



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**EFEECTO DEL CALCITRIOL EN COMBINACIÓN CON EL
TGF- β 1 SOBRE LA EXPRESION DE LA GONADOTROPINA
CORIÓNICA HUMANA Y SU RECEPTOR EN LA LINEA
CELULAR DE CÁNCER DE PRÓSTATA HUMANO DU-145**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

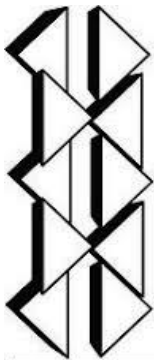
BIÓLOGO

PRESENTA:

CAMPOS AVILÉS MARBELLY BELEM

DIRECTOR DE TESIS: DR. DAVID BARRERA HERNÁNDEZ

ASESOR INTERNO: M. en C. ANA ROCÍO RIVERA MARTÍNEZ



**FES
ZARAGOZA**

CIUDAD DE MÉXICO, 2019



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
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Comunico a usted que la alumna **CAMPOS AVILÉS MARBELLY BELEM**, con número de cuenta **309064246**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **13 de agosto de 2019** a las **13:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dra. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR	
VOCAL	Dr. DAVID BARRERA HERNÁNDEZ*	
SECRETARIO	M. en C. ANA ROCÍO RIVERA MARTÍNEZ	
SUPLENTE	Dra. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA	
SUPLENTE	Dr. RODRIGO ANÍBAL MATEOS NAVA	

El título de la tesis que presenta es: **Efecto del Calcitriol en combinación con el TGF-β1 sobre la expresión de la gonadotropina coriónica humana y su receptor en la línea celular de cáncer de próstata humano DU-145.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 30 de mayo de 2019

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD

DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO/BO.
Dr. JOSÉ LUIS GÓMEZ MÁRQUEZ
JEFE DE CARRERA

Reconocimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por poder realizar en esta prestigiada Institución mis estudios de bachillerato y licenciatura.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Z), lugar donde acrecenté mi formación académica.

Al Departamento de Biología de la Reproducción, Dr. Carlos Gual Castro, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), por el uso de sus instalaciones para llevar a cabo este proyecto.

Al Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia (LHyL), de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UMIEZ). Lugar donde enriquecí mi formación en todos los conocimientos básicos en el manejo de líneas celulares y cáncer.

Al comité tutorial: Dra. María Elena Ayala Escobar

Dr. David Barrera Hernández

M. en C. Ana Rocío Rivera Martínez

Dra. María De Lourdes Mora García

Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava

Agradecimientos

Al Dr. David Barrera Hernández, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, brindarme su apoyo, paciencia, confianza, enseñanzas, consejos y guiar este trabajo de tesis. Sobre todo por su paciencia al enseñarme desde la teoría hasta lo práctico. Gracias por todo el apoyo y motivación para realizar este proyecto.

A la M. en C. Ana Rocío Rivera Martínez, por aceptar ser mi asesora interna, por su apoyo en la elaboración de esta tesis, consejos, paciencia y confianza. Pero principalmente por brindarme su amistad y todos los conocimientos básicos en la investigación.

A todos los miembros del Departamento de Biología de la Reproducción, en especial a mis compañeras: Joselin Estefanía Escamilla Bucio, Mitzi García Olivares y Nancy Noyola Martínez, gracias por brindarme su amistad, apoyo y paciencia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por brindarme la beca con el número de registro 16477.

Al CONACyT, por el apoyo económico con número de registro CB-2016/282770-M, otorgado como sustento a la investigación científica.

Dedicatorias

A mi abuelita Micaela, por brindarme todo su apoyo incondicional, consejos y experiencias, le agradezco todo el tiempo y atención que ha dedicado hasta el día de hoy en mi formación como persona. Gracias por ser una madre para mí, por considerarme como una hija y por estar siempre pendiente de mí.

A mi abuelito Benito, gracias por su apoyo y brindarme un techo en su casa. Por darme consejos para enfrentarme ante la gente y por enseñarme a valorar y a ganarme las cosas.

A mis padres: Angélica Avilés y Guillermo Campos, les agradezco por darme la vida, su apoyo, su confianza y por creer en mí. Estoy orgullosa de tener unos padres como ustedes a pesar de muchas adversidades que hemos pasado. Quiero que sepan que los quiero y los respeto. También les agradezco mucho todos sus cuidados y enseñanzas que tuve con ustedes de pequeña.

A mis hermanos: Aldair Campos y Guillermo Campos, gracias por su paciencia y apoyo que me han dado, por dedicarme el tiempo para escucharme y alegrar mis días, por su confianza, porque a pesar de muchos contratiempos que hemos pasado nunca me han dejado sola, y siempre han creído en mí, ustedes son mi mayor fuente de inspiración, los amo. Y nunca los voy a dejar, siempre los voy a llevar en mi corazón.

A mi tía Leticia Avilés, muchas gracias por el apoyo que me has brindado y por todos los consejos durante toda mi carrera como estudiante para seguir por un buen camino, la admiro y la respeto mucho. Desde pequeña fuiste un ejemplo a seguir para mí. Gracias por la confianza y el apoyo que me has dado.

A mis primas y primos, gracias por todos esos momentos de alegría que hemos pasado juntos, además de ser parte de mi familia yo los considero como mis mejores amigos, sé que en ustedes puedo confiar y siempre van estar ahí para escucharme, los quiero mucho.

En general a toda mi familia y amigos gracias por estar siempre conmigo, porque gracias a ustedes he podido salir adelante. Sé que me faltan muchas personas por mencionar que estuvieron siempre apoyándome estoy muy agradecida con ustedes por haberme apoyado y brindarme su amistad durante mucho tiempo y aunque ya no los veo siempre los voy a llevar presente.

Índice	Página
1 Listado de Figuras y Tablas	I
2 Abreviaturas	II
3 Resumen	V
4 Introducción	1
4.1 Generalidades del cáncer.....	1
4.2 Incidencia del cáncer.....	2
4.3 Próstata.....	3
4.4 Cáncer de próstata.....	4
4.5 Tratamientos del cáncer de próstata.....	5
4.6 Calcitriol.....	6
4.7 Metabolismo del calcitriol.....	6
4.8 Mecanismo de acción del calcitriol.....	8
4.9 Calcitriol y cáncer de próstata.....	9
4.10 Generalidades del factor de crecimiento transformante (TGF- β).....	10
4.11 TGF- β y cáncer.....	11
4.12 Generalidades de la gonadotropina coriónica humana (hCG).....	12
4.13 hCG y Cáncer.....	12
5 Planteamiento del problema	14
6 Justificación	15
7 Hipótesis	16
8 Objetivos	17
9 Metodología	18
9.1 Cultivo celular.....	18
9.2 Estudios de expresión génica.....	18
9.2.1 Extracción del RNA.....	18
9.2.2 Cuantificación de RNA.....	20
9.2.3 Retrotranscripción.....	20

9.2.4 Amplificación del cDNA	20
9.3 Ensayos de ELISA.....	22
9.4 Ensayos de proliferación celular.....	23
9.5 Análisis estadístico.....	25
10 Resultados	26
10.1 Efecto del calcitriol y del TGF- β 1 solos o en combinación sobre la expresión génica de la <i>hCGβ</i>	26
10.2 Expresión génica del receptor LHCGR en ausencia y presencia del calcitriol y del TGF- β 1 solos o en combinación.....	27
10.3 Efecto del calcitriol y el TGF- β 1 solos o en combinación sobre la secreción de la <i>hCGβ</i>	27
10.4 Efecto del calcitriol y el TGF- β 1 solos o en combinación sobre la proliferación celular.....	28
10.5 Efecto de la <i>hCGβ</i> sobre la proliferación en ausencia y presencia del calcitriol y del TGF- β 1	29
11 Discusión	31
12 Conclusiones	37
13 Perspectivas	38
14 Bibliografía	39

1 Listado de Figuras y Tablas

Figura 1. Incidencia mundial de diferentes tipos de cáncer.

Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer de próstata.

Figura 3. Esquema que muestra la ubicación de la próstata y del cáncer de próstata.

Figura 4. Órganos involucrados en la ruta de síntesis del calcitriol.

Figura 5. Mecanismo de acción genómico del calcitriol.

Figura 6. Extracción del RNA.

Figura 7. Cajas de 96 pozos para ensayos de proliferación celular.

Figura 8. Expresión génica de la *hCGβ*.

Figura 9. Expresión génica del receptor *LHRHCG*.

Figura 10. Efecto del calcitriol y del TGF-β1 sobre la secreción de la *hCGβ*.

Figura 11. Efecto del calcitriol y del TGF-β1 sobre la proliferación celular.

Figura 12. Efecto de la *hCG* en ausencia y presencia de calcitriol, TGF-β1 y la combinación de los tres compuestos.

Tabla 1. Protocolo de amplificación del cDNA por qPCR.

Tabla 2. Secuencias de los iniciadores y sondas utilizadas en la qPCR.

2 Abreviaturas

ADT: Terapia de Privación de Andrógenos, por sus siglas en inglés: Androgen Deprivation Therapy

ASR: Tasa de Incidencia Estandarizada por Edad, por sus siglas en inglés: Age-Standardised Rate

ATCC: Colección de Cultivos Tipo Americano, por sus siglas en inglés: American Type Culture Collection

cDNA: Ácido Desoxirribonucleico Complementario, por sus siglas en inglés: Complementary Desoxyribonucleic Acid

CP: Cáncer de Próstata

CRPC: Cáncer de Próstata Resistente a la Castración, por sus siglas en inglés: Castration Resistant Prostate Cancer

CYP27B1: 25-hidroxivitamina D₃-1 α hidroxilasa

CYP2R1: 25-hidroxilasa

DBP: Proteína de Unión a Vitamina D, por sus siglas en inglés: Vitamin D Binding Protein

DEPC: Dietilpirocarbonato

DNA: Ácido Desoxirribonucleico, por sus siglas en inglés: Desoxyribonucleic Acid

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas, por sus siglas en inglés: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EMT: Transición Epitelio Mesénquima, por sus siglas en inglés: Epithelial to Mesenchymal Transition

FSH: Hormona Folículo Estimulante, por sus siglas en inglés: Follicle Stimulating Hormone

hCG: Gonadotropina Coriónica Humana, por sus siglas en inglés: Human Chorionic Gonadotropin

hCG β : Gonadotropina Coriónica Humana Subunidad β

LHCGR: Receptor de la Hormona Luteinizante/ Gonadotropina Coriónica, por sus siglas en inglés: Luteinizing Hormone/Chorionic Gonadotropin Receptor

LH: Hormona Luteinizante, por sus siglas en inglés: Luteinizing Hormone

MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógeno, por sus siglas en inglés: Mitogen-Activated Protein Kinase

MMPs: Metaloproteinasas de Matriz, por sus siglas en inglés: Matrix Metalloproteinases

OMS: Organización Mundial de la Salud

PI3K: Fosfatidil Inositol-3 Cinasa, por sus siglas en inglés: Phosphoinositide-3 Kinase

PKA: Proteína Cinasa A, por sus siglas en inglés: Protein Kinase A

PKC: Proteína Cinasa C, por sus siglas en inglés: Protein Kinase C

PLA2: Fosfolipasa A2, por sus siglas en inglés: Phospholipase A2

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real, por sus siglas en inglés:
Real Time Polymerase Chain Reaction

RNA: Ácido Ribonucleico, por sus siglas en inglés: Ribonucleic Acid

RXR: Receptor de Retinoides X, por sus siglas en inglés: Retinoid X Receptor

TSH: Hormona Estimulante de la Tiroides, por sus siglas en inglés: Thyroid Stimulating
Hormone

