocados en el termociclador Veriti (Applied Biosystems, Singapur) y se mantuvieron a 65 °C durante 10 min para favorecer la unión de las timidinas

del Oligo-dT a las bases complementarias de adenina de las colas poli A de los RNA mensajeros. Después, las muestras se enfriaron a 4°C durante 1 min y se les agregó a cada muestra 7 µl de una mezcla, previamente preparada, que contenía; 4 µl del amortiguador 5X, 0.5 µl del inhibidor de RNAasa (40 U/µL), 2 µl de la mezcla de los desoxinucleotidos (dNTPs, 10 nM) y 0.5 µl de la enzima transcriptasa reversa (20 U/µl). La reacción de síntesis del cDNA se llevó a cabo a 55°C por 30 min para la alineación y por ultimo a 85°C por 5 min para la inactivación de la enzima. El cDNA obtenido se guardó a -20°C hasta su amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

8.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

La qPCR se llevó a cabo usando el kit comercial LightCycler Taqman Master (Roche, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para lo cual, 2 µl del cDNA de interés previamente obtenido, se resuspendió en una mezcla que contenía 5.7 µl de agua grado PCR, 0.1 µl del iniciador sentido y antisentido (20 µM), 0.1 µl de la sonda de hidrólisis y 2 µl de la DNA polimerasa TaqMan® (Master mix, 5X) obteniendo un volumen final de reacción de 10 µl. Para la amplificación se utilizaron placas de 96 pozos que tras la colocación de la muestra sobre la mezcla, se centrifugó a 1500 rpm durante 2 min y se colocó en un termociclador LightCycler® 480 II (Indianapolis, EE. UU.), previamente programado para realizar la qPCR según las condiciones que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Protocolo de amplificación del cDNA por qPCR

| Ciclos | Temperatura (°C) | Evento | Tiempo (s) |
|--------|------------------|---|------------|
| 1 | 95 | Activacion de la TaqMan® y desnaturalización inicial del cDNA | 600 |
| 45 | 95 | Desnaturalizacion del cDNA | 10 |
| | 60 | Alineamiento | 30 |
| | 72 | Alargamiento | 1 |
| 1 | 40 | Enfriamiento | 10 |

Los iniciadores y las sondas específicas (Tabla 4) fueron diseñados usando la Universal Probe Library Design Center de Roche. Los resultados se analizaron empleando el método de cuantificación relativa $\Delta\Delta C_t$ ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), referidos a la condición experimental sin tratamiento.

Tabla 4. Secuencias de los iniciadores y sondas utilizadas en la qPCR

| Gen | Orientación del oligonucleótido | | Amplicón (nt) | Numero de accesión | No. sonda |
|---------------|---------------------------------|---------------------------|---------------|--------------------|-----------|
| | Sentido | Antisentido | | | |
| <i>MMP-2</i> | ATAACCTGGATGCC GTCGT | AGGCACCCTTGAAGA AGTAGC | 63 | N_001302510.1 | 70 |
| <i>MMP-9</i> | GCCACCCGAGTGTA ACCATA | GAACCAATCTCACCG ACAGG | 67 | NN_004994.2 | 6 |
| <i>TIMP-1</i> | GGGCTTCACCAAGA CCTACA | TGCAGGGGATGGATA AACAG | 27 | NM_003254.2 | 76 |
| <i>TIMP-2</i> | GAAGAGCCTGAACC ACAGGT | CGGGGAGGAGATGTA GCAC | 85 | NM_003255.4 | 43 |
| <i>GAPDH</i> | GCAGCTCGACTGGA GTGAC | CATCATGGCCATCAAA ACAA | 66 | NM_002046.3 | 60 |

8.4 Cuantificación de la secreción de la MMP-2 y de la MM-9

La MMP-2 y la MMP-9 secretadas al medio de cultivo fue cuantificada mediante el ensayo de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas: por sus siglas en inglés; enzyme-linked immunosorbent assay) empleando el estuche kit Human MMP-2 y MMP-9 DuoSet (R&D systems, EE. UU). El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pozos (Costar, Corning Incorporated, EE. UU) con los medios obtenidos después de 48 h en presencia de los diferentes tratamientos con calcitriol y TGF- β 1 y TGF- β 2 solos y en combinación. En breve, se diluyó el anticuerpo de captura a la concentración de trabajo (2 μ g/ml y 1 μ g/ml para la MMP-2 y la MMP-9 respectivamente), se añadió 100 μ l de esta solución a cada pozo y se incubó toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, la placa se lavó un total de tres veces con solución de lavado (PBS, 0.05 % y Tween 20). A continuación la placa se bloqueó añadiendo 300 μ l de solución de bloqueo (PBS, 1% BSA) y se incubó durante 1 h, concluido el tiempo se lavó la placa.

Posteriormente, se adicionaron 100 μ l de los estándares y 200 μ l del medio problema para la MMP-2 y la MMP-9; una vez hecho lo anterior se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las placas y el anticuerpo de detección, conjugado con biotina, se diluyó a la concentración de trabajo (10 ng/ml y 100 ng/ml para la MMP-2 y -9, respectivamente) y a partir de ésta se añadieron 100 μ l por pozo y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. En el caso del anticuerpo de detección de la MMP-9 se diluyó con suero de cabra inactivado al 2 %.

Pasado el tiempo de incubación las placas de lavaron y se incubaron por 20 min con 100 µl de estreptoavidina conjugada con peroxidasa de rábano, al término de este tiempo se lavó la placa y se añadieron 100 µl de la solución sustrato (peróxido de hidrógeno) durante 20 min. La reacción se detuvo con 50 µl de solución de paro (H_2SO_4 2 N). La placa fue leída a en un espectrofotómetro Multiskan MS fotómetro tipo 352 (Labsystems, Finlandia) a una longitud de onda de 450 nm y los resultados fueron obtenidos en pg/ml normalizados con cantidad total de proteína.

8.5 Análisis Estadístico

Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar. Las diferencias estadísticas de los ensayos de proliferación, expresión génica y secreción proteica fueron determinados mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba Holm-Sidak, utilizando el software SigmaStat 3.5. Valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

9. RESULTADOS

9.1 Efecto del calcitriol, del TGF- β 1 y del TGF- β 2 sobre el crecimiento celular del cáncer de próstata PC-3

El efecto del calcitriol y los TGF- β s sobre el crecimiento celular de las PC-3 fue evaluado después de seis días de incubación. Como se aprecia en la figura 9, tanto el calcitriol (A) como el TGF- β 1 y el TGF- β 2 (B) inhiben significativamente el crecimiento celular de las PC-3.

En efecto, el calcitriol inhibió significativamente el crecimiento celular en un 30 y 35% a partir de la concentración de 10 y 100 nM respectivamente, con respecto al control (Fig. 9A). En cuanto a los TGF- β 1 y TGF- β 2, el efecto inhibitorio fue significativo para los dos a la concentración de 200 pM, con una inhibición del 40 y 35% respectivamente con respecto al control y a la concentración de 400 pM solo para TGF- β 2 (Fig. 9B).

