



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE COMPONENTES DE
LA VIA DE SEÑALIZACIÓN HEDGEHOG POR EL CALCITRIOL EN
CÉLULAS DE CÁNCER CERVICAL**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

BRYAN JAVIER NORIEGA MEJÍA



CDMX

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: CASTELLANOS ROMÁN LUZ DEL CARMEN

VOCAL: Profesor: AVILA CHÁVEZ EUCLIDES

SECRETARIO: Profesor: CUEVAS VELÁZQUEZ CÉSAR LUIS

1er. SUPLENTE: Profesor: AXOSCO MARIN JAVIER

2do. SUPLENTE: Profesora: GARCÍA VELÁZQUEZ LIZBETH ESMERALDA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DR. CARLOS GUAL CASTRO, INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN, CDMX.

ASESOR DEL TEMA:

DR. EUCLIDES AVILA CHÁVEZ

SUSTENTANTE:

BRYAN JAVIER NORIEGA MEJÍA

Abreviaturas

cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
DHH	Desert Hedgehog
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos
GLI1/2/3	Familia de factores de transcripción asociados a gliomas
Hh	Hedgehog
HPV	Virus del Papiloma Humano
HSIL	Lesión intraepitelial de alto grado
IHH	Indian Hedgehog
KIF7	Proteína 7 de la familia de cinesinas
LSIL	Lesión intraepitelial de bajo grado
pRb	Retinoblastoma
PTCH1	Patched 1
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
RXR	Receptor X de retinoides
SFBI	Suero fetal bovino descomplementado
SHH	Sonic Hedgehog

SMO	Smoothened
SUFU	Proteína supresora de homólogo fusionado
UVB	Luz ultravioleta B
VDR	Receptor de la vitamina D
VDRE	Elemento de respuesta a la vitamina D

Índice	
Resumen	9
1. Introducción	10
1.1 El cáncer cervicouterino	10
1.2 La vía Hedgehog	14
1.3 La vía Hedgehog y el cáncer	17
1.4 La vía Hedgehog y el cáncer cervicouterino	18
1.5 La vitamina D	18
1.6 Mecanismos de acción del calcitriol mediados por el receptor de la vitamina D	20
1.7 Acciones antitumorales del calcitriol	24
1.8 El calcitriol y el cáncer cervicouterino	24
2. Planteamiento del problema	25
3. Hipótesis	26
4. Objetivo general	26
5. Objetivos específicos	26
6. Metodología	27

6.1 Material biológico	27
6.2 Cultivo celular	27
6.3 Análisis de la expresión génica	27
6.3.1 Purificación de RNA total	28
6.3.2 Síntesis de DNA complementario (cDNA)	28
6.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	29
6.4. Análisis estadístico	31
7. Resultados	32
7.1 El calcitriol promueve la acumulación significativa del RNAm del gen CYP24A1 en las células CaSki	32
7.2 Efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de los ligandos de la vía Hh en las células CaSki	32
7.3 Efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de la vía Hh en las células CaSki	33
7.4 El calcitriol promueve la acumulación significativa del RNAm del gen CYP24A1 en las células SiHa	33
7.5 Efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de los ligandos de la vía Hh en las células SiHa	35
7.6 Efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de la vía Hh en las células SiHa	35
7.7 El calcitriol promueve la acumulación significativa del RNAm del gen CYP24A1 en las células HeLa	36

7.8 Efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de los ligandos de la vía Hh en las células HeLa	36
7.9 Efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de la vía Hh en las células HeLa	38
8. Discusión	40
9. Conclusiones	44
10. Bibliografía	45