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante β , por sus siglas en inglés: Transforming
Growth Factor β

VDR: Receptor a Vitamina D, por sus siglas en inglés: Vitamin D Receptor

3 Resumen

El cáncer de próstata (PC) es un problema de salud pública que afecta principalmente a hombres mayores de 65 años. En México, su incidencia y mortalidad está posicionada en primer lugar comparada con los otros tipos de cáncer, por lo cual, resulta de interés la búsqueda de moléculas de origen natural para combatir este padecimiento. De lo anterior, se sabe que el calcitriol (derivado activo de la vitamina D), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y la gonadotropina coriónica humana (hCG), tienen efectos que median el crecimiento celular de varios tipos de cáncer. Sin embargo, en algunas ocasiones se han encontrado datos controversiales y poco se conoce si existe alguna conexión entre estos compuestos para ejercer sus acciones. Por lo tanto, los objetivos del presente estudio usando como modelo biológico la línea celular de cáncer de próstata humano DU-145, fueron los siguientes: evaluar los efectos del calcitriol y del TGF- β 1 solos o en combinación sobre la expresión génica y proteica de la hCG β así como la expresión génica de su receptor. Además, estudiar si en esquema de combinación se afecta la proliferación celular con mejor eficacia que con los compuestos por separado. Considerando lo anterior, se realizaron los tratamientos correspondientes en los cultivos celulares y se evaluó la transcripción génica de la hCG β y su receptor mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. La secreción de la hCG β a los medios de cultivo fueron evaluados por la técnica de ELISA mientras que la proliferación celular fue determinada por el método de XTT. Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que: a) el calcitriol no modificó la expresión génica ni la secreción basal de la hCG β , b) el TGF- β 1 estimuló la expresión génica y la secreción de la hCG β , c) la síntesis de la hCG β estimulada por el TGF- β es inhibida por el calcitriol, d) la expresión génica del receptor de la hCG β no fue modificada por ningún esquema de tratamiento, e) los tres compuestos inhiben significativamente la proliferación de las células DU-145 y f) la combinación del calcitriol y el TGF- β 1 con la hCG, inhibieron más la proliferación celular en comparación con el control o con cada uno de estos tratamientos. Conclusión, los resultados sugieren que mantener adecuadas concentraciones de vitamina D podría mediar los efectos del TGF- β sobre la síntesis de la hCG y así controlar la proliferación de las células de cáncer de próstata humana.

4 Introducción

4.1 Generalidades del cáncer

Considerando la definición tomada del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos del 2015 [1], el término cáncer es dado a un grupo de enfermedades relacionadas que se caracterizan por una división descontrolada de células que poseen el potencial de invadir otros tejidos, ocasionados por cambios a nivel del genoma que afectan una amplia variedad de genes con funciones cruciales que coordinan el balance celular. Estas modificaciones generan insensibilidad a señales reguladoras que median los programas de crecimiento, sobrevivencia y muerte que conducen a la proliferación, crecimiento e invasión celular descontrolada [1].

El cáncer puede empezar casi en cualquier lugar del cuerpo humano. De forma natural, las células humanas crecen y se dividen a medida que el cuerpo las necesita. Cuando las células normales envejecen o se dañan, mueren y nuevas las remplazan. Sin embargo, en el cáncer, este proceso ordenado se descontrola. A medida que las células se hacen más y más anormales, las viejas o dañadas sobreviven cuando deberían morir y nuevas se forman cuando no son necesarias. Estas células adicionales pueden dividirse sin interrupción y formar masas llamadas tumores [1]. Asimismo, la acumulación celular puede crecer e invadir el tejido cercano mientras que algunas células anormales pueden desprenderse y esparcirse hacia otras partes del cuerpo desencadenando la metástasis [2].

4.2 Incidencia del cáncer

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo; en el 2015, ocasionó 8.8 millones de defunciones. Casi una de cada seis defunciones en el mundo se debe a esta enfermedad [3]. En el 2018, se estimó un diagnóstico de 2, 129, 118 casos nuevos de cáncer en Estados Unidos con 609, 640 personas fallecidas por la enfermedad. En México, cada año se estiman 190, 667 nuevos casos de cáncer y 78, 719 personas fallecidas [4]. Los nuevos datos sugieren que la carga mundial ha aumentado a 18.1 millones de casos y a 9.6 millones de muertes por este padecimiento. Los cánceres más comunes (enumerados en orden descendente según los nuevos casos estimados en 2018) son mostrados en la Figura 1 [5].



Figura 1. Incidencia mundial de diferentes tipos de cáncer (imagen tomada de GLOBOCAN, 2018; <http://gco.iarc.fr/>) [5].

De acuerdo a la OMS, el cáncer de próstata (CP) ocupa el segundo lugar de incidencia y el quinto en mortalidad entre la población masculina a nivel mundial (Figura 2A). En el caso de México, el CP ocupa el primer lugar de incidencia y mortalidad entre la población masculina (Figura 2B) [3].

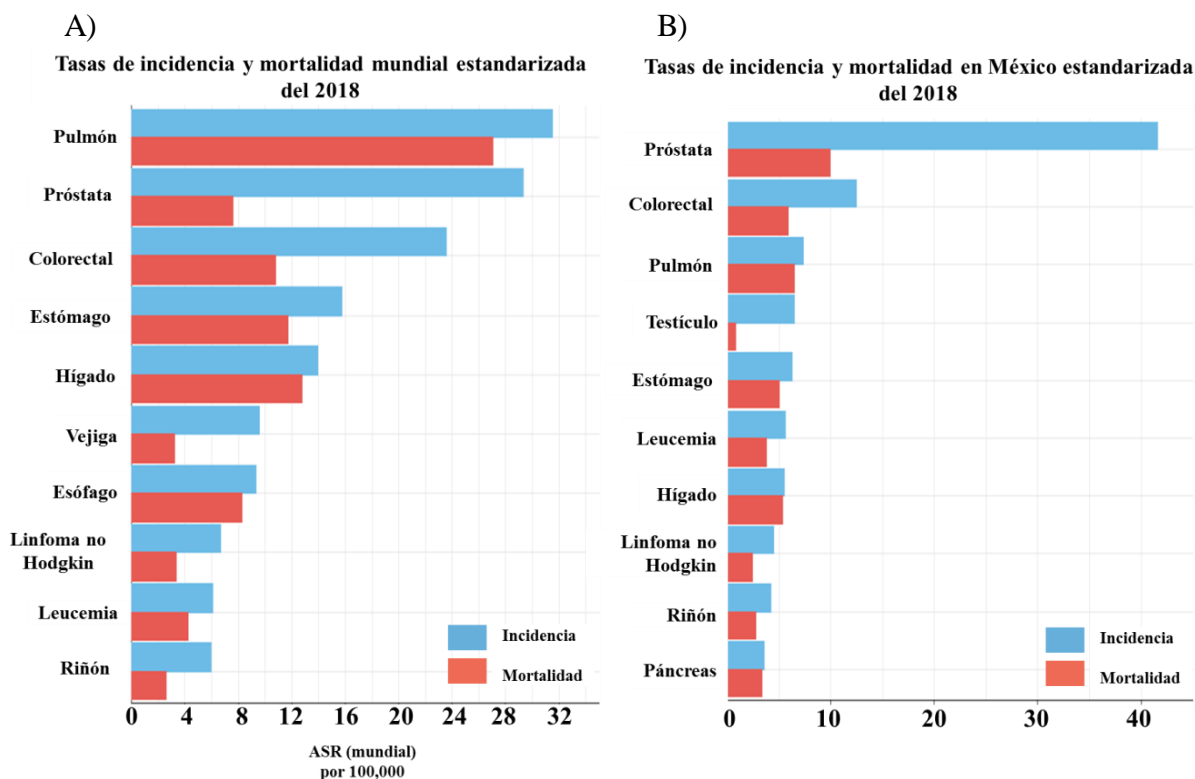


Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer de próstata. A) Cáncer de próstata mundialmente, B) Cáncer de próstata en México (imagen tomada de GLOBOCAN, 2018) [4]. ASR; tasa de incidencia estandarizada por edad.

4.3 Próstata

La próstata es una glándula presente en los hombres que se encuentra debajo de la vejiga y delante del recto, la cual produce parte del líquido que conforma el semen. En los hombres jóvenes, su tamaño es aproximado al de una nuez, sin embargo, puede ser mucho más grande en hombres de más edad. Justo detrás de la próstata se encuentran las glándulas

llamadas vesículas seminales, las cuales producen la mayor parte del líquido del semen. La uretra, que es el conducto que transporta la orina y el semen fuera del cuerpo a través del pene, pasa por el centro de la próstata (Figura 3) [6].

4.4 Cáncer de próstata

El cáncer de próstata (CP), se origina cuando las células de la próstata comienzan a crecer sin control. Es una enfermedad maligna, que afecta a varones mayores de edad (mediana; 60 años). Se origina en la parte periférica de la glándula (Figura 3), su ciclo evolutivo se inicia en neoplasia intraepitelial prostática, avanza luego a cáncer *in situ*, cáncer invasor y posteriormente metastásico. Cuando la enfermedad evoluciona se presentan signos de obstrucción urinaria baja y dolor que comúnmente se pueden confundir en un inicio con una infección urinaria baja u obstrucción por desarrollo glandular [7]. El CP se presenta en forma asintomática y es de progresión lenta, lo que lleva muchas veces a un diagnóstico tardío, es decir, cuando el cáncer ya se encuentra en un estado muy avanzado [8].

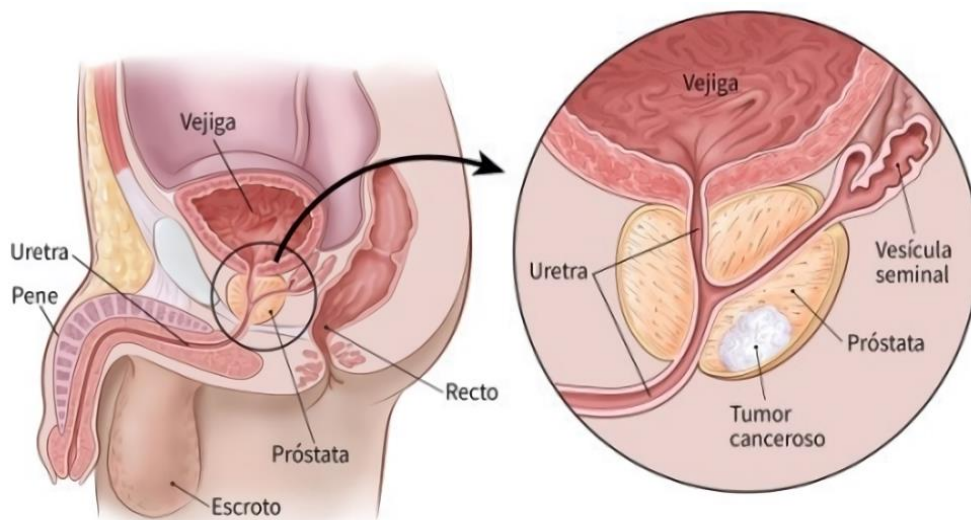


Figura 3. Esquema que muestra la ubicación de la próstata y del cáncer de próstata, el cual se origina en la parte periférica de la glándula [6].