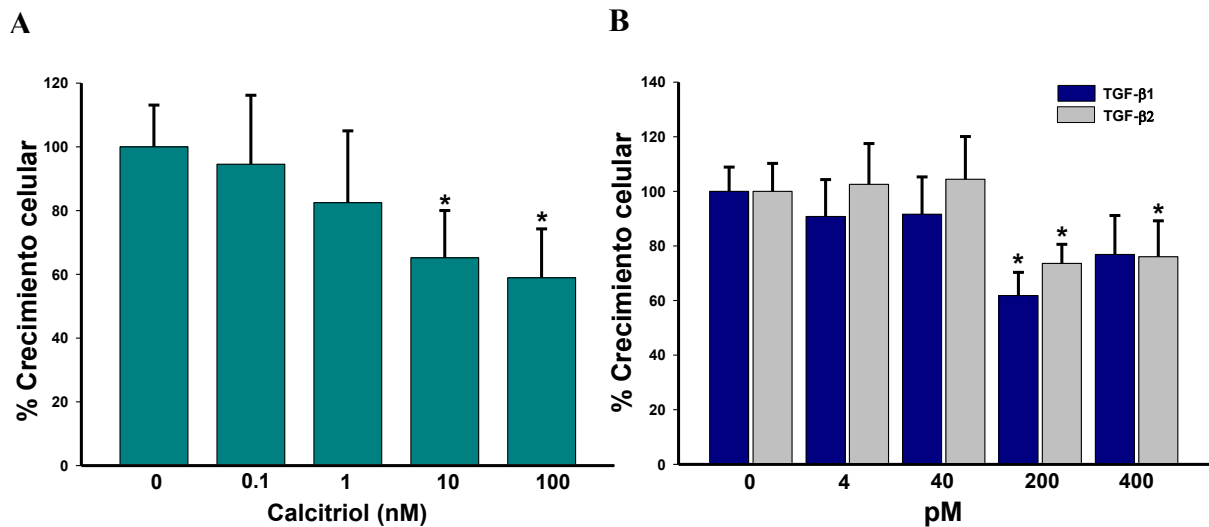


Figura 9. Efecto del calcitriol y TGF- β s en el crecimiento celular. Las células PC-3 fueron incubadas con calcitriol (A) y TGF- β 1 y TGF- β 2 (B) durante de 6 días de tratamiento. $n=5 \pm$ DE
* $p < 0.05$.

De manera interesante, se observó que la combinación del calcitriol con el TGF- β 1 o TGF- β 2 inhibió aún más el crecimiento celular ($p < 0.05$) obteniendo un 70% de inhibición con respecto al control y aproximadamente un 50 % al compararlo con la incubación por separado de cada tratamiento (Fig. 10).

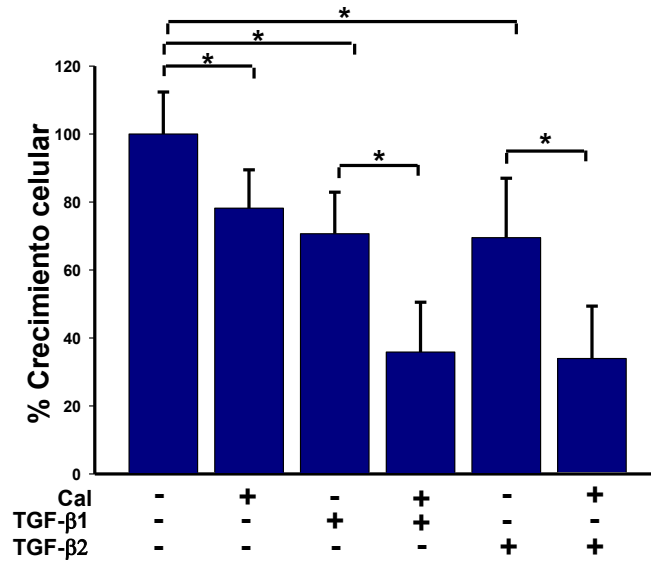


Figura 10. Efecto del calcitriol en combinación con el TGF- β 1 y TGF- β 2 en el crecimiento celular. Las células PC-3 fueron incubadas con calcitriol (10 nM) y el TGF- β 1 y TGF- β 2 (200 pM) solos o en combinación durante de 6 días de tratamiento. $n=3 \pm DE$ * $p < 0.05$.

9.2 Efecto del calcitriol sobre la expresión génica del *CYP24A1*

Considerando que el *CYP24A1* es un blanco molecular del calcitriol, se decidió estudiar a manera de control este gen en presencia y ausencia del calcitriol para validar la funcionalidad de la hormona en nuestro modelo experimental. Los resultados mostraron que la expresión génica del *CYP24A1* fue significativamente inducida ($p < 0.05$) de manera dependiente de la concentración del calcitriol (Fig. 11).

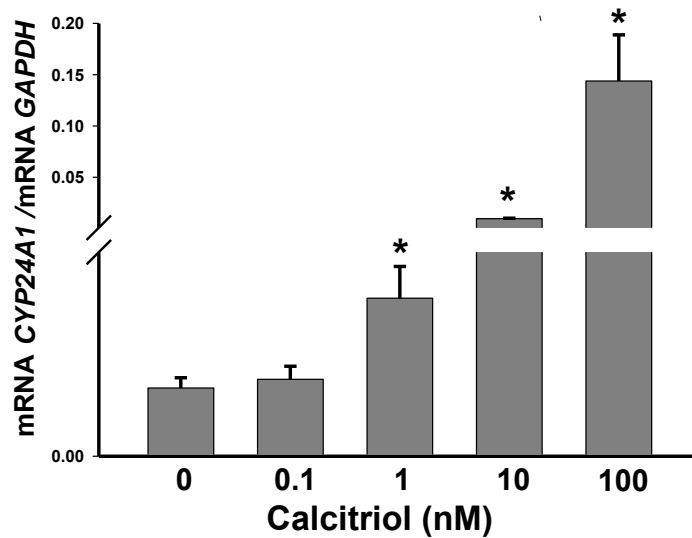


Figura 11. Efecto del calcitriol sobre la expresión génica del *CYP24A1*. Las células PC-3 fueron incubadas en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de calcitriol durante 24 h. Gráfica representativa de un experimento \pm DE * $p < 0.05$ con respecto al control (0).

9.3 Efecto del tratamiento con calcitriol, del TGF- β 1 y del TGF- β 2 sobre la expresión génica de la *MMP-2* y la *MMP-9*

Se evaluó la expresión génica de la *MMP-2* y de la *MMP-9* en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de calcitriol (0.1 a 100 nM) y del TGF- β 1 y TGF- β 2 (4, 40, 200, y 400 pM) durante 24 h. Como se aprecia en la figura 12, los resultados mostraron que el calcitriol inhibió la expresión génica de ambas MMPs mientras que el TGF- β 1 y el TGF- β 2 la estimuló.