Resumen

El cáncer cervical es la cuarta neoplasia con mayor incidencia y mortalidad en mujeres en todo el mundo. En México, esta neoplasia es la segunda con mayor incidencia y mortalidad. Este tipo de cáncer de lenta progresión es causado principalmente por la infección crónica por el virus del papiloma humano, sin embargo, otros factores también participan en el desarrollo de este tumor. Al respecto, la vía de señalización Hedgehog de fundamental importancia en la vía embrionaria, se encuentra muy activa en diversos tipos de cáncer, entre ellos el cervicouterino. Esta vía consta de tres ligandos (Desert, DHH; Indian, IHH; y Sonic, SHH), dos receptores de membrana (Patch1, PTCH1 y Smoothed, SMO), la proteína 7 de la familia de cinesinas (KIF7), el supresor del homólogo fusionado (SUFU) y 3 factores de transcripción (GLI1, GLI2 y GLI3). Otro factor de riesgo para la aparición de tumores malignos es la deficiencia de la vitamina D. La vitamina D es precursora del calcitriol, una hormona que posee una amplia gama de acciones antitumorales. Se conocen pocos mecanismos por los cuales el calcitriol previene el desarrollo del cáncer cervicouterino. En este trabajo investigamos si el calcitriol puede disminuir la expresión génica de los componentes individuales de la vía Hedgehog en las células CaSki, SiHa y HeLa de cáncer cervical. Los tres tipos celulares fueron tratados en ausencia o en presencia de calcitriol 1×10^{-7} M durante 24 h y la expresión de los genes fue estudiada por PCR en tiempo real. Los resultados mostraron que todos los RNAm de los componentes de la vía Hedgehog se expresan en las tres líneas celulares estudiadas. También observamos que el calcitriol disminuyó la acumulación de los transcritos de los genes KIF7 y GLI3 en las células CaSki y de los genes IHH y GLI2 en las células SiHa. En las células HeLa, no detectamos cambios en la acumulación de los RNAm de componentes de la vía Hedgehog debidos al calcitriol. Los resultados obtenidos sugieren que el calcitriol modula negativamente la vía oncogénica Hedgehog en el cáncer cervicouterino, una neoplasia más prevalente en mujeres que cursan con deficiencia de vitamina D.

1. Introducción

1.1 El cáncer cervicouterino

El cérvix es la parte del aparato reproductor femenino que conecta la porción inferior del útero y la parte superior de la vagina de la mujer (figura 1A). El cérvix se compone de dos tipos de células, que son las células escamosas y las células columnares, siendo las primeras las que se encuentran en la parte más exterior. El canal cervical es el conducto por el cual pasan los espermatozoides hacia el útero. En sentido contrario, por el conducto cervical fluye la sangre durante el periodo menstrual y también pasa el feto desde el útero hacia la vagina durante el nacimiento. El cáncer cervicouterino también se conoce como cáncer cervical o cáncer de cuello uterino (figura 1B).

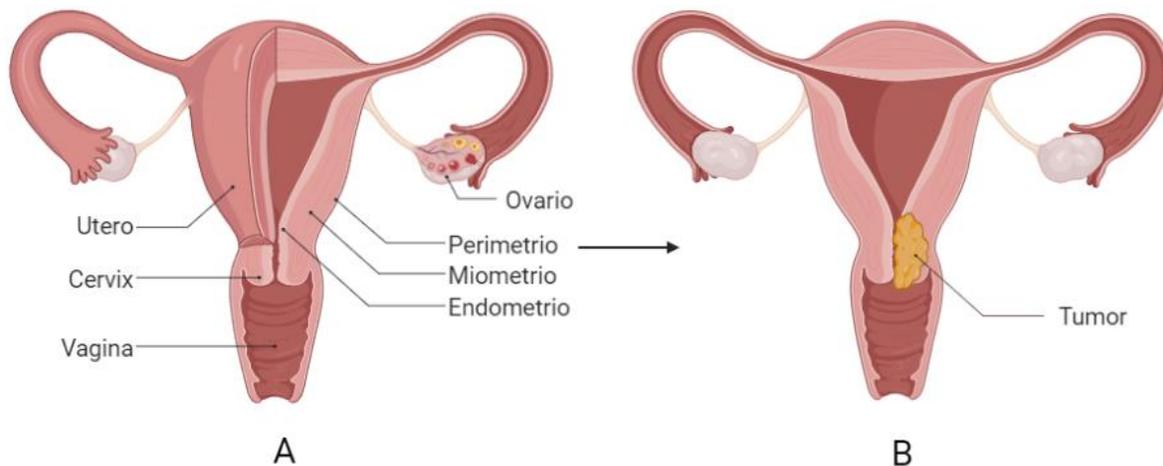


Figura 1. Representación de los principales órganos del aparato reproductor femenino (A) y diagrama del cáncer cervicouterino (B). Representación gráfica del aparato reproductor femenino normal (A). En (B) se muestra la localización de un tumor en el cérvix.