El CP es una patología de etiología multifactorial, caracterizada por heterogeneidad génica y fenotípica [9]. En particular, el receptor de andrógenos activado por el andrógeno permite su translocación al núcleo como homodímero para regular la expresión de genes específicos, sin embargo, cuando existe un desequilibrio en su regulación, la vía de señalización del receptor de andrógenos tiene un papel importante en el desarrollo temprano de esta enfermedad, ya que se activan genes implicados en el desarrollo y progresión del CP [10,11]. En la mayoría de los casos, en estados avanzados el CP se vuelve independiente de andrógenos, progresando hacia una enfermedad con alta morbilidad denominada CP resistente a la castración (CRPC; por sus siglas en inglés, Castration-resistant prostate cancer), lo que favorece su actividad proliferativa e invasiva, con un fenotipo más agresivo y culminando en metástasis [9-11].

4.5 Tratamientos del cáncer de próstata

El tratamiento utilizado para el cáncer varía y depende de múltiples factores que incluyen el tipo, la localización, la extensión de la enfermedad y del estado de salud del paciente. La mayoría de los tratamientos están diseñados ya sea para eliminar directamente a las células cancerígenas o para producir eventualmente su muerte al privarlas de las señales celulares necesarias para la división celular [12]. Con base en el diagnóstico se establecen las terapias para un CP en etapas tempranas (vigilancia, cirugía, radioterapia, terapias focales y extirpación de la próstata) o un CP en etapas avanzadas (terapias hormonales, quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia) [12,13].

En particular, la terapia de privación de andrógenos (ADT), resulta conveniente para aquellos pacientes que presentan CP metastásico o de recurrencia después del tratamiento [14]. 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 que en principio depende de la estimulación androgénica [15]. Sin embargo, debido a la heterogeneidad de las células tumorales, muchos pacientes desarrollan resistencia al tratamiento y progresan hacia un CRPC, el cual tiene pocas opciones terapéuticas [9,16,17].

4.6 Calcitriol

En los últimos 20 años, diferentes estudios han sugerido que la 1α , 25-dihidroxitamina D3 (calcitriol; forma activa de la vitamina D) tiene un papel preventivo y protector contra diferentes tipos de cáncer [18]. Aunque sus funciones durante mucho tiempo fueron asociadas exclusivamente con la homeostasis de calcio, el calcitriol tiene un amplio rango de funciones en procesos fisiológicos [18]. En diferentes tipos celulares el calcitriol regula procesos de inflamación, angiogénesis, diferenciación y apoptosis, así como modula el crecimiento, proliferación e invasión celular [18]. Asimismo, su deficiencia ha sido asociada con diferentes enfermedades autoinmunes, cardiovasculares y con varios tipos de cáncer, entre ellos el CP [18].

4.7 Metabolismo del calcitriol

El calcitriol, es un secoesteroide cuya síntesis comienza en la piel a partir del 7-dehidrocolesterol, que por acción de la luz ultravioleta del sol (UV 290-315 nm), dará lugar a la pre-vitamina D3, la cual se isomeriza a temperatura corporal para formar a la vitamina

D3 (colecalférol) [19]. El colecalférol, pasa a la circulación y se une a la proteína de transporte de vitamina D que lo traslada al hígado, en este órgano, se hidroxila el carbono 25 del colecalférol, por la actividad enzimática del citocromo CYP2R1, dando lugar a la 25OH-vitamina D (calcidiol) [20]. El calcidiol formado se transporta principalmente al riñón, lugar donde se da una segunda hidroxilación, ahora en el carbono 1 por el citocromo CYP27B1 mitocondrial, que forma al calcitriol (Figura 4) [21]. Cabe mencionar que la presencia del CYP27B1 se encuentra en diversos tejidos extra-renales incluyendo células del tejido prostático (Figura 4) [21].

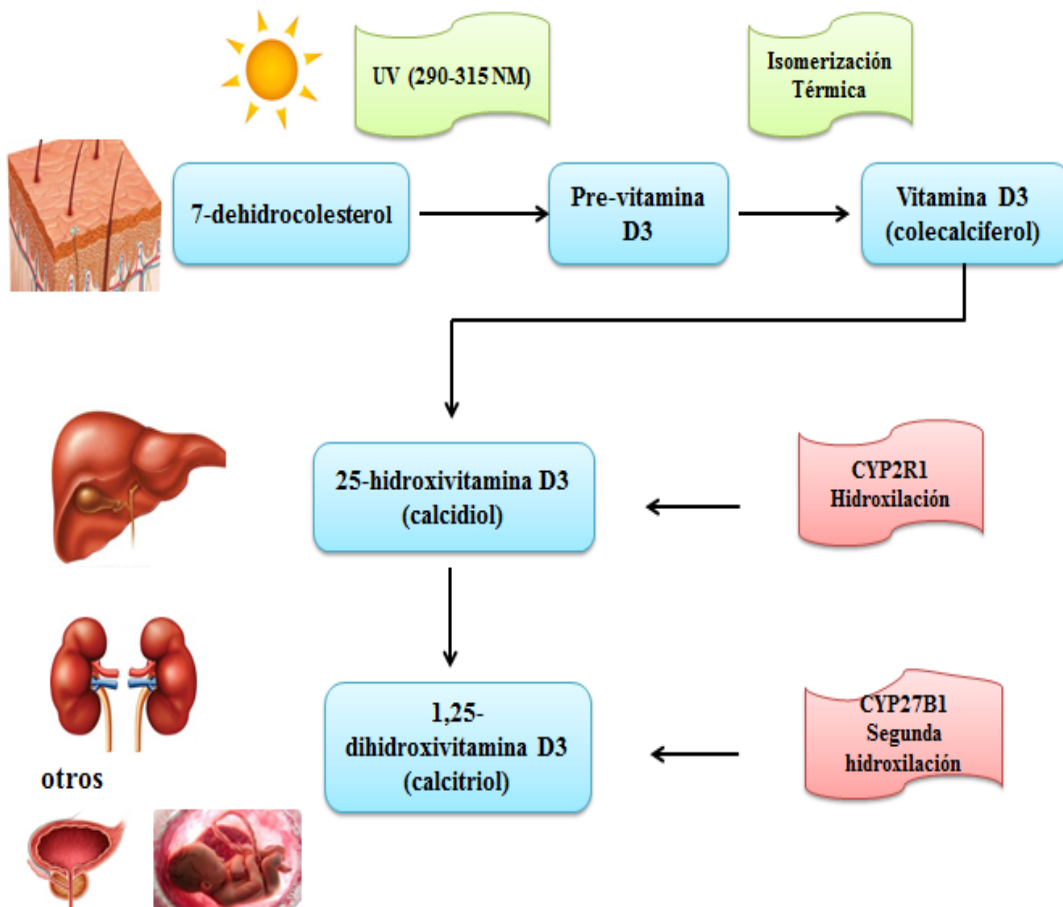


Figura 4. Órganos involucrados en la ruta de síntesis del calcitriol. Piel; Formación del colecalférol a partir del precursor 7-dehidrocolesterol. Hígado; Formación del calcidiol. Riñón y otros; Síntesis del calcitriol.

4.8 Mecanismo de acción del calcitriol

El calcitriol es una hormona versátil que participa en la regulación de un gran número de funciones en el organismo y sus mecanismos de acción se pueden dividir en dos: el genómico (clásico) y el no genómico [18,22].

En la vía clásica de acción genómica, el calcidiol/calcitriol transportado a la célula blanco, es liberado y difunde a través de la membrana celular debido a su naturaleza lipídica o puede internalizarse con la ayuda de proteínas transmembranales como es la megalina [19]. Una vez dentro de la célula, el calcidiol que se biotransforma en calcitriol o el calcitriol libre, se une al receptor de vitamina D (VDR), el cual pertenece a la familia de receptores nucleares. Tras la unión del ligando, el receptor funciona como un heterodímero obligado con el receptor de retinoides RXR [23]. Este complejo (calcitriol/VDR/RXR), reconoce los elementos de respuesta a vitamina D en regiones promotoras de genes blanco, que ocasiona el reclutamiento de co-activadores o co-represores para inducir o reprimir la transcripción (Figura 5) [19].

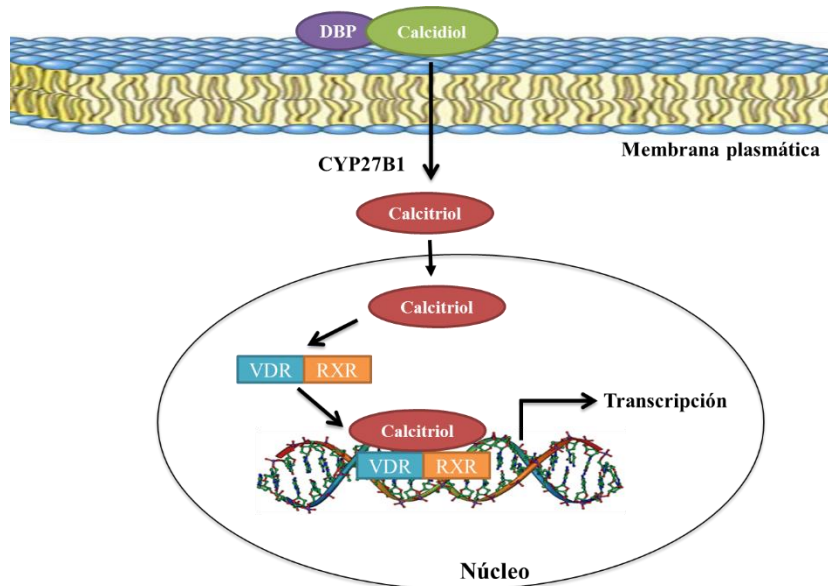


Figura 5. Mecanismo de acción genómico del calcitriol [23,19].

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, que no dependen del proceso transcripcional regulado por su receptor nuclear [24-26]. En efecto, el calcitriol puede unirse a receptores específicos o no específicos en la membrana, que pueden activar diferentes moléculas de señalización como son: la fosfolipasa C y la fosfolipasa A2 (PLA2), la fosfatidil inositol-3 cinasa (PI3K) y p21ras, generando la producción de segundos mensajeros (Ca^{++} , AMP cíclico, ácidos grasos y el fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato) que a su vez activan proteínas blanco como la proteína cinasa A (PKA), la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), la proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa calcio-calmodulina II (Ca^{++} -calmodulin kinase II) [9,13-16]. Asimismo, las acciones no genómicas pueden incluir también la apertura de canales de Ca^{++} y Cl^- , entre otros. [23,27].

4.9 Calcitriol y cáncer de próstata

Estudios *in vitro* e *in vivo*, han demostrado que el calcitriol inhibe el crecimiento de células normales y malignas de próstata, cuyo efecto ha sido relacionado con diversos mecanismos incluyendo el arresto del ciclo celular en G1/S, la reducción del daño al ADN por diversos factores, regulación por microRNAs, inducción de apoptosis, entre otros [28]. De manera interesante, se ha descrito que el calcitriol inhibe el crecimiento de la línea celular de cáncer de próstata LNCaP, al inducir apoptosis y arresto del ciclo celular, mientras que en la línea celular PC-3 se ha propuesto que el calcitriol inhibe el crecimiento celular al menos en parte, al estimular la síntesis del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) [29].

4.10 Generalidades del factor de crecimiento transformante (TGF- β)

El TGF- β , pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento transformante, la cual contiene más de 35 polipéptidos secretados, incluyendo al TGF- β , las activinas y las proteínas morfogénicas del hueso [30].

Los miembros de la familia TGF- β tienen diferentes acciones en la regulación de funciones celulares que involucran la proliferación celular, la diferenciación, la migración y la deposición de matriz extracelular [31].