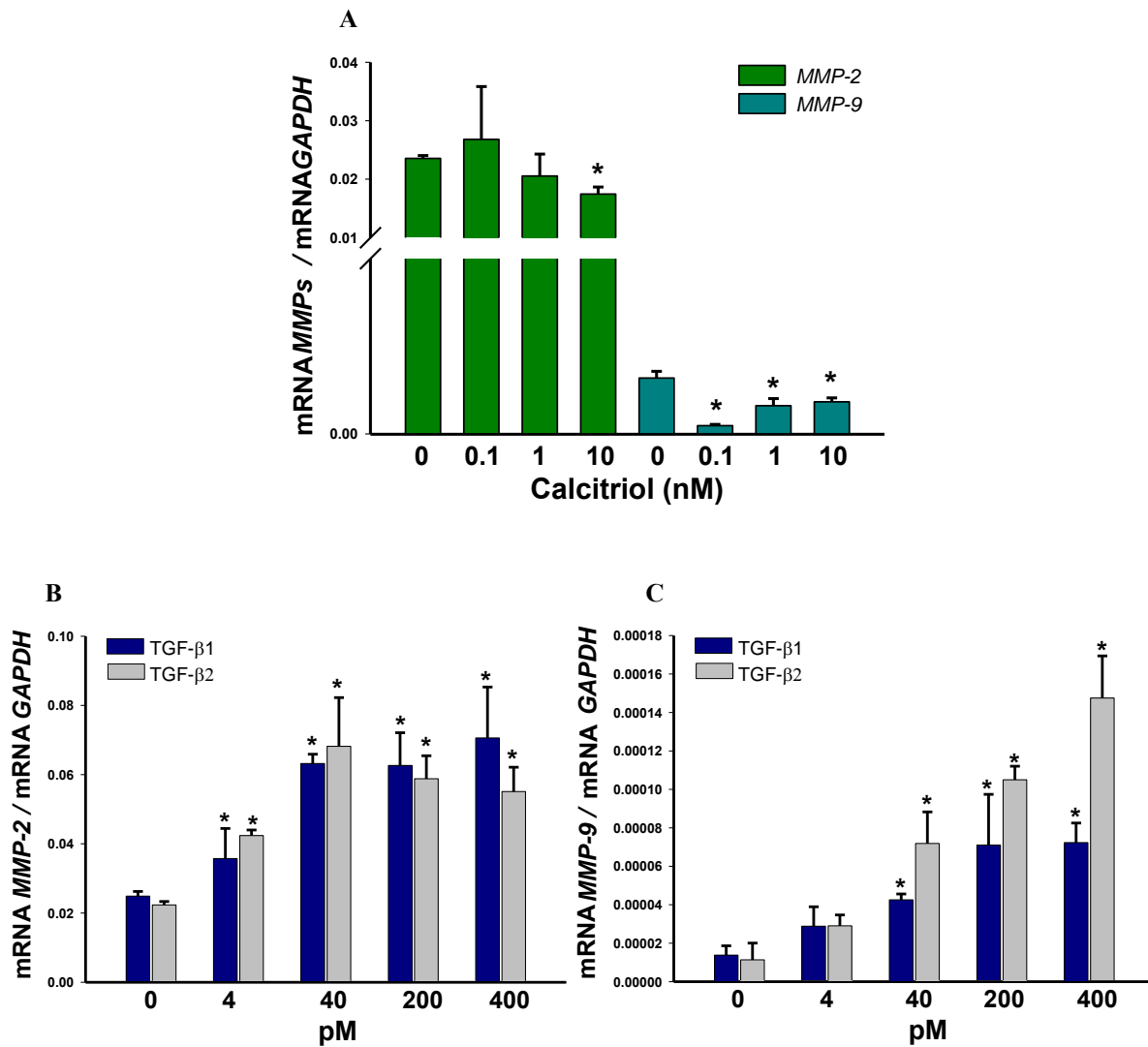


Figura 12. Efecto del calcitriol y de los TGF-βs sobre la expresión de las MMPs. Las células PC-3 fueron tratadas con diferentes concentraciones de calcitriol (A) y de TGF-β1 y TGF-β2. Los efectos de la expresión génica sobre la MMP-2 (B) y MMP-9 (C) fueron evaluadas después de 24 h de tratamiento. n=4 ± DE *p < 0.05.

9.4 Efecto del calcitriol, del TGF-β1 y del TGF-β2 solos o en combinación sobre la expresión génica de los TIMP-1 y TIMP-2

Controlar la actividad de las MMPs resulta un evento relevante durante la progresión del CP y se ha reportado que el calcitriol favorece la expresión de sus reguladores naturales llamados TIMPs.

Así, se evaluó la expresión génica del *TIMP-1* y *TIMP-2* en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de calcitriol y del TGF- β 1 y TGF- β 2 así como del co-tratamiento durante 24 h. Los resultados mostraron que el calcitriol o los TGF- β s no modificaron significativamente la expresión génica de ambos *TIMPs* en ninguna condición probada en este tiempo de incubación (Fig. 13).

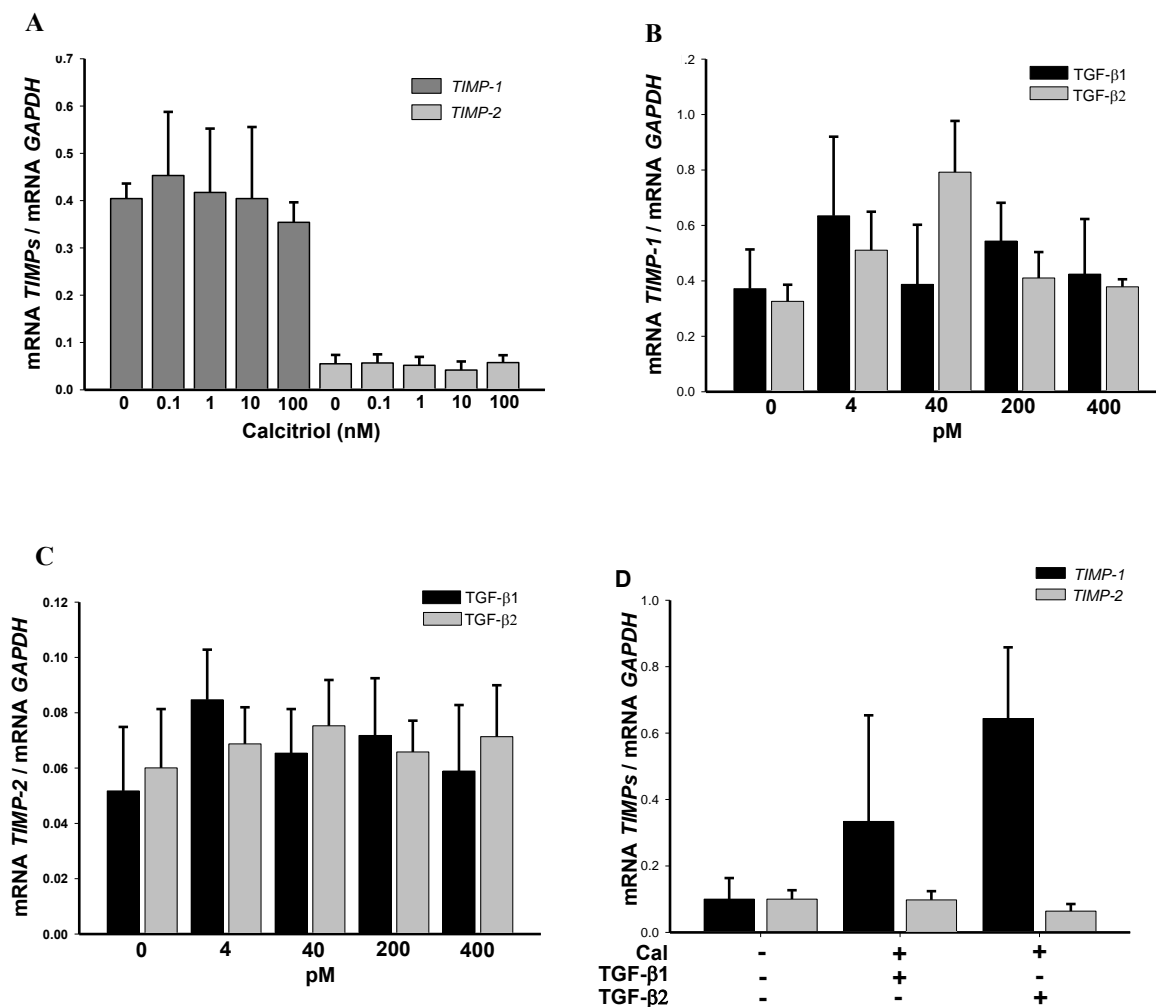


Figura 13. Efecto del calcitriol y los TGF- β s sobre la expresión de los *TIMPs*. La expresión génica del *TIMP-1* y *TIMP-2* se evaluó en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de calcitriol (A) y del TGF- β 1 y TGF- β 2 (B y C) así como la combinación (D) (calcitriol 10 nM y TGF- β 1 y TGF- β 2 200 pM) durante 24 h. Nota: el valor del control en D, se le asignó el valor de 0.1 con fines de comparar los *TIMPs*. n= 4 \pm DE *p < 0.05