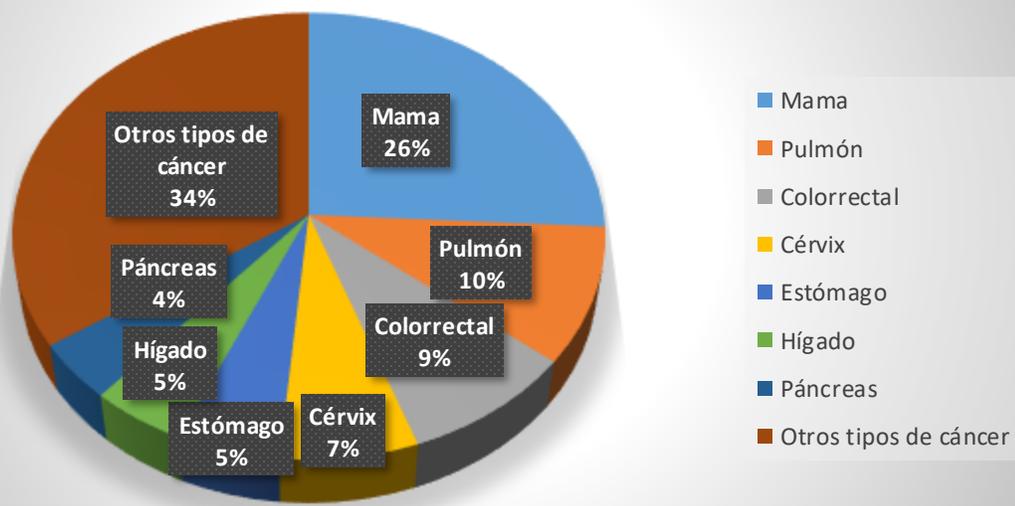
En los reportes mundiales de 2020, el cáncer cervicouterino es el cuarto tipo de cáncer con mayor incidencia y mortalidad en la población femenina de 15 a 44 años de edad a nivel mundial, por detrás de los tumores malignos de mama, pulmón y colorrectales (figuras 2A y B). Se estima que en países en desarrollo como lo es México, el cáncer cervical puede llegar a ser el segundo cáncer más común y mortal.

En el 2020 se estimaron alrededor de 600,000 casos nuevos y más de 300,000 muertes provocadas por el cáncer cervicouterino alrededor del mundo (1).

El desarrollo del cáncer cervicouterino muestra una estrecha dependencia con la infección crónica de las células basales cervicales por los virus del papiloma humano (HPVs). Adicionalmente a su papel causal en el cáncer cervicouterino, los HPVs participan en la progresión de otros tumores en área anogenital en hombres y mujeres, así como en tumores orofaríngeos (2). En conjunto, se considera que los HPVs son causantes del 5% de todos los casos de cáncer a nivel mundial.

La infección por los HPVs se produce por contacto sexual a edad temprana y ocurren reinfecciones que dependen del número de parejas sexuales. Los virus involucrados en el desarrollo del cáncer cervicouterino se denominan de alto riesgo y corresponden a los subtipos 16, 18, 31, 32, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59. De los HPVs mencionados anteriormente, los HPVs 16 y 18 son los responsables de al menos el 70% de todos los casos de cáncer cervicouterino. El éxito de la infección crónica del epitelio cervical radica en la expresión continua de dos proteínas oncogénicas de expresión temprana en el ciclo de vida de los HPVs. Esas proteínas son E6 y E7, cuyas actividades son responsables del crecimiento descontrolado de las células infectadas mediante la inactivación de los supresores tumorales P53 y retinoblastoma que utiliza una célula normal para la reparación del DNA dañado, activar la apoptosis y bloquear la proliferación celular (3, 4). Es importante destacar que la mayoría de las infecciones por HPVs son eliminadas por el sistema inmunitario. Sin embargo, en una pequeña fracción de los casos, se presenta infección crónica por HPVs que puede durar 10 años o más, tiempo en el cual ocurre la transformación del cérvix, llamada displasia cervical. Los tipos de displasias cervicales son: la displasia moderada, conocida también como lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL) y las displasias severas, conocidas como lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL). Las lesiones LSIL y HSIL tienen el potencial para generar tumores pero aún son lesiones benignas que no provocan síntomas para la mujer.