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 de ellas, las cuales, son secretadas como un precursor inactivo llamado TGF- β latente. Las isoformas TGF- β_1 , $-\beta_2$ y $-\beta_3$ aunque presentan distintos patrones de expresión, comparten una alta homología de secuencias de aminoácidos y sus funciones son mediadas por los mismos receptores [32]. Actualmente, se sabe que se sintetizan por diferentes tipos celulares incluyendo células tumorales, entre ellas las del CP [32].

El TGF- β , es un regulador de diversas actividades celulares con múltiples efectos biológicos, cuya identificación ha permitido entender algunos mecanismos por los cuales las funciones celulares están reguladas en la salud y alteradas en la enfermedad [32]. Es bien conocido que el TGF- β lleva a cabo sus efectos principalmente a través de su vía de señalización canónica mediada por la interacción con sus receptores de membrana, los cuales subsecuentemente propagan la señal mediante la activación de diferentes proteínas conocidas como Smads. Sin embargo, se ha descrito también que existen rutas alternas no canónicas para ejercer sus efectos como la vía de las MAPKs, entre otras [33].

4.11 TGF- β y cáncer

Alteraciones en el número y funcionalidad de sus receptores, sus vías de señalización o la concentración del TGF- β , han sido implicadas en condiciones patológicas como el cáncer [32,34,35]. En general, está descrito que el TGF- β tiene efectos duales en el cáncer, ya que en tejido sano o al comienzo de la formación de los tumores, el TGF- β inhibe la proliferación celular, pero con la desdiferenciación en curso el TGF- β aumenta la motilidad y la metástasis [31]. No obstante, el papel que tiene el TGF- β en el CP es controversial, ya que el efecto supresor o promotor de tumores, depende de las características y capacidades de respuesta de la célula tumoral [31,33].

En efecto, aunque se ha reportado que en la vía de señalización del TGF- β , las proteínas Smad son un blanco con una alta frecuencia de mutaciones con potencial tumorigénico [31], que la pérdida de la expresión de los receptores al TGF- β es uno de los mecanismos por los cuales las células evaden la respuesta celular [31] y que altas concentraciones plasmáticas del TGF- β se han asociado con la progresión del CP hacia estados más agresivos e invasivos [32], en el contexto de la proliferación celular, se ha descrito que el TGF- β envía señales para mantener a las células detenidas en la fase G1 del ciclo celular [32], inhibe la proliferación e induce la apoptosis en la línea celular de próstata RWPE-1 y células epiteliales prostáticas de rata respectivamente [36,37] y de manera interesante, el TGF- β suprime la proliferación y el crecimiento celular en varias líneas CRPC [29,38,39]. De lo anterior, resulta interesante indagar más a detalle el mecanismo por el cual ejerce estos efectos y los blancos moleculares implícitos en su regulación.

4.12 Generalidades de la gonadotropina coriónica humana (hCG)

La gonadotropina coriónica humana (hCG), es una glicoproteína de 237 aminoácidos con un peso molecular de 38 kDa formada por dos subunidades, una α y otra β codificadas por genes independientes. La hCG forma parte de la familia de las glicoproteínas heterodiméricas hipofisarias: LH, FSH y TSH [42]. La subunidad α de la hormona, es igual a las restantes glicoproteínas hipofisarias mientras que la subunidad β le confiere sus características biológicas e inmunológicas [40]. Esta hormona lleva a cabo sus efectos al unirse con el receptor de LH/hCG (LHCGR), el cual, presenta amplia distribución en diferentes tejidos y pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G, que al interactuar con la hormona desencadenan vías de señalización por el AMPc [41].

4.13 hCG y Cáncer

La hCG es una hormona sintetizada durante el embarazo por el trofoblasto placentario normal ó patológico (mola hidatiforme y coriocarcinoma). Además, su síntesis ha sido reportada también por algunos tejidos anómalos, tumores o cánceres (carcinoma testicular u ovárico de tipo germinal) y en bajas concentraciones por la hipófisis [41]. De hecho, la hCG es considerada un marcador tumoral asociado a enfermedades malignas tanto trofoblásticas como no trofoblásticas y de tumores de células germinativas por lo cual, se ha utilizado como marcador no sólo para el diagnóstico, sino para vigilar el tratamiento en pacientes con tumores secretores de esta glicoproteína [42]. Además, la sobreexpresión de la hCG en los adultos, especialmente en las mujeres, también se ha relacionado con el desarrollo de cáncer de vejiga [42,43]. Sin embargo, datos controversiales han sido publicados en la literatura, en la cual, se ha sugerido que la hCG puede prevenir el cáncer

de mama [44]. En cuanto al CP, se ha reportado que en la línea celular DU-145, la hCG induce migración e invasión celular al promover la fosforilación de ERK1/2 y al aumentar la expresión y actividad de la MMP-2 [45]. No obstante, en términos de muerte celular, la radioterapia para tratar este tipo de cáncer, mejora cuando se combina este tratamiento con la hCG, es decir, la combinación induce mayor muerte celular que por separado [46].

Por todo lo anterior, nos resulta interesante conocer si el calcitriol y el TGF- β afectan la expresión de la hCG y su receptor, usando como modelo biológico, la línea celular de cáncer de próstata; DU-145. Asimismo, indagar el efecto sobre la proliferación de esta línea celular, por la presencia de hCG sola o en combinación con el calcitriol y el TGF- β .

5 Planteamiento del problema

Actualmente, se buscan alternativas terapéuticas con mayor eficacia y menor agresividad para el paciente con neoplasias malignas. De lo anterior, se sabe que compuestos naturales como el calcitriol y el TGF- β tienen la capacidad de inhibir la proliferación celular del cáncer de próstata. Sin embargo, los mecanismos por el cual ejercen sus efectos aún están en estudio. Tomando en cuenta que la hCG es considerada un marcador tumoral y que existen datos controversiales en la literatura de sus efectos en el CP, nos resultó interesante evaluar el efecto del calcitriol y el TGF- β sobre la expresión génica de la hCG y su receptor, así como estudiar si en un esquema de combinación de estos compuestos se afecta la proliferación de la línea celular de cáncer de próstata humano DU-145.

6 Justificación

El cáncer de próstata es un problema de salud pública. Por lo cual, entender los mecanismos de acción de moléculas con potencial anti-neoplásico como el calcitriol, el TGF- β y la hCG resulta interesante, ya que derivado de los resultados que se obtengan, se pueden proponer a estas moléculas como tratamientos naturales, coadyuvantes o posibles potenciadores quimioterapéuticos con la finalidad de prevenir, aminorar o retardar el crecimiento de las células cancerígenas de próstata. Adicionalmente, los resultados del presente estudio permitirán conocer si existe una interrelación entre estas moléculas para mediar procesos no solo de proliferación, sino de migración e invasión celular.

7 Hipótesis

Tomando en cuenta los efectos antineoplásicos del calcitriol y el TGF- β 1 en el cáncer de próstata, es posible que el calcitriol y el TGF- β 1 solos o en combinación modifiquen la expresión génica de la *hCG β* y su receptor en la línea celular de cáncer de próstata humano DU-145. Asimismo, se espera que en combinación con la hCG, estos compuestos favorezcan los procesos de inhibición de la proliferación celular.

8 Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto del calcitriol y del TGF- β 1 sobre la expresión y síntesis de la hCG β y su receptor, así como determinar su impacto combinado sobre la proliferación celular de la línea de cáncer de próstata humano DU-145.

Objetivos Particulares

Estudiar el efecto del calcitriol y del TGF- β 1 solos o en combinación sobre la expresión génica de la *hCG β* en la línea celular de cáncer de próstata humano DU-145.

Determinar el efecto del calcitriol y del TGF- β 1 solos o en combinación sobre la expresión génica del *LHCGR* en la línea celular de cáncer de próstata humano DU-145.

Evaluar la secreción de la hCG β en el medio de cultivo en la línea celular de cáncer de próstata humano DU-145 tratadas con calcitriol y TGF- β 1.

Indagar el efecto del calcitriol, del TGF- β 1 y de la hCG solos o en combinación sobre la proliferación celular de la línea celular de cáncer de próstata humano DU-145.

9 Metodología

9.1 Cultivo Celular

En este estudio se utilizó la línea celular de cáncer de próstata humana DU-145 como modelo biológico, la cual tenía un bajo número de pasajes (4-10 pasajes). Esta línea celular, es un adenocarcinoma de tipo CRPC que presenta potencial metastásico moderado, en la cual se ha demostrado la presencia del VDR y de los receptores al TGF- β . Las células DU-145 fueron obtenidas de la 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), 100 mg/mL de penicilina estreptomina (Gibco EE. UU.) e incubadas a 37°C en una atmósfera de 5 % CO₂ y 95 % de humedad. El calcitriol y la hCG fueron obtenidos de Sigma Chemical Aldrich y el TGF- β de Preprotech (EE. UU.).

9.2 Estudios de Expresión Génica

En cajas de 6 pozos (Thermo Fisher, Corea), fueron sembradas 150 mil células y 24 horas después de la siembra se hicieron curvas con diferentes concentraciones de calcitriol (0.1, 1.0, 10 y 100 nM), y TGF- β 1 (1, 5 y 10 ng/mL) y se incubaron las células por 24 horas más. Adicionalmente, se probaron los tratamientos en combinación (calcitriol 10 nM con TGF- β 1 5 ng/mL).

9.2.1 Extracción del RNA

Para la extracción total del RNA se utilizó el reactivo comercial Trizol (Ambion by Life Technologies, EE.UU.) de acuerdo a la técnica de Chomczynski y Sacchi [47]. Después del periodo de incubación, se succionó el medio e inmediatamente a las células adheridas en los pozos se les añadió 500 μ L de Trizol. Posteriormente, fueron raspadas con scrapers y recolectadas en tubos eppendorf de 1.5 mL estériles, a los cuales se les adicionó 210 μ L de

cloroformo frío, se les agitó con un vórtex y se centrifugaron (microcentrífuga Eppendorf 5417R, EE. UU.) a 12,000 rpm a 4 °C por 20 min. Con lo cual, se formaron tres fases: una inferior con el DNA, una intermedia con proteínas y una superior con el RNA. La fase superior que contenía el RNA se recolectó en nuevos tubos eppendorf estériles y a cada muestra se le agregó 500 µL de isopropanol, para precipitar el RNA por lo menos durante 15 min, después se les agitó y se centrifugaron a 13,200 rpm a 4 °C por 20 min. más para obtener un pellet con la muestra de RNA. El sobrenadante se decantó de un solo golpe y al pellet se le agregó 900 µL de alcohol etílico al 75%, se agitaron los tubos y se centrifugaron a 13,200 rpm a 4 °C por 20 min. Al finalizar se decantaron los tubos y se dejaron invertidos para secar el exceso de etanol. Por último, el pellet de RNA antes de su secado total se resuspendió en 22 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) para protegerlo de las RNAsas (Figura 6).