9.5 Efecto del calcitriol, del TGF- β 1 y del TGF- β 2 solos y en combinación sobre la expresión génica de la *MMP-2* y *MMP-9* en la línea celular PC-3

La inhibición y el estímulo de la expresión génica de las *MMPs* por el calcitriol y los TGF- β s respectivamente, fue regulada por el secoesteroide cuando fue co-incubado con cada TGF- β , ya que el calcitriol inhibió significativamente el estímulo inducido tanto por el TGF- β 1 como por el TGF- β 2 (Fig. 14).

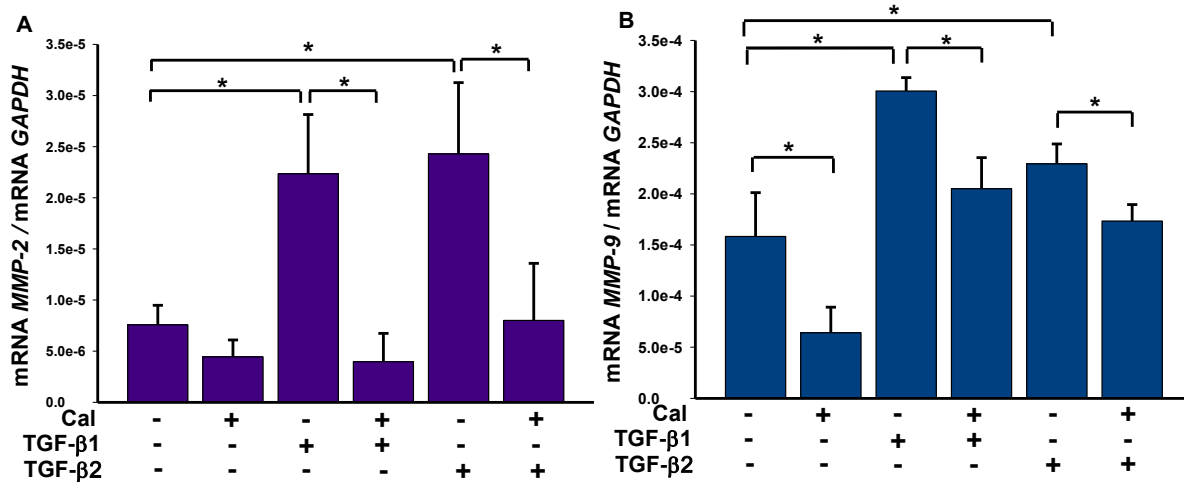


Figura 14. El calcitriol revierte el efecto estimulador de las *MMPs* inducida por los TGF- β s. Las barras muestran el efecto del calcitriol (10 nM) sobre la expresión génica de la *MMP-2* (A) y *MMP-9* (B) inducida por el TGF- β 1 y TGF- β 2 (200 pM) solos o en combinación por 24 h en las células PC-3. n = 6 \pm DE *p < 0.05

9.6 Efecto del calcitriol, del TGF- β 1 y del TGF- β 2 solos y en combinación sobre la producción de la MMP-9

La MMP-9 se cuantificó a partir de los lisados celulares y de la proteína secretada en los medios de cultivo por la técnica de ELISA a las 48h. Como se aprecia en la Fig. 15A, el calcitriol y los TGF β s en los lisados celulares no modificaron significativamente la concentración de la MMP-9 comparada con el control. No obstante, se observó que la MMP-9 secretada (Fig. 15B) fue estimulada significativamente por el TGF- β 1 y TGF- β 2 y de manera similar a lo observado en la expresión génica, el estímulo de la MMP-9 por los TGF- β s fue bloqueado en presencia del calcitriol, manteniendo el nivel basal al ser comparado con el control.

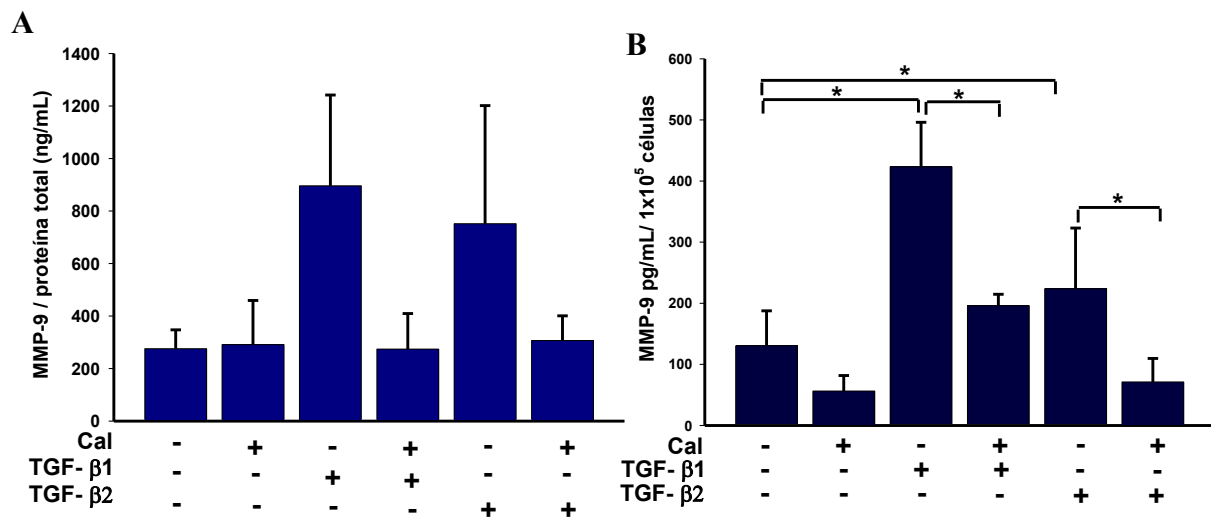


Figura 15. El calcitriol previene el aumento de la concentración y la secreción de la MMP-9 inducido por los TGF- β s. Efecto del calcitriol (10 nM) sobre la concentración de la MMP-9 inducida por el TGF- β 1 y el TGF- β 2 (200 pM) provenientes de lisados celulares (A) y medios de cultivo (B) solos o en combinación por 48h en las células PC-3. $n = 3 \pm$ DE, * $p < 5$.

10. DISCUSIÓN

El CP es un problema de salud pública en México ya que es una causa importante de muerte por cáncer en hombres de más de 65 años; por lo cual es vital la búsqueda de agentes que prevengan, coadyuven o retrasen su progresión [99].