(A) Estimación de casos nuevos de cáncer en mujeres en todas las edades alrededor del mundo (2020)



(B) Estimación de muertes en mujeres en todas las edades alrededor del mundo (2020)

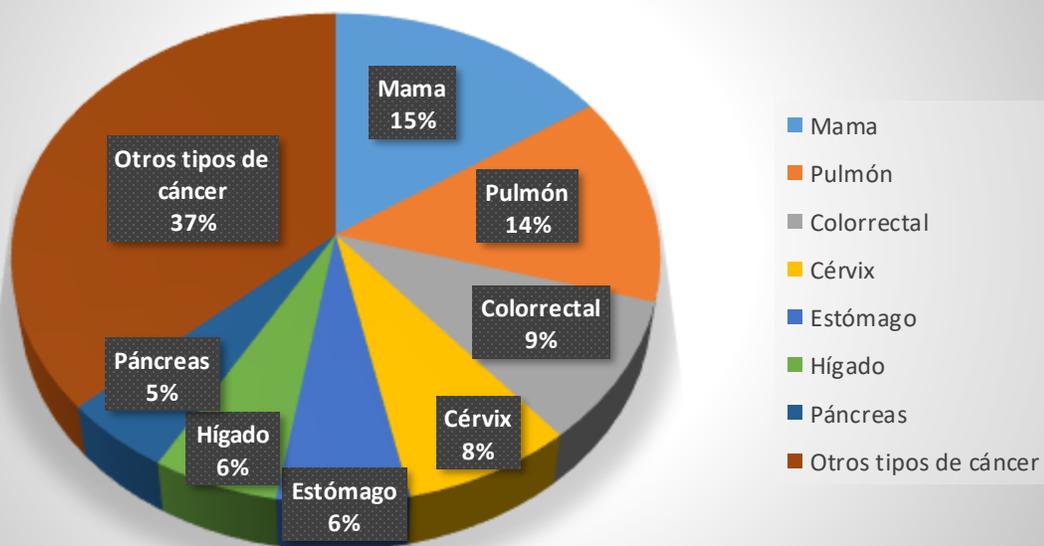


Figura 2. Epidemiología del cáncer en mujeres. Número estimado de casos nuevos (A) y de muertes (B) por diferentes tipos de cáncer alrededor del mundo en todas las edades en la población femenina en el 2020 (1).

Una vez establecido el cáncer cervicouterino, el diagnóstico generalmente ocurre tardíamente cuando las mujeres presentan sangrado y flujos vaginales anormales. Con fines terapéuticos y de estandarización mundial, la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia ha clasificado al cáncer cervicouterino de la siguiente manera (5):

Estadio 0. Abarca carcinomas *in situ*, donde las células tumorales se encuentran en la superficie del cérvix.

Estadio I. Son carcinomas invasivos del cérvix cuya localización está estrictamente confinada al cérvix.

Estadio II. Comprende tumores que han invadido más allá del útero pero que aún no se han extendido al piso pélvico o al tercio superior de la vagina.

Estadio III. En esta categoría los tumores han invadido el piso pélvico, el tercio superior de la vagina y se haya comprometida la función renal por invasión de los uréteres.

Estadio IV. Es la fase de invasión de las células tumorales a órganos vecinos y distantes. El cáncer cervicouterino puede generar metástasis por medio de vasos linfáticos hacia el área pélvica, mediastínica, supraclavicular y hasta los ganglios linfáticos, así como también hacia otros órganos como lo son los pulmones, el hígado, los huesos y el cerebro.

El tratamiento del cáncer cervicouterino depende del diagnóstico histopatológico, la extensión del mismo, la edad y hasta del deseo de tener hijos a futuro puesto que este cáncer se presenta frecuentemente en mujeres en edad reproductiva. Los tratamientos pueden incluir la histerectomía radical, la radioterapia, la quimioterapia o sus combinaciones (6). La quimioterapia basada en compuestos de platino combinada con bevacizumab es el tratamiento para la metástasis, recurrencia o cuando la enfermedad es persistente (5).