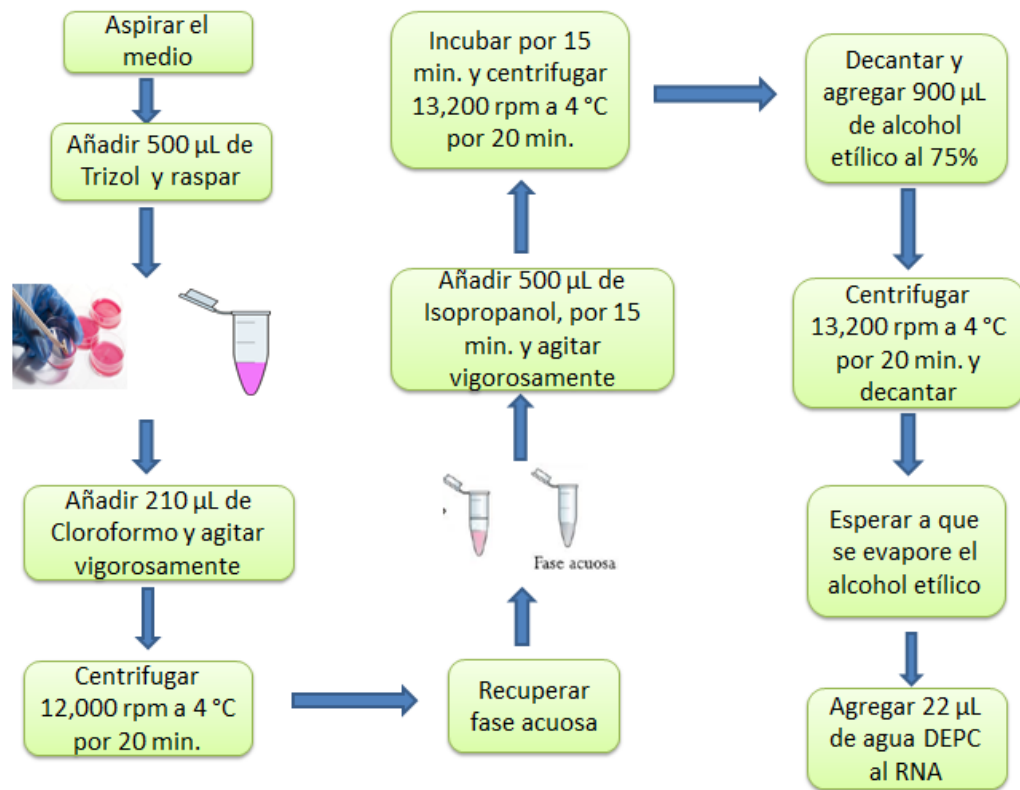


Figura 6. Extracción del RNA mediante la técnica de Chomczynski y Sacchi [47].

9.2.2 Cuantificación del RNA

El RNA se evaluó usando el espectrofotómetro Synergy HT (Bio Tek, EE.UU), el cual requiere tan solo 2 μL de cada muestra que fueron depositados en una la placa de lectura de 16 pozos. Para determinar la cantidad y pureza del RNA de cada muestra el espectrofotómetro estaba calibrado con absorbancia de 260/280 nm. Se consideró un valor entre 1.8 a 2.0 para hacer la retrotranscripción. Cabe señalar que de forma automática el software del espectrofotómetro nos determinó la concentración total del RNA en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a partir del cual se hicieron los cálculos para obtener de cada muestra 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de RNA.

9.2.3 Retrotranscripción

Para la síntesis del DNA complementario (cDNA), se empleó el kit Thermo Scientific. De acuerdo a las instrucciones del fabricante, en cada tubo estéril de 200 μL se colocaron 4 μL de reacción de mezcla, 2 μL de la enzima maximina, 1 μg de RNA y a completar con agua libre de nucleasas obteniendo un volumen final de 20 μL . A continuación, se colocaron los tubos en un Termociclador Veriti (Applied Biosystems, Singapur) programado por 30 min. a 25 °C, 15 min. a 50 °C y 5 min. a 85 °C. El cDNA obtenido se guardó a -20 °C hasta su amplificación mediante la técnica denominada; reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

9.2.4 Amplificación del cDNA

La amplificación de cada gen de interés (hCG β y LHCGR) se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), para ello se utilizó el estuche comercial LigthCycler Taqman Master (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para lo cual, 1 μL del cDNA, se resuspendió en una mezcla de reacción que consta de 5.7 μL de agua de 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 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 1,500 rpm durante 30 segundos y se colocó en un termociclador LightCycler 480, previa programación para realizar la qPCR según las condiciones que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Protocolo de amplificación del cDNA por qPCR.

Ciclos	Temperatura (°C)	Evento	Tiempo (segundos)
1	95	Activación de la enzima Taqman y desnaturalización inicial del cDNA	600
45	95	Desnaturalización del cDNA	10
	60	Alineamiento	30
	72	Alargamiento	1
1	40	Enfriamiento	10

Los iniciadores y las sondas específicas (tabla 2) fueron diseñados usando el Universal Probe Library Design Center de Roche. Los genes de interés fueron normalizados con el gen constitutivo *β -actina*.

Tabla 2. Secuencias de los iniciadores y sondas utilizadas en la qPCR

GEN	Orientación del oligo Left (L) Right (R)	No. sonda	No. de accesión
<i>β-actina</i>	CCAACCGCGAGAAGATGA (L) CCAGAGGCGTACAGGGATAG(R)	64	NM_001101.3
<i>hCG-β</i>	TGTGCATCACCGTCAACAC (L) GGTAGTTGCAACACCACCTGA (R)	43	J00117.1
<i>LHCGR</i>	TGCACAATGGAGCCTTCC (L) GCAATTAGCCTCTGAATGGACT (R)	31	NM_000233.3

9.3 Ensayo de ELISA

La técnica de ELISA es un inmunoensayo enzimático, el estuche comercial DRG β -HCG (DRG Instruments GmbH, Alemania), proporciona los materiales necesarios para determinar cuantitativamente la hCG + hCG- β . Este es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas basado en el principio del sándwich. Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo monoclonal/policlonal dirigido contra un único foci antigénico en la molécula de la hCG β . Se incubó una alícuota de la muestra en los pocillos recubiertos con el enzima conjugado, que es un anticuerpo anti- hCG β conjugado con la peroxidasa endógena. Después de la incubación se lava el conjugado que no se ha unido. La cantidad de peroxidasa unida es proporcional a la concentración de la HCG/HCG β en la muestra. Cuando se añade la solución del sustrato de la peroxidasa, la intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de la hCG/hCG β en la muestra.

Brevemente:

Se colocaron 25 μ L de los estándares para construir la curva de calibración y 200 μ L de las muestras (se puso mayor volumen de muestra debido a que la secreción de la hCG β es muy baja). Inmediatamente, se les añadió 100 μ L de la enzima conjugada, se mezcló y se incubó por 60 min. a temperatura ambiente. Después, se lavaron los pozos 5 veces con agua destilada y el exceso de agua se eliminó al sacudir y golpear la placa sobre una cama de toallas de papel absorbente. Se adicionó 100 μ L de la solución sustrato y se incubó por 15 min. más. Para detener la reacción enzimática se les agregó 50 μ L de solución de paro.

Se leyeron las absorbancias a 450 ± 10 nm con un lector de placas dentro de los 10 min. después de añadir la solución de paro.

9.4 Ensayos de proliferación celular

Considerando datos previos en nuestro laboratorio [48]. Las células se sembraron en placas de 96 pozos a razón de 1,000 células por pozo y 24 horas después se realizó el cambio de medio sin y con los tratamientos: calcitriol (10 nM y 100 nM), TGF- β (1 y 5 ng/mL) y hCG (200 ng) así como su combinación, los ensayos se realizaron por sextuplicado, y las células tratadas se incubaron durante cuatro días. Al cabo de este tiempo, se evaluó la proliferación celular mediante el ensayo colorimétrico basado en XTT (sodio 3'-(fenilaminocarbonilo)-3,4-tetrazolium)-bis (4-metoxi-6-nitro) hidrato ácido bencénico sulfónico), siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente: La sal de tetrazolium, XTT, se usa para determinar cuantitativamente la proliferación de las células metabólicamente activas. El ensayo se basa en la escisión del anillo de tetrazolium del XTT (de color amarillo) por la succinato deshidrogenasa mitocondrial y el reactivo acoplador de electrones PMS (N-metildibenzopirazina metil-sulfato) para formar la sal de formazan (de color naranja), la cual es soluble en solución acuosa y se cuantificó por absorbancia mediante un espectrofotómetro Multiskan (Labsystems Inc. Canada) a 492 nm.

A)

	Tratamientos
	Solución salina
	Blanco/medio
	Curva celular

Caja 0

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		250 células										
C		500 células										
D		1000 células										
E		1500 células										
F		1750 células										
G		2000 células										
H												

B)

Caja de tratamientos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		250 células			Control				Tratamiento			
C		500 células			1000 células/pozo				1000 células/pozo			
D		1000 células			Tratamiento			Tratamiento				
E		1500 células			1000 células/pozo			1000 células/pozo				
F		1750 células			Tratamiento			Tratamiento				
G		2000 células			1000 células/pozo			1000 células/pozo				
H												

Figura 7. Cajas de 96 pozos para ensayos de proliferación celular. A) caja control, correspondiente al tiempo 0, donde se aprecia la curva de calibración (250 a 2000 células). B) caja con curva de calibración y diferente esquema de tratamientos por sextuplicado usando 1,000 células por pozo.

9.5 Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar (DE) de al menos tres ensayos diferentes con triplicados para la expresión génica y por sextuplicados para los ensayos de proliferación. Los análisis estadísticos se determinaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y todas las comparaciones múltiples por el método de Holm-Sidak, utilizando un paquete de software especializado (SigmaPlot 11.0). Valores de $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos.

10 Resultados

10.1 Efecto del calcitriol y del TGF- β 1 solos o en combinación sobre la expresión génica de la *hCG β*

Se evaluó la expresión génica de la *hCG β* en ausencia y presencia de calcitriol (0.1, 1.0, 10 y 100 nM) y del TGF- β 1 (1, 5 y 10 ng/mL) durante 24 horas. Como se aprecia en la figura 8A, el calcitriol no tiene efecto sobre la expresión génica de la *hCG β* mientras que el TGF- β 1 estimula significativamente la expresión más de 3 veces comparada con el control. No obstante, la figura 8B, nos muestra que en co-incubación, el calcitriol atenúa la expresión de la *hCG β* inducida por el TGF- β 1.

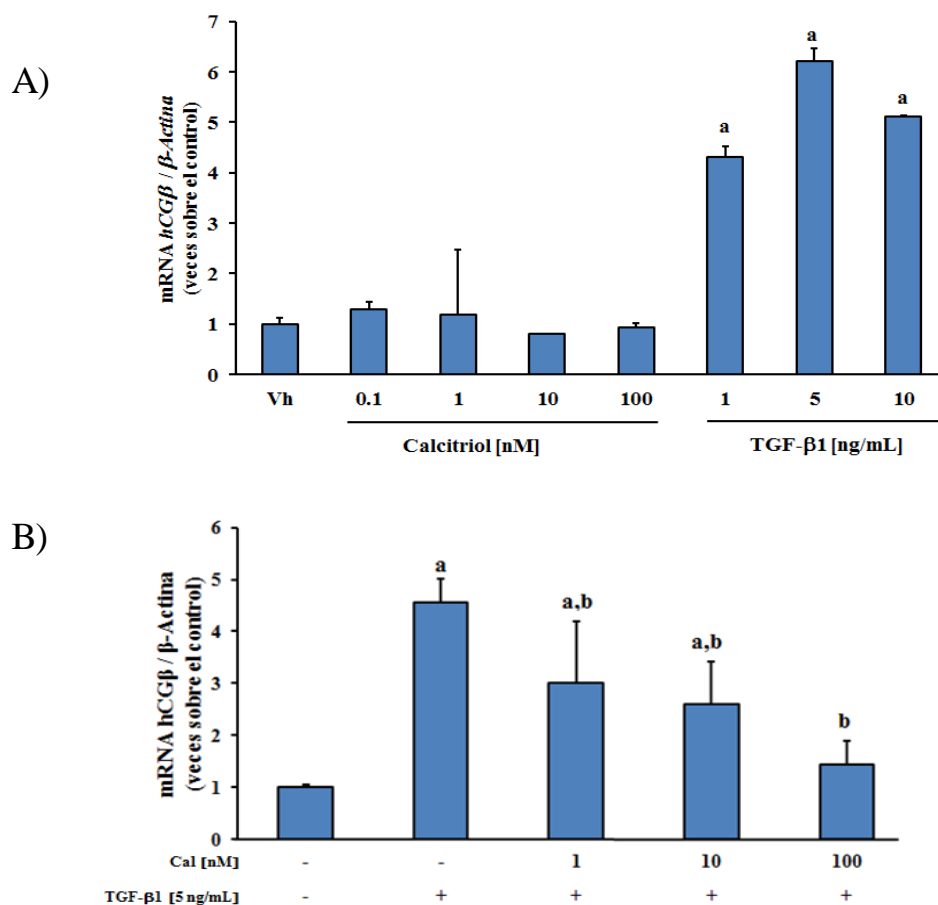


Figura 8. Expresión génica de la *hCG β* . A) En presencia del calcitriol y del TGF- β 1 por separado y B) en co-incubación de calcitriol con TGF- β 1 durante 24 horas. Se realizaron 3 experimentos diferentes con tratamientos por triplicado. $n=3 \pm DE$ ^a $p < 0.05$ vs control, ^b $p < 0.05$ vs TGF β 1.