Por lo anterior, en este estudio se utilizó como modelo biológico la línea celular PC-3, la cual ha sido ampliamente usada para evaluar los efectos de diferentes compuestos y así, valorar el impacto que pudieran tener en este tipo de cáncer. En particular, esta línea celular es un adenocarcinoma de tipo CRPC altamente invasivo y metastásico [100] y a diferencia de otras líneas celulares, se ha reportado que expresa el VDR y los citocromos que llevan a cabo la síntesis y degradación del calcitriol [101, 102]. Además, se ha observado que de forma endógena las PC-3 sintetizan al TGF- β y expresan sus 3 tipos de receptores, manteniendo así, activa la vía canónica y no canónica de señalización a diferencia de otras líneas celulares de CP que no expresan los receptores del TGF- β como la línea LNCaP [103].

Nuestros resultados demostraron que el calcitriol inhibió el crecimiento de la población celular de las PC-3 a los 6 días de incubación, lo cual puede ser considerado como una evaluación indirecta de la proliferación celular, coincidiendo así con hallazgos previos de los efectos inhibitorios del calcitriol sobre la proliferación de esta línea [22, 104]. Resultados similares fueron encontrados al evaluar el efecto del TGF- β 1 y el TGF- β 2, lo cual se relaciona con datos previamente reportados sobre la proliferación celular por otros grupos de trabajo usando esta y otras líneas celulares [48, 60, 71, 101]. Sin embargo, lo anterior resulta relevante; ya que en la literatura existe aún controversia acerca del efecto que pudiera tener el TGF- β en estados avanzados del cáncer y con otros estudios en los que el efecto es contrario al obtenido en el presente trabajo o bien no se detecta un efecto del TGF- β [60, 105]. Estas últimas observaciones que resultan ser contradictorias a lo obtenido en el presente estudio, podrían deberse a la metodología y/o a las concentraciones empleadas pero principalmente al tiempo de exposición al TGF- β más que al efecto paradójico que tiene el TGF- β mostrado en otras líneas celulares [55].

De manera interesante, lo destacable de este trabajo ha sido que la combinación del calcitriol con el TGF- β 1 o TGF- β 2 disminuyeron en mayor porcentaje el crecimiento celular con respecto al control y los tratamientos por si solos, dichos resultados concuerdan con los reportados en células Caco-2, en las cuales el crecimiento celular fue abatido en presencia de la co-incubación de estos compuestos [51]. Lo anterior sugiere: 1) que el calcitriol con el TGF- β sensibilizan a las células PC-3 actuando en conjunto para ejercer mayor inhibición del crecimiento celular, 2) que en este evento, el calcitriol media positivamente la vías de señalización del TGF- β y/o viceversa y 3) que ambos compuestos podrían estar impactando en diferentes vías de señalización capaces de inhibir el crecimiento celular, puesto que en combinación se observa un efecto aditivo. Cabe señalar que cada punto mencionado merece ser investigado con mayor detalle [106], sin embargo coinciden con lo previamente descrito donde el calcitriol induce favorablemente la síntesis del TGF- β y sus receptores para ejercer este efecto inhibitor [48].

Por otra parte, el proceso metastásico involucra una cascada de eventos que la célula tumoral debe llevar a cabo para la colonización de tejidos secundarios. Uno de los primeros eventos que ocurre, es la degradación e invasión de la membrana basal y matriz extracelular, en la cual, participan diferentes proteasas, entre ellas principalmente la MMP-2 y la MMP-9, cuya expresión se ve favorecida por la presencia de citocinas circundantes como el TGF- β , el cual promueve la progresión tumoral en etapas tardías a través de múltiples mecanismos, incluyendo la inducción de EMT en las células cancerosas [70]. Es así que en este trabajo evaluamos y corroboramos el efecto diferencial que tiene el calcitriol y el TGF- β sobre la expresión de la *MMP-2* y *MMP-9*. Como se esperaba, el calcitriol inhibió mientras que el TGF- β estimuló la expresión génica de la *MMP-2* y la *MMP-9*. No obstante, en combinación el resultado obtenido demostró que el calcitriol es capaz de bloquear el efecto estimulador del TGF- β 1 y del TGF- β 2 sobre ambas MMPs.

De manera similar a la expresión génica, al evaluar la concentración de la MMP-9, tanto en los lisados celulares como en la proteína secretada al medio de cultivo, encontramos que de forma general el calcitriol disminuye la concentración y la secreción de esta MMP. En efecto, los datos mostraron que el calcitriol fue capaz de disminuir la

cantidad de proteína aún bajo el estímulo del TGF- β . De manera interesante, estos resultados concuerdan a los reportados en el cáncer de colon, donde el calcitriol atenuó la actividad enzimática de estas MMP-2 inducida por el TGF β 1/ β 2 [107]. Sin embargo, ni en los lisados celulares ni en el medio de cultivo fue posible detectar la proteína de la MMP-2 por el kit comercial usado en este proyecto bajo ninguna condición experimental. Este hallazgo concuerda con lo previamente reportado y discutido por Konrad y cols., quienes tampoco detectaron la MMP-2 en esta línea celular [71, 107].

En conjunto, los resultados sugieren que el calcitriol es un factor, al menos en parte, necesario para regular no solo la actividad sino también la producción de estas proteasas, lo cual podría resultar en una disminución en la invasión y migración de estas células *i.e.*, no se descarta que actúe mediando el efecto invasor que propicia el TGF- β cuando se encuentra en un medio carente de esta hormona.

Aunque la progresión de este tipo de cáncer se ha asociado con la deficiencia del calcitriol (debido en parte a la alta expresión del CYP24A1) [33] y a la exacerbada producción del TGF- β , así como mutaciones, pérdida o disminución en el número de los receptores a el TGF- β [63, 108], esta línea celular resultó ser de utilidad por tener integras estas vías de señalización. En efecto, los resultados nos muestran el papel que podrían tener estos compuestos si se encuentran dentro del microambiente tumoral, ejerciendo su acción también en otros tipos celulares que mantengan estas vías de señalización no importando ser de un fenotipo metastásico.

Por otra parte, se comprobó que las células PC-3 responden al calcitriol vía el mecanismo clásico de acción genómica al mantener funcional su receptor, ya que se observó la inducción de la expresión génica del *CYP24A1* tras la adición de este secoesteroide, ya que el estímulo del *CYP24A1* por el calcitriol es un fenómeno común de autoregulación. Lo anterior sugiere una regulación del calcitriol a nivel de expresión génica, la cual podría mediar la abundancia proteínica. Sin embargo, no se descarta la existencia de una regulación cooperativa entre el calcitriol y el TGF- β con un fin común. Es decir, datos en la literatura han demostrado que el VDR puede interactuar con elementos de la vía de señalización del TGF- β , como es el caso demostrado de la interacción y formación del complejo VDR-SMAD3, los cuales, en conjunto podrían sinergizar o antagonizar genes específicos que en determinado momento pudieran mediar la progresión

del cáncer [106]. Asimismo, no se descartan otras vías no comunes tanto del calcitriol como del TGF- β para mediar tanto la proliferación, migración e invasión celular, como pueden ser la activación de proteínas cinasas las cuales regulan de manera importante los eventos antes mencionados, lo cual merece ser ampliamente estudiado.

En resumen, aunque existen datos controversiales en la literatura con respecto a las concentraciones séricas de vitamina D y el cáncer de próstata, los resultados obtenidos nos muestran que el calcitriol en combinación con el TGF- β inhiben con mayor eficacia el crecimiento celular que los compuestos por separado, y que el calcitriol modula la producción exacerbada de las MMPs inducidas por el TGF- β controlando de esta forma tanto el crecimiento como la invasión tumoral, sugiriendo que la suplementación con vitamina D (para alcanzar concentraciones óptimas de calcitriol) en pacientes con esta neoplasia y que cursan con bajas concentraciones de vitamina D, podría ayudar a aminorar o disminuir los efectos adversos de este tipo de cáncer.