10.2 Expresión génica del receptor *LHCGR* en ausencia y presencia del calcitriol y del TGF- β 1 solo o en combinación

Como se aprecia en la figura 9, la expresión génica del receptor *LHCGR* es muy baja y no se estimula significativamente en presencia de los diferentes tratamientos comparados con el control.

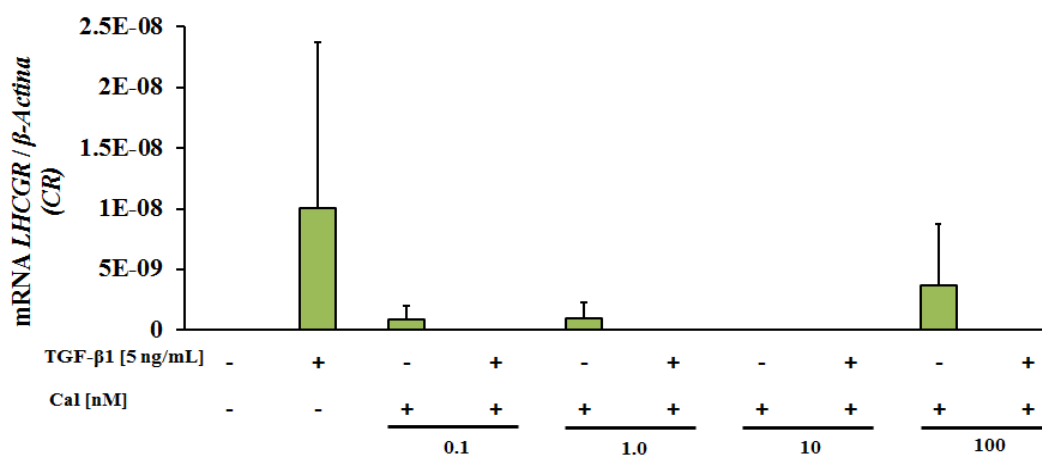


Figura 9. Expresión génica del receptor *LHRHCG* en ausencia o presencia del calcitriol y del TGF- β 1, solos o en combinación. Las células DU-145 fueron tratadas con el TGF- β 1 y diferentes concentraciones de calcitriol durante 24 horas. Se realizaron 3 experimentos diferentes con tratamientos por triplicado. $n=3 \pm$ DE.

10.3 Efecto del calcitriol y del TGF- β 1 solos o en combinación sobre la secreción de la hCG β

El efecto de los tratamientos solos o en co-incubación fue evaluado sobre la secreción de la hCG β . Cabe mencionar que nuestro estuche comercial de ELISA para la hCG β , no detectó a la glicoproteína en condiciones basales ni en presencia de calcitriol. Sin embargo, como se aprecia en la Figura 10, de manera similar a la expresión génica, el TGF- β 1 estimuló la secreción de la hCG β , la cual fue inhibida en presencia del calcitriol.

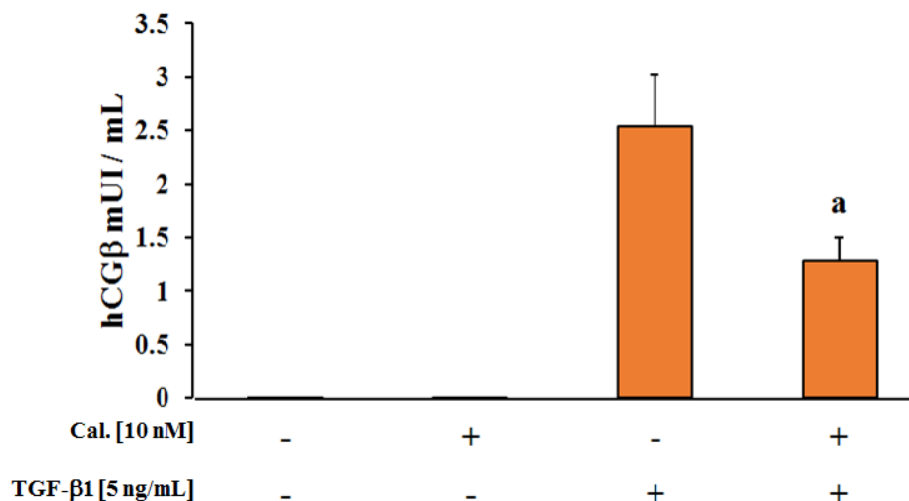


Figura 10. Efecto del calcitriol y del TGF-β1 solos o en combinación sobre la secreción de la hCGβ en los medios de cultivo. Las células DU-145 fueron tratadas con el calcitriol y/o el TGF-β1 por 48 h y la secreción de la hCG fue evaluada. n=3 ± DE ^ap < 0.05 vs TGF-β1.

10.4 Efecto del calcitriol y el TGF-β1 solos o en combinación sobre la proliferación celular

El efecto del calcitriol y del TGF-β1 sobre la proliferación celular fue evaluado después de cuatro días de incubación. Como se observa en la Figura 11, el calcitriol inhibió significativamente la proliferación de las células DU-145, en una concentración de 10 y 100 nM con una disminución en la proliferación del 14 % y del 18% respectivamente, comparadas con el control.

Con respecto al TGF-β1, la concentración de 1 y 5 ng/mL disminuyó 5 y 13% la proliferación celular con respecto al control, respectivamente. De manera interesante, las combinaciones inhibieron aún más la proliferación con respecto al control y los tratamientos por separado.

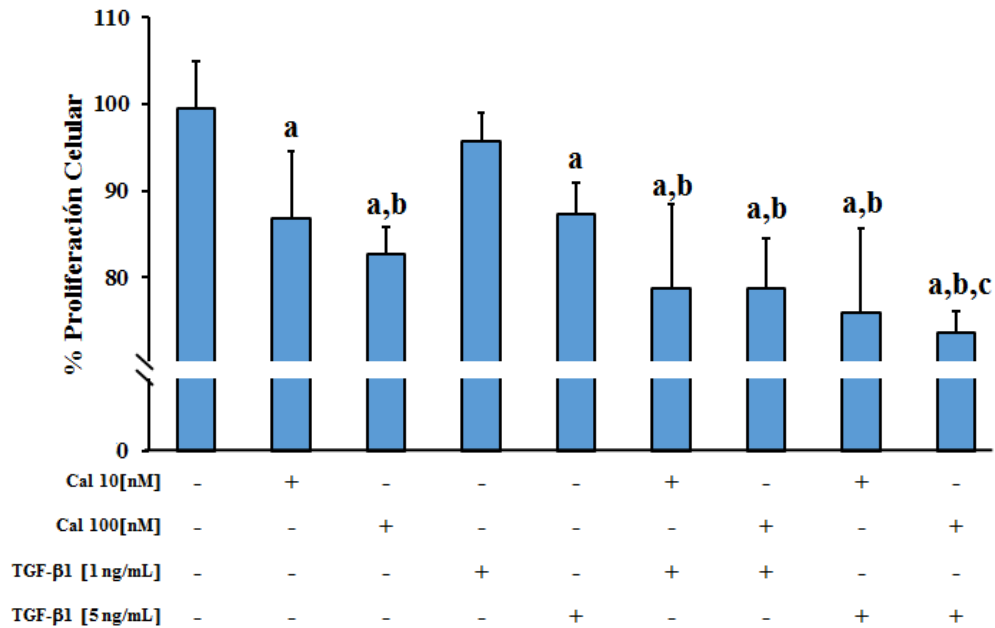


Figura 11. Efecto del calcitriol y del TGF-β1 solos y en combinación sobre la proliferación celular. Las células DU-145 fueron incubadas con calcitriol (10 y 100 nM) y TGF-β1 (1 y 5 ng/mL) solos o en combinación durante 4 días de tratamiento. n=4 con sextuplicado \pm DE ^ap < 0.05 vs control, ^bp < 0.05 vs TGF-β1 [1 ng/mL], ^cp < 0.05 vs TGF-β1 [5 ng/mL].

10.5 Efecto de la hCG sobre la proliferación celular en ausencia y presencia del calcitriol y del TGF-β1

Adicionalmente, se evaluó el efecto de la hCG recombinante sobre la proliferación celular de las células DU-145. Como se muestra en la figura 12, la hCG mostró una disminución significativa de la proliferación con respecto al control, la cual fue del 14%. Aunque la combinación de la hCG con calcitriol o el TGF-β1 inhibió más la proliferación, esta disminución no fue significativa al solo efecto de la hCG. Sin embargo, cabe resaltar que la triple co-incubación de los tratamientos resultó en una significativa disminución de la proliferación comparada con el efecto de la hCG.

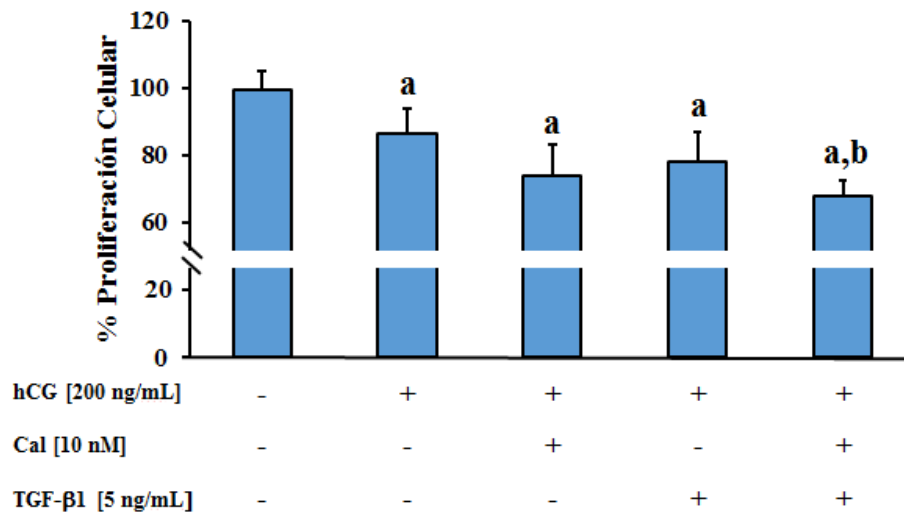


Figura 12. Efecto de la hCG en ausencia y presencia de calcitriol, TGF-β1 y la combinación de los tres compuestos. n=4 ± DE ^ap < 0.05 vs control, ^bp < 0.05 vs hCG.

11 Discusión

En este estudio, se evaluó en la línea celular de cáncer de próstata humano DU-145, el efecto del calcitriol y del TGF- β 1 sobre la expresión génica y la síntesis de la hCG β , una glicoproteína considerada un marcador tumoral en ciertos tipos de neoplasias [42]. Los tres compuestos mencionados pueden ser producidos de manera adecuada y regulada por el cuerpo, dependiendo del estado nutricional de la persona, su estilo de vida, respuesta celular y en gran parte a la demanda o a la necesidad del organismo. Sin embargo, tanto la deficiencia como la exacerbada producción de estos compuestos han sido asociadas con diferentes patologías, entre ellas el cáncer de próstata.

Previamente fue demostrado en células de trofoblasto humano en cultivo que el calcitriol tiene un efecto bifásico dependiente del tiempo para regular la síntesis de la hCG β , es decir, a tiempos cortos el calcitriol induce la síntesis de la hCG mientras que en tiempos prolongados el efecto es inhibitorio [49]. De lo anterior, era posible esperar un efecto biológico del secoesteroide sobre la producción de la hCG en otros tipos celulares incluyendo la línea celular DU-145. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo, mostraron que tanto la expresión génica y la secreción basal de la hCG β no fue afectada significativamente por el calcitriol, lo cual sugiere que el efecto del calcitriol depende del tipo celular.

Por otra parte, fue reportado en líneas celulares de glioma (A172 y U87MG) que la síntesis de la hCG β es estimulada por el TGF- β [50]. Lo cual coincide con el estímulo de la expresión génica y proteica de la hCG β observado en este estudio. Con estos resultados, demostramos por primera vez que el TGF- β 1 es un regulador positivo de la expresión de la hCG β en esta línea celular. Aunque no se evaluó el mecanismo exacto por el cual se lleva a

cabo este efecto, los datos sugieren que el gen que codifica para la subunidad β de la hCG podría contener elementos de respuesta al TGF- β 1, por lo tanto, un estudio de análisis *in silico* sería recomendado para determinar la posible interacción de las proteínas activadas por el TGF- β sobre este tipo de secuencias, las cuales estarían potencialmente mediando el estímulo observado. En caso de corroborar lo anterior, también valdría la pena evaluar el efecto en líneas celulares con fenotipo diferente al de las DU-145.

Este hallazgo nos permite proponer que en un micro ambiente con exacerbadas concentraciones del TGF- β 1 y con deficiencia de calcitriol, como ha sido reportado en el cáncer de próstata [51-53], que la síntesis incrementada de la glicoproteína es una consecuencia más que una causa en este tipo de patologías, sin embargo, esto implicaría posibles efectos de la hCG sobre eventos de crecimiento, migración e invasión, ya que se ha descrito la capacidad de la glicoproteína para mediar estos procesos, en particular afectando la migración por aumentar la expresión de la MMP-2 en este tipo celular [45].

Por lo anterior, nos resultó interesante indagar si el calcitriol afectaba la síntesis de la hCG inducida por el TGF- β 1 en esquema de combinación. De manera interesante, los resultados mostraron que el estímulo del TGF- β 1 sobre la hCG β fue inhibido cuando las células se co-incubaron con el calcitriol. Considerando que el calcitriol *per se* no afecta la expresión génica ni proteica basal de la hCG β pero si inhibe el estímulo promovido por el TGF- β 1, se sugiere que esta hormona es un regulador directo de los efectos ejercidos por el TGF- β , interfiriendo así, en la síntesis de diferentes blancos moleculares modulados por esta citocina como es el caso de las MMPs [48].

En cuanto al efecto del calcitriol y del TGF- β sobre la expresión génica del receptor LHCGR, los resultados mostraron que la expresión basal de este receptor en esta línea celular es muy baja y no fue modulada significativamente en ningún esquema de tratamiento. Lo anterior, descarta que el calcitriol y el TGF- β sean mediadores de este receptor en este tipo celular. La baja expresión del LHCGR y la nula regulación por estos tratamientos indican que la hCG β podría mediar sus efectos biológicos a través de su receptor encontrado en condiciones basales o utilizar rutas alternas de señalización como previamente ha sido documentado [50].

Si bien, en este estudio no se determinó el mecanismo por el cual el calcitriol modula el efecto estimulador del TGF- β , las posibilidades son múltiples, ya sea por una vía genómica, debido a que se ha demostrado la presencia del VDR en este tipo de células [28], o por una vía no genómica afectando diferentes vías de señalización sin involucrar al VDR [27]. Asimismo, no se descarta que los tratamientos combinados podrían interactuar entre sí en una ruta común para regular blancos específicos. En efecto, existen estudios que han demostrado que proteínas de la vía de señalización del TGF- β como la proteína SMAD3 puede interactuar con el VDR y este complejo activado por sus ligandos, modula sinérgica o antagónicamente la expresión de genes específicos [54], como lo es probablemente la expresión de la hCG, lo cual afectaría directamente la síntesis proteica observada en la secreción. Si un tipo de regulación similar ésta involucrada en esta línea celular, aún no se ha documentado y sería interesante como estudio adicional investigar a fondo el modo de regulación observado en este trabajo.

Por otra parte, se ha descrito el efecto inhibitorio del calcitriol sobre la proliferación de las líneas celulares de cáncer de próstata *in vitro* [48]. Entre los múltiples mecanismos descritos, se demostró en la línea celular de cáncer de próstata PC-3, que la inhibición inducida por el calcitriol era debida en parte, al estimular la síntesis del TGF- β . Lo cual contrasta con el efecto dual que se le ha atribuido a esta citocina en otros tipos de cáncer. No obstante, el efecto inhibidor del TGF- β sobre la proliferación ha sido sustentado por otros grupos usando líneas celulares con fenotipo CRPC [29, 56-59].

En cuanto a la hCG, nos es importante mencionar que se ha demostrado su efecto benéfico en el tratamiento del cáncer de mama, usando las líneas celulares MCF-10 y MCF-7 [59,60]. En estas células, la hCG inhibe el crecimiento, reduce la proliferación, prolonga la fase G1 del ciclo celular e induce la síntesis de inhibina alfa y beta [61,62]. Además, se ha descrito que la hCG incrementa la tasa de muerte celular al aumentar la radiosensibilidad de las células de cáncer de mama MCF-7 y particularmente de próstata (LNCap y PC-3) en cultivo [45, 63].

Considerando estos antecedentes, en nuestro trabajo también incluimos el potencial efecto que tienen estas moléculas (calcitriol, TGF- β 1 y hCG) solas o en combinación sobre la proliferación celular de la línea celular DU-145.

En este sentido, los resultados bajo nuestras condiciones experimentales, corroboraron datos previos del efecto inhibitorio del calcitriol y del TGF- β 1 sobre la proliferación de este tipo celular, así como coincide con el efecto mostrado previamente en nuestro laboratorio sobre el crecimiento celular, el cual fue evaluado por un método de cuantificación diferente [48].

De manera interesante, también observamos que la hCG β inhibió la proliferación de las células DU-145. Adicionalmente, se encontró que en esquema de combinación entre los 3 compuestos la inhibición fue mayor, lo cual muestra que el efecto combinado es más eficaz para sensibilizar e inhibir el crecimiento celular comparado con el control y con cada uno de ellos por separado. Lo cual concuerda con el trabajo de Yacoub et al., en 2006, quienes mostraron mayor muerte celular cuando las células son tratadas con hCG y expuestas a radioterapia de manera simultánea [46]. Aunque se desconoce si actúan por vías de señalizaciones mutuas o independientes, estos resultados muestran que el calcitriol, el TGF- β 1 y la hCG inhiben el crecimiento de las células de cáncer de próstata DU-145 y que sus efectos son regulados entre ellos para inhibir aún más la proliferación.

En conjunto los resultados del presente estudio nos permiten hacer las siguientes observaciones:

- 1) Que la hCG podría ser más que un marcador tumoral adverso en el cáncer de próstata humano, un inhibidor natural que es requerido como un factor que se induce en respuesta a varios factores, tal vez, para compensar o contribuir en el efecto antineoplásico junto con otras moléculas como el TGF- β 1. No obstante, su síntesis debe ser regulada por otras moléculas como el calcitriol.
- 2) Que en un ambiente tumoral, la regulación entre estos compuestos podrían mediar el crecimiento celular y la invasión de este tipo de cáncer.

3) Que la deficiencia de vitamina D en pacientes con cáncer de próstata podría ser un componente involucrado en su progresión y que la suplementación con vitamina D sería recomendable para obtener concentraciones óptimas de calcitriol y así prevenir o aminorar el progreso de la enfermedad al controlar los efectos tanto del TGF- β 1 como de la hCG.

12 Conclusiones

1. El TGF- β 1 aumenta significativamente la expresión génica y proteica de la hCG β en células DU-145.
2. El calcitriol no tiene efecto sobre la expresión basal de la hCG β .
3. El calcitriol regula la expresión génica y proteica de la hCG β inducida por el TGF- β 1.
4. La expresión génica de *LHCGR* es muy baja y no es regulada por el calcitriol ni por el TGF- β .
5. El calcitriol, el TGF- β 1 y la hCG β inhiben significativamente la proliferación de las células de cáncer de próstata DU-145.
6. En esquema de triple combinación, se inhibe más la proliferación celular de las células de cáncer de próstata DU-145, que solo con la hCG combinada con alguno de los otros tratamientos.

13 Perspectivas

Los presentes hallazgos han mostrado que el calcitriol regula la síntesis de la hCG β estimulada por el TGF- β 1 así como se demostró que los tres compuestos inhiben la proliferación celular solos o en combinación. Por lo tanto, sería necesario investigar los siguientes puntos:

Determinar si en los efectos observados está implicado el mecanismo de acción de la hCG vía AMPc.

Evaluar el potencial efecto de la hCG sobre la expresión génica y/o proteica de blancos moleculares implicados en la proliferación y/o muerte celular.

Estudiar si la hCG afecta otros eventos celulares como la migración e invasión celular en esquemas de combinación.

Investigar si las vías de señalización del calcitriol y del TGF- β 1 entrecruzan y si son afectadas por la presencia de la hCG.

Bibliografía

- 1.- Institute, N.C. (2015). What Is Cancer?. Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> [Consulta 25 septiembre 2018].
- 2.- American Cancer Society. (2018). ¿Cuáles son las causas del cáncer de próstata?. Disponible en: www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-prostata/causas-riesgos-prevencion/que-lo-causa.html [Consulta 12 diciembre 2018].
- 3.- WHO. (2017). Cancer. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> [Consulta 25 septiembre 2018].
- 4.- GLOBOCAN. (2018). Estimated age-standardized incidence rates (world) in 2018, all cancer, males, all ages. Disponible en: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=1&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&rotate=%255B10%252C0%255D [Consulta 17 mayo 2019].
- 5.- UICC. (2018). New Global Cancer. Disponible en: <https://www.uicc.org/new-global-cancer-data-globocan-2018> [Consulta 25 septiembre 2018].
- 6.- American Cancer Society. (2018). ¿Qué es el cáncer de próstata?. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-prostata/acerca/que-es-cancer-de-prostata.html> [Consulta 10 diciembre 2018].
- 7.- Rojas S., y Villegas M. (2006). Cáncer de Próstata. *Revista Científica Médica*, 9(1), 42-43.
- 8.- American Cancer Society. (2016). Signos y síntomas del cáncer de próstata. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-prostata/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/senales-sintomas.html> [Consulta 06 de diciembre 2018].
- 9.- Sharifi N. (2013). Mechanisms of androgen receptor activation in castration-resistant prostate cancer. *Endocrinology*, 154(11), 4010-4017.
- 10.- Suzuki H., Ueda T., Ichikawa T., y Ito H. (2003). Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 10(2), 209-216.
- 11.- Eisermann K., y Fraizer G. (2017). The Androgen Receptor and VEGF: Mechanisms of Androgen-Regulated Angiogenesis in Prostate Cancer. *Cancers*, 9(4), 1-10.