Asimismo, los resultados mostrados en este estudio junto con reportes publicados, sugieren que el calcitriol pudiera ser un buen candidato en la terapia contra este tipo de cáncer al ser utilizado como coadyuvante junto con fármacos de primera línea en el tratamiento de esta patología como podrían ser el docetaxel y/o la abiraterona, los cuales corresponden a un anti-androgénico y a un inhibidor de la síntesis de testosterona, respectivamente. En el caso particular de docetaxel, existen solo estudios clínicos que han reportado que la administración de este fármaco con calcitriol mejoró la supervivencia del paciente [109]. Por otra parte, a nivel *in vitro* se ha observado que la abiraterona evita la degradación del calcitriol [110]. Por lo anterior, resultaría relevante incrementar los estudios con estos fármacos en conjunto con calcitriol en líneas celulares de CP y así evaluar los efectos y mecanismos que se llevan a cabo cuando se combinan esperando mejorar el efecto anti-neoplásico.

11. CONCLUSIONES

1. La combinación del calcitriol (10 nM) con el TGF- β 1 o el TGF- β 2 (200 pM) inhiben significativamente el crecimiento celular de las PC-3, en comparación con el control o los compuestos por separado.
2. El calcitriol bloquea el incremento de la expresión génica de la *MMP-2* y *MMP-9* estimulado por el TGF- β 1 o el TGF- β 2 a las 24 h.
3. El calcitriol inhibe significativamente la secreción de la *MMP-9* estimulada por TGF- β 1 y TGF- β 2 a las 48 h de incubación.
4. Los tratamientos solos o en combinación a los diferentes tiempos no modifican la expresión génica de los *TIMP-1* y *TIMP-2*.

12. LITERATURA CITADA

1. Institute, N.C. *What Is Cancer?* 2015 2017]; Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
2. WHO. *Cancer.* 2017 2017]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
3. GLOBOCAN, W. *Estimated number of incident caases, males worldwide (top 10 cancer sites) in 2012.* 2012 2017]; Available from: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?mode=cancer&mode_population=continents&population=900&sex=1&cancer=29&type=0&statistic=0&prevalence=0&color_palette=default.
4. Gómez-Dantés, et al., *The burden of cancer in Mexico, 1990-2013.* Salud pública de méxico, 2016. **58**(2): p. 118-131.
5. WHO. *Estimated number of incident cases, males, Mexico (top 10 cancer sites) in 2012.* 2012; Available from: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?mode=cancer&mode_population=continents&population=484&sex=1&cancer=19&type=0&statistic=0&prevalence=0&color_palette=default.
6. Gomella, L.G., *Effective testosterone suppression for prostate cancer: is there a best castration therapy?* Rev Urol, 2009. **11**(2): p. 52-60.
7. Suzuki, H y Ueda T., et. al., *Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer.* Endocr Relat Cancer, 2003. **10**(2): p. 209-216.
8. Eisermann, K. y G. Fraizer, *The androgen receptor and VEGF: mechanisms of androgen-regulated Angiogenesis in prostate cancer.* Cancers (Basel), 2017. **9**(4).p.E32.
9. Maier, C. y Herkommer, K., et al., *Subgroups of familial and aggressive prostate cancer with considerable frequencies of BRCA2 mutations.* Prostate, 2014. **74**(14): p. 1444-14451.
10. Graff, R. y Ahearn, T., et al., *Height, obesity, and the risk of TMPRSS2:ERG-defined prostate cancer.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2017.
11. Litwin, M.S. y. Tan H., *The diagnosis and treatment of prostate cancer: A Review.* JAMA, 2017. **317**(24): p. 2532-2542.
12. Mohler, J. y Armstrong, A., et. al., *Prostate cancer, version 1.2016.* J Natl Compr Canc Netw, 2016. **14**(1): p. 19-30.
13. Cooperberg, M. y Pasta, D., et. al., *The university of california, san francisco cancer of the prostate Risk Assessment score: a straightforward and reliable preoperative predictor of disease recurrence after radical prostatectomy.* J Urol, 2005. **173**(6): p. 1938-1942.
14. Cancer.Net. *Prostate Cancer: Stages and Grades.* 2017; Available from: <https://www.cancer.net/cancer-types/prostate-cancer/stages-and-grades>.
15. Attard, G., Parker, C, et. al., *Prostate cancer.* Lancet, 2016. **387**(10013): p. 70-82.
16. Antonarakis, E.S., *Management of metastatic castration-resistant prostate cancer.* Eur Urol Rev, 2011. **6**(2): p. 90-96.
17. Nishiyama, T., *Serum testosterone levels after medical or surgical androgen deprivation: a comprehensive review of the literature.* Urol Oncol, 2014. **32**(1): p. 38 e17-e28.
18. Shih, J., Wang, L., et. al., *Non-Coding RNAs in castration-resistant prostate cancer: regulation of androgen receptor signaling and cancer metabolism.* Int J Mol Sci, 2015. **16**(12): p. 28943-28978.
19. Sharifi, N., *Mechanisms of androgen receptor activation in castration-resistant prostate cancer.* Endocrinology, 2013. **154**(11): p. 4010-4017.
20. Tan, M., Li J. et. al., *Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery.* Acta Pharmacol Sin, 2015. **36**(1): p. 13-23.
21. Nussbaum, N., George D., et. al., *Patient experience in the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: state of the science.* Prostate Cancer Prostatic Dis, 2016. **19**(2): p. 111-121.

22. Feldman, D., Krishnan A., et. al., *The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(5): p. 342-357.
23. Hanchette, C. y Schwartz G. *Geographic patterns of prostate cancer mortality. Evidence for a protective effect of ultraviolet radiation*. Cancer, 1992. **70**(12): p. 2861-2869.
24. Ahonen, H., Tenkanen L. et. al., *Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (Finland)*. Cancer Causes Control, 2000. **11**(9): p. 847-852.
25. Xu, Y., Shao, X., et. al., *Positive association between circulating 25-hydroxyvitamin D levels and prostate cancer risk: new findings from an updated meta-analysis*. J Cancer Res Clin Oncol, 2014. **140**(9): p. 1465-1477.
26. Mondul A., Weinstein, S. et. al., *Vitamin D and cancer risk and mortality: state of the science, gaps, and challenges*. Epidemiol Rev, 2017. **39**(1): p. 28-48.
27. Christakos S., Dhawan, P., et. al., *Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects*. Physiol Rev, 2016. **96**(1): p. 365-408.
28. Holick, M., Binkley N., et. al., *Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(7): p. 1911-1930.
29. Norman, A.W., *From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health*. Am J Clin Nutr, 2008. **88**(2): p. 491S-499S.
30. Japelt, R.B. y J. Jakobsen, *Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis*. Front Plant Sci, 2013. **4**: p. 1-20.
31. Holick F., *Vitamin D Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications*. Second edition ed2010: Humana Press.
32. Sakaki, T. et al., *CYP24A1 as a potential target for cancer therapy*. Anticancer Agents Med Chem, 2014. **14**(1): p. 97-108.
33. Tannour-Louet, M., Lewis, S.et. al., *Increased expression of CYP24A1 correlates with advanced stages of prostate cancer and can cause resistance to vitamin D3-based therapies*. FASEB J, 2014. **28**(1): p. 364-372.
34. Chandra, G., Selvaraj P. et. al., *Effect of vitamin D3 on phagocytic potential of macrophages with live Mycobacterium tuberculosis and lymphoproliferative response in pulmonary tuberculosis*. J Clin Immunol, 2004. **24**(3): p. 249-257.
35. Bikle, D. *Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications*. Chem Biol, 2014. **21**(3): p. 319-29.
36. Nemere I., Farach-Carson M.et. al *Ribozyme knockdown functionally links a 1,25(OH)2D3 membrane binding protein (1,25D3-MARRS) and phosphate uptake in intestinal cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(19): p. 7392-7397.
37. Huhtakangas, J. et. al., *The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 alpha,25(OH)2-vitamin D3 in vivo and in vitro*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(11): p. 2660-2671.
38. Hii, C. y A. Ferrante, *The non-genomic actions of vitamin D*. Nutrients, 2016. **8**(3): p. 1-14.
39. Campbell M. et. al., *Inhibition of proliferation of prostate cancer cells by a 19-nor-hexafluoride vitamin D3 analogue involves the induction of p21waf1, p27kip1 and E-cadherin*. J Mol Endocrinol, 1997. **19**(1): p. 15-27.
40. Ahn J., Park S.et. al. *Vitamin D in prostate cancer*. Vitam Horm, 2016. **100**: p. 321-355.
41. Bao Bo-Ying, S.-D.Y.a.Y.-F.L., *1a,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits prostate cancer cell invasion via modulation of selective proteases*. Advance Access publication 2005. **21**(1): p. 32-42.
42. Schwartz G. Wang M. et. al. *1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D (calcitriol) inhibits the invasiveness of human prostate cancer cells*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1997. **6**(9): p. 727-732.
43. Stio M. Martinesi M. et. al., *The novel vitamin D analog ZK191784 inhibits prostate cancer cell invasion*. Anticancer Res, 2011. **31**(12): p. 4091-4098.

44. Guzey, M., S. Kitada, y J.C. Reed, *Apoptosis induction by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in prostate cancer*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(9): p. 667-677.
45. Boyle B., Zhao, X.et al. *Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates 1 alpha,25-dihydroxyvitamin d(3) growth inhibition in the LNCaP prostate cancer cell line through p21/WAF1*. J Urol, 2001. **165**(4): p. 1319-1324.
46. Moffatt K. Johannes W. et. al. *Growth inhibitory effects of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D(3) are mediated by increased levels of p21 in the prostatic carcinoma cell line ALVA-31*. Cancer Res, 2001. **61**(19): p. 7122-7129.
47. Yang E. y K.L. Burnstein, *Vitamin D inhibits G1 to S progression in LNCaP prostate cancer cells through p27Kip1 stabilization and Cdk2 mislocalization to the cytoplasm*. J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 46862-4668.
48. Murthy S. and Weigel N. *1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 induced growth inhibition of PC-3 prostate cancer cells requires an active transforming growth factor beta signaling pathway*. Prostate, 2004. **59**(3): p. 282-291.
49. Koli K. y J. Keski-Oja. *1,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances the expression of transforming growth factor beta 1 and its latent form binding protein in cultured breast carcinoma cells*. Cancer Res, 1995. **55**(7): p. 1540-4156.
50. Koli K. y J. Keski-Oja, *Vitamin D3 and calcipotriol enhance the secretion of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 in cultured murine keratinocytes*. Growth Factors, 1993. **8**(2): p. 153-1563.
51. Chen A., Davis B. et. al., *Transforming growth factor-beta 1 signaling contributes to Caco-2 cell growth inhibition induced by 1,25(OH)(2)D(3)*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **283**(4): p. G864-8G74.
52. Mercier, T., et al., *Calcitriol and lexicalcitol (KHI060) inhibit the growth of human breast adenocarcinoma cells by enhancing transforming growth factor-beta production*. Biochem Pharmacol, 1996. **52**(3): p. 505-10.
53. Macias, M.J., P. Martin-Malpartida, and J. Massague, *Structural determinants of Smad function in TGF-beta signaling*. Trends Biochem Sci, 2015. **40**(6): p. 296-308.
54. Akhurst, R.J. and R. Derynck, *TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(11): p. S44-51.
55. Wakefield, L.M. and A.B. Roberts, *TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(1): p. 22-9.
56. Miyazono P.y C.H. Heldin. *TGF-beta signaling by Smad proteins*. Adv Immunol, 2000. **75**: p. 115-1157.
57. Leivonen S. y Kahari V. *Transforming growth factor-beta signaling in cancer invasion and metastasis*. Int J Cancer, 2007. **121**(10): p. 2119-2124.
58. Mulder K. *Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling*. Cytokine Growth Factor Rev, 2000. **11**(1-2): p. 23-35.
59. Massague J. y Gomis R. *The logic of TGF-beta signaling*. FEBS Lett, 2006. **580**(12): p. 2811-2820.
60. Millena A., Vo T., y S.A. Khan, *JunD is required for proliferation of prostate cancer cells and plays a role in transforming growth factor-beta (TGF-beta)-induced inhibition of cell proliferation*. J Biol Chem, 2016. **291**(34): p. 17964-17976.
61. Hsing A., Kadomatsu K. et. al. *Regulation of apoptosis induced by transforming growth factor- beta1 in nontumorigenic rat prostatic epithelial cell lines*. Cancer Res, 1996. **56**(22): p. 5146-5149.
62. Danielpour, D. *Functions and regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) in the prostate*. Eur J Cancer, 2005. **41**(6): p. 846-857.
63. Guo Y., S.C. Jacobs y N. Kyprianou. *Down-regulation of protein and mRNA expression for transforming growth factor-beta (TGF-beta1) type I and type II receptors in human prostate cancer*. Int J Cancer, 1997. **71**(4): p. 573-579.