- 12.- Mark S., Litwin M., y Hung-Jui T. (2017). The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *Journal of the American Medical Association*, 317(24), 2532-2542.
- 13.- Instituto Nacional del Cáncer. (2017). Tratamientos del cáncer. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos> [Consulta 28 septiembre 2018].
- 14.- Antonarakis E.S. (2011). Management of metastatic castration-resistant prostate cancer. *European Urological Review*, 6(2), 90-96.
- 15.- Nishiyama T. (2014). Serum testosterone levels after medical or surgical androgen deprivation: A comprehensive review of the literature. *Urologic Oncology*, 32(1), 38.e17-38.e28.
- 16.- Shih J., Wang L., Hung C., Kung H., y Hsieh C. (2015). Non-Coding RNAs in castration-resistant prostate Cancer: Regulation of Androgen Receptor Signaling and Cancer Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 28943-28978.
- 17.- Tan E., Li J., Xu E., Melcher K., y Yong E. (2015). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(1), 13-23.
- 18.- Feldman D., Krishnan A.V., Swami S., Giovannucci E., y Feldman B. (2014). The role of vitamin D in reducing risk and progression. *Nature Reviews Cancer*, 14(5), 342-357.
- 19.- Christakos S., Dhawan P., Verstuyf A., Verlinden L., y Carmeliet G. (2015). Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiological reviews*, 96(1), 365-408.
- 20.- Holick M., Binkley N., Bischoff-Ferrari H., Gordon C., Hanley D., Haeney R.,...y Weaver C. (2011). Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology y Metabolism*, 96(7), 1911-1930.
- 21.- Norman A. (2008). From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *American Journal of Clinical Nutrition*, 88(2) 491S-499S.
- 22.- Holick M. (2009). Physiology, molecular biology, and clinical applications. Vitamin D and Health: evolution, biologic functions, and recommended dietary intakes for vitamin D. *Totowa: Humana Press Inc* 2(1), 3-35.
- 23.- Bikle, D. (2014). Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chemistry y biology*, 21(3), 319-329.

- 24.- Nemere I., Farach-Carson M., Rohe B., Sterling T., Norman A., Boyan B., y Safford S. (2003). Ribozyme knockdown functionally links a 1,25(OH)₂D₃ membrane binding protein (1,25D₃-MARRS) and phosphate uptake in intestinal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(19), 7392-7397.
- 25.- Huhtakangas A., Olivera J., Bishop E., Zanello P., y Norman A. (2004). The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 α , 25 (OH) 2-vitamin D₃ in vivo and in vitro. *Molecular Endocrinology*, 18(11), 2660-2671.
- 26.- Losel R., Falkenstein E., Feuring M., Schultz A., Tillmann C., Rossol-Haseroth K., y Wehling M. (2003). Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiological reviews*, 83(3), 965-1016.
- 27.- Hii C., y Ferrante A. (2016). The non-genomic actions of vitamin D. *Nutrients*, 8(3), 1-14.
- 28.- Ahn J., Park S., Zuniga B., Bera A., Song C., y Chatterjee B. (2016). Vitamin D in prostate Cancer. *Vitamin Hormone*, 100(1), 321-355.
- 29.- Murthy S. y Weigel N. (2004). 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ induced growth inhibition of PC-3 prostate cancer cells requires an active transforming growth factor beta signaling pathway. *The Prostate*, 59(3), 282-291.
- 30.- Macias M., Martin-Malpartida P., y Massagué J. (2015). Structural determinants of Smad function in TGF- β signaling. *Trends in biochemical sciences*, 40(6), 296-308.
- 31.- Akhurst J. y Derynck R. (2001). TGF- β signaling in cancer—a double-edged sword. *TRENDS in Cell Biology*, 11(11), 44-51.
- 32.- Wakefield M., y Roberts B. (2002). TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Current opinion in genetics y development*, 12(1), 22-29.
- 33.- Miyazono K. (2000). TGF- β signaling by Smad proteins. *Cytokine y growth factor reviews*, 11(1-2), 15-22.
- 34.- Shariat S., Walz J., Roehrborn C., Montorsi F., Jeldres C., Saad F., y Karakiewicz P. (2008). Early postoperative plasma transforming growth factor- β 1 is a strong predictor of biochemical progression after radical prostatectomy. *Journal of Urology*, 179(4), 1593-97.
- 35.- Shariat F., Shalev M., Menesses-Diaz A., Kim Y., Kattan M. W., Wheeler M., y Slawin M. (2001). Preoperative plasma levels of transforming growth factor beta1 (TGF- β 1) strongly predict progression in patients undergoing radical prostatectomy. *Journal of Clinical Oncology*, 19(11), 2856-2864.

- 36.- Millena A., BaoHan T., y Khan S. (2016). JunD is required for proliferation of prostate cancer cells and plays a role in transforming growth factor- β (TGF- β)-induced inhibition of cell proliferation. *Journal Biological Chemistry*, 291(34) 17964-17976.
- 37.- Hsing Y., Kadomatsu K., Bonham J., y Danielpour D. (1996). Regulation of apoptosis induced by transforming growth factor- β 1 in nontumorigenic and tumorigenic rat prostatic epithelial cell lines. *Cancer Research*, 56(22), 5146-5149.
- 38.- Bang J., Kim J., Danielpour D., O'Reilly A., Kim Y., Myers E., y Trepel B. (1992). Cyclic AMP induces transforming growth factor beta 2 gene expression and growth arrest in the human androgen-independent prostate carcinoma cell line PC-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(8), 3556-3560.
- 39.- Rowley R., Dang D., McBride L., Gerdes J., Lu B., y Larsen M. (1995). β -2 microglobulin is mitogenic to PC-3 prostatic carcinoma cells and antagonistic to transforming growth factor β 1 action. *Cancer Research*, 55(4), 781-786.
- 40.- Saavedra S., Filgueira E., Pessacq T., Schweizer R., Calcagno L., y Fenili A. (2004). Formas moleculares de gonadotropina coriónica humana (hCG). Impacto en su medición. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*, 41(1), 28-45.
- 41.- Barrera D., Chirinos M., y García-Becerra R. (2008). Mecanismos de regulación de la síntesis y secreción de la gonadotropina coriónica humana (hCG) durante el embarazo. *Revista de Investigación Clínica*, 60(2) 124-132.
- 42.- Cruz P., Villegas A., y Clavijo S. (2008). Fundamento biológico y aplicación clínica de los marcadores tumorales séricos. *Revista Ciencias de la Salud*, 6(2), 85-98.
- 43.- Velázquez N. (2014). La hormona gonadotropina coriónica humana: Una molécula ubicua y versátil. Parte I. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*, 74(2), 122-133.
- 44.- Salhab M., Sarakbi W., y Mokbel K. (2005). In vitro fertilization and breast cancer risk: a review. *International journal of fertility and women's medicine*, 50(6), 259-266.
- 45.- Zongwen L., Chunliu L., Lianlian D., Yan Z., y Wei W. (2013). Human Chorionic Gonadotropin β Induces Migration and Invasion via Activating ERK1/2 and MMP-2 in Human Prostate Cancer DU145 Cells. *Public Library of Science One*, 8(2), 1-8.
- 46.- Yacoub A., Hawkins W., Hanna D., Hong Y., Park M., Grant, M.,... y Grant S. (2006). Human chorionic gonadotropin (hCG) modulates prostate cancer cell survival after irradiation or HMG CoA reductase inhibitor treatment. *Molecular pharmacology*, 71(1), 259-275.

- 47.- Chomczynski P., y Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159.
- 48.- García M. (2018). Efecto del calcitriol y TGF- β sobre la síntesis de las metaloproteinasas -2 y -9 en la línea celular PC-3 (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, México.
- 49.- Barrera D., Avila E., Hernández G., Méndez I., González L., Halhali A., ... y Díaz L. (2008). Calcitriol affects hCG gene transcription in cultured human syncytiotrophoblasts. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 6(1), 1-8.
- 50.- Ahmad F., Ghosh S., Sinha S., Joshi D., Mehta S., y Sen E. (2015). TGF- β -induced hCG- β regulates redox homeostasis in glioma cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 399(1-2), 105-112.
- 51.- Torrealba N., Rodríguez-Berriguete G., Fraile B., Olmedilla G., Martínez-Onsurbe P., Guil-Cid M., ... y Royuela M. (2017). Expression of several cytokines in prostate cancer: correlation with clinical variables of patients. Relationship with biochemical progression of the malignance. *Cytokine*, 89, 105-115.
- 52.- Danielpour D. (2005). Functions and regulation of transforming growth factor-beta (TGF- β) in the prostate. *European journal of cancer*, 41(6), 846-857.
- 53.- Xie D., Chen H., Xu S., Zhang C., Wang M., Wang H., ... y Yu X. (2017). Low vitamin D status is associated with inflammation in patients with prostate cancer. *Oncotarget*, 8(13), 22076-22085.
- 54.- Yanagisawa J., Yanagi Y., Masuhiro Y., Suzawa M., Watanabe M., Kashiwagi K., Toriyabe T., Kawabata M., Miyazono K., y Kato S. (1999). Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. *Science*, 283(5406), 1317-1321.
- 55.- Miles FL., Tung N., Aguiar A., Kurtoglu S., y Sikes R. (2015). Increased TGF-beta1-mediated suppression of growth and motility in castrate-resistant prostate cancer cells is consistent with Smad2/3 signaling. *Prostate*, 72(12):1339-1350.
- 56.- Konrad L., Scheiber J., Schwarz L., Schrader A., y Hofmann R. (2009). 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. *Regulatory Peptides*, 155(1-3):28-32.

- 57.- Desruisseau S., Ghazarossian-Ragni E., Chinot O., y Martin P. (1996). Divergent effect of TGFbeta1 on growth and proteolytic modulation of human prostatic-cancer cell lines. *International Journal of Cancer*, 66(6):796-801.
- 58.- Blutt S., Polek T., Stewart L., Kattan M., y Weigel N. (2000). A calcitriol analogue, EB1089, inhibits the growth of LNCaP tumors in nude mice. *Cancer Research*, 60(4):779-782.
- 59.- Alvarado M., Alvarado N., Russo J., y Russo, I. (1994). Human chorionic gonadotropin inhibits proliferation and induces expression of inhibin in human breast epithelial cells in vitro. *In Vitro Cellular y Developmental Biology-Animal*, 30(1), 4-8.
- 60.- Janssens J., Russo J., Russo I., Michiels L., Donders G., Verjans M., ... y Sieprath P. (2007). Human chorionic gonadotropin (hCG) and prevention of breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 269(1-2), 93-98.
- 61.- Matzuk M., Finegold J., Su J., Hsueh J., y Bradley A. (1992). α -Inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature*, 360(6402), 313-319.
- 62.- Lojun S., Bao S., Lei M., y Rao V. (1997). Presence of functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin (hCG) receptors in human breast cell lines: implications supporting the premise that hCG protects women against breast cancer. *Biology of reproduction*, 57(5), 1202-1210.
- 63.- Pond-Tor S., Rhodes G., Dahlberg E., Leith T., McMichael J., y Dahlberg E. (2002). Enhancement of radiosensitivity of the MCF-7 breast cancer cell line with human chorionic gonadotropin. *Breast cancer research and treatment*, 72(1), 45-51.