64. Kim I., Ahn H., et. al., *Loss of expression of transforming growth factor beta type I and type II receptors correlates with tumor grade in human prostate cancer tissues*. Clin Cancer Res, 1996. **2**(8): p. 1255-1261.
65. Shariat S., Walz, J. et al., *Early postoperative plasma transforming growth factor-beta1 is a strong predictor of biochemical progression after radical prostatectomy*. J Urol, 2008. **179**(4): p. 1593-1597.
66. Shariat F., Shalev, M. et. al., *Preoperative plasma levels of transforming growth factor beta(1) (TGF-beta(1)) strongly predict progression in patients undergoing radical prostatectomy*. J Clin Oncol, 2001. **19**(11): p. 2856-2864.
67. Thiery J., Acloque H. et. al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-890.
68. Bang Y., Kim S. J. et al. *Cyclic AMP induces transforming growth factor beta 2 gene expression and growth arrest in the human androgen-independent prostate carcinoma cell line PC-3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(8): p. 3556-3560.
69. Rowley D., Dang T. et. al., *Beta-2 microglobulin is mitogenic to PC-3 prostatic carcinoma cells and antagonistic to transforming growth factor beta 1 action*. Cancer Res, 1995. **55**(4): p. 781-786.
70. Massague, J., *TGFbeta in Cancer*. Cell, 2008. **134**(2): p. 215-30.
71. Konrad L., Scheiber J. et. al., *TGF-beta1 and TGF-beta2 strongly enhance the secretion of plasminogen activator inhibitor-1 and matrix metalloproteinase-9 of the human prostate cancer cell line PC-3*. Regul Pept, 2009. **155**(1-3): p. 28-32.
72. Villar V., Kocic y Santibanez J. *Skip regulates TGF- beta 1-induced extracellular matrix degrading proteases expression in human PC-3 prostate cancer cells*. Prostate Cancer, 2013. **2013**: p. 398253.
73. Sehgal I. y Thompson C. *Novel regulation of type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9 and -2) activities by transforming growth factor-beta1 in human prostate cancer cell lines*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(2): p. 407-416.
74. Festuccia C., Angelucci A. et al., *Osteoblast-derived TGFbeta-1 modulates matrix degrading protease expression and activity in prostate cancer cells*. Int J Cancer, 2000. **86**(6): p. 888.
75. Gomes L., Terra L. et. al., *TGF-beta1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 1-15.
76. Sternlicht M. y Werb Z. *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 463-516.
77. Gandalovičová, Vomastek T. et. al., *Cell polarity signaling in the plasticity of cancer cell invasiveness*. Oncotarget, 2016 **7**(18): p. 25022-25049.
78. Forbes K., Webb M.y Sehgal I. *Growth factor regulation of secreted matrix metalloproteinase and plasminogen activators in prostate cancer cells, normal prostate fibroblasts and normal osteoblasts*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2003. **2**(2): p. 148-153
79. Yang J., Pan T. et. al., *Kindlin-2 promotes invasiveness of prostate cancer cells via NF-kappaB-dependent upregulation of matrix metalloproteinases*. Gene, 2016. **576**(1 Pt 3): p. 571-576.
80. Sehgal G., Hua J. et. al., *Requirement for matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) expression in metastasis by murine prostate carcinoma*. Am J Pathol, 1998. **152**(2): p. 591-596.
81. Wilson M., Sellar R. et. al., *Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and their inhibitors, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2, in primary cultures of human prostatic stromal and epithelial cells*. J Cell Physiol, 2002. **191**(2): p. 208-216.
82. Varani J., et al., *Matrix metalloproteinases (MMPs) in fresh human prostate tumour tissue and organ-cultured prostate tissue: levels of collagenolytic and gelatinolytic MMPs are*

- low, variable and different in fresh tissue versus organ-cultured tissue. *Br J Cancer*, 2001. **84**(8): p. 1076-1083.
83. Nagase H., Visse R. y Murphy G. *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. *Cardiovasc Res*, 2006. **69**(3): p. 562-573.
 84. Cathcart J., Pulkoski-Gross A. y Cao, J. *Targeting matrix metalloproteinases in cancer: bringing new life to old ideas*. *Genes Dis*, 2015. **2**(1): p. 26-34.
 85. Ra HJ. y Parks W. *Control of matrix metalloproteinase catalytic activity*. *Matrix Biol.*, 2002. **26**(8): p. 587-596.
 86. Khokha R., Murthy A. y Weiss A. *Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(9): p. 649-665.
 87. Arpino V., Brock M. y Gill H. *The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis*. *Matrix Biol*, 2015. **44-46**: p. 247-254.
 88. Morgunova E., Tuuttila A. et al., *Structural insight into the complex formation of latent matrix metalloproteinase 2 with tissue inhibitor of metalloproteinase 2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(11): p. 7414-7419.
 89. Lambert E., Dasse E. et al. *TIMPs as multifacial proteins*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004. **49**(3): p. 187-198.
 90. Lafleur M., Handsley M. y Edwards D. *Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis*. *Expert Rev Mol Med*, 2003. **5**(23): p. 1-39.
 91. Cohen M., Meisser A. et al., *Involvement of MAPK pathway in TNF-alpha-induced MMP-9 expression in human trophoblastic cells*. *Mol Hum Reprod*, 2006. **12**(4): p. 225-232.
 92. Brehmer, B., S. Biesterfeld, and G. Jakse, *Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and their inhibitors (TIMP-1 and -2) in prostate cancer tissue*. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2003. **6**(3): p. 217-222.
 93. Boag, A.H. y Young I. *Increased expression of the 72-kd type IV collagenase in prostatic adenocarcinoma. Demonstration by immunohistochemistry and in situ hybridization*. *Am J Pathol*, 1994. **144**(3): p. 585-591.
 94. Pulukuri S., et al., *Epigenetic inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) gene in human prostate tumors*. *Oncogene*, 2007. **26**(36): p. 5229-5237.
 95. Wang M. *IL-10 blocks collagen IV invasion by "invasion stimulating factor" activated PC-3 ML cells: upregulation of TIMP-1 expression*. *Oncol Res.*, 1995. **7**(3-4): p. 157-163.
 96. Schwartz, G.G., *Vitamin D and the epidemiology of prostate cancer*. *Semin Dial*, 2005. **18**(4): p. 276-89.
 97. Vichai V. Kirtikara K. *Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening*. *Nat Protoc.*, 2006. **2006**(3): p. 1112-1116.
 98. Chomczynski, P. y Sacchi N. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem*, 1987. **162**(1): p. 156-159.
 99. GLOBOCAN, W. *Estimated number of incident, both sex, worldwide (top 10 cancer sites) in 2012*. 2012 [cited 2012; Available from: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?mode=cancer&mode_population=continents&population=900&sex=0&cancer=29&type=0&statistic=0&prevalence=0&color_palette=default].
 100. Sobel, R.E. y. Sadar M.D, *Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part I*. *J Urol*, 2005. **173**(2): p. 342-359.
 101. Miller G., Stapleton, G. et al., *Vitamin D receptor expression, 24-hydroxylase activity, and inhibition of growth by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in seven human prostatic carcinoma cell lines*. *Clin Cancer Res*, 1995. **1**(9): p. 997-1003.
 102. Zhuang S., Schwartz G. et. al., *Vitamin D receptor content and transcriptional activity do not fully predict antiproliferative effects of vitamin D in human prostate cancer cell lines*. *Mol Cell Endocrinol*, 1997. **126**(1): p. 83-90.

103. Kim I., Ahn H.et. al. *Genetic change in transforming growth factor beta (TGF-beta) receptor type I gene correlates with insensitivity to TGF-beta 1 in human prostate cancer cells.* Cancer Res, 1996. **56**(1): p. 44-48.
104. Wang, X., Chen X. et al., *The in vitro effect of vitamin D3 analogue EB-1089 on a human prostate cancer cell line (PC-3).* Br J Urol, 1997. **80**(2): p. 260-262.
105. Barrett, C.S., A.C. Millena, and S.A. Khan, *TGF-beta Effects on Prostate Cancer Cell Migration and Invasion Require FosB.* Prostate, 2017. **77**(1): p. 72-81.
106. Yanagisawa J., Yanagi Y.et al. *Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators.* Science, 1999. **283**(5406): p. 1317-1321.
107. Chen S., Zhu J. et. al., *1,25(OH)2D3 attenuates TGF-β1/β2-induced increased migration and invasion via inhibiting epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2015. **468**(1-2): p. 130–135.
108. Wikstrom P., Lindh, G.et. al., *Alterations of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) and TGFbeta receptor expressions with progression in Dunning rat prostatic adenocarcinoma sublines.* Urol Res, 1999. **27**(3): p. 185-193.
109. Beer T., Ryan C. et. al., *Double-blinded randomized study of high-dose calcitriol plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel in androgen-independent prostate cancer: a report from the ASCENT Investigators.* J Clin Oncol, 2007. **25**(6): p. 669-674.
110. Deb S., Chin M.et. al., *Abiraterone inhibits 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 metabolism by CYP3A4 in human liver and intestine in vitro.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2014. **144 Pt A**: p. 50-58.