El cáncer cervicouterino depende en gran medida de la infección por los HPV, sin embargo, otros factores de riesgo contribuyen a la enfermedad como son una vida sexual temprana, tener múltiples parejas sexuales, estar inmunodeprimido,

antecedentes de infecciones de transmisión sexual, tener un alto número de hijos, uso prolongado de anticonceptivos orales y consumo de tabaco (6).

El cáncer cervicouterino puede ser prevenible con las vacunas contra los HPV de alto riesgo y puede ser detectado a tiempo con pruebas de Papanicolau o citología vaginal. Las principales vacunas para el HPV son:

-Cervarix, es bivalente contra los HPV 16 y 18.

-Gardasil, es cuadrivalente contra los HPV 6, 11, 16 y 18.

-Gardasil 9, que es nonavalente contra los HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58.

Las campañas de vacunación contra el HPV han mostrado gran éxito en la disminución de casos de cáncer cervicouterino y de lesiones genitales en ambos sexos; sin embargo, esto solamente ha ocurrido en países desarrollados que tienen acceso a las vacunas antes mencionadas. En el resto del mundo, el cáncer cervicouterino sigue siendo un gran problema de salud pública (7).

1.2 La vía Hedgehog

La vía Hedgehog (Hh) fue descubierta en 1980 al estudiar el fenotipo de mutaciones en los segmentos anteroposteriores de la mosca *Drosophila melanogaster* y se le dio este nombre debido a que la larva presentaba una formación en sus dentículos similar a un erizo (8).

La vía Hh está implicada en la diferenciación y en el desarrollo simétrico de las extremidades embrionarias. La vía Hh es particularmente importante durante la morfogénesis craneofacial. Esta vía de señalización también participa en la regulación y mantenimiento de algunas células madre y tejidos en adultos, así también de la regulación de la homeostasis e inflamación de tejidos (9).

Se considera que la vía Hh normalmente se encuentra inactiva en la vida adulta. Algunos casos en que la vía Hh se activa transitoriamente es cuando se requiere un mantenimiento de células madres somáticas pluripotentes importantes en la

reparación de tejidos y durante el desarrollo de nuevos folículos pilosos, ya que todos los componentes de la vía se encuentran en el cilio de la célula (10).

La vía Hh consta de tres ligandos Hedgehog: Desert Hedgehog (DHH), Indian Hedgehog (IHH) y Sonic Hedgehog (SHH). Adicionalmente, la vía Hh tiene a los siguientes componentes: proteína homóloga de Patched 1 de *Drosophila* (PTCH1), el receptor Smoothed de la clase Frizzled (SMO), Supresor del homólogo fusionado de *Drosophila* (SUFU), proteína 7 de la familia de las cinesinas (KIF7) y los tres miembros con dedos de zinc de la familia de oncogenes asociados a gliomas (GLI1, GLI2 y GLI3, en conjunto GLI).

Cuando la vía Hh se encuentra inactiva, no existe ninguno de los ligandos extracelulares DHH; IHH o SHH y el receptor membranar PTCH1 mantiene inactivo a SMO a nivel de la membrana plasmática. Esto permite que SUFU mantenga secuestrados en el citoplasma a los factores de transcripción GLI, los cuales se ven impedidos de acceder a sus regiones blanco en el DNA.

La vía de señalización Hh se activa cuando cualquiera de los tres ligandos extracelulares DHH, IHH o SHH interactúa con el receptor de membrana PTCH1 (figura 3). Esta interacción sobre la membrana plasmática elimina la inhibición que tenía PTCH1 sobre SMO y permite que SUFU libere a los factores GLI, los cuales viajan al núcleo de la célula para activar la transcripción de genes (11). La translocación de los factores GLI al núcleo afecta principalmente en la progresión del ciclo celular, la transición epitelio-mesénquima, la producción de proteínas que inhiben la apoptosis y la generación de factores de crecimiento endotelial vascular. Cuando la vía es regulada por los factores de transcripción GLI es denominada como la vía de señalización Hh canónica, sin embargo, cuando la vía es independiente de los factores de transcripción GLI se considera que la vía de señalización Hh es no canónica y sigue otro tipo de mecanismo diferente al mencionado anteriormente (12).

Una mala señalización de la vía Hh no solo causa defectos en el desarrollo del organismo, sino que induce la formación, crecimiento, invasión y metástasis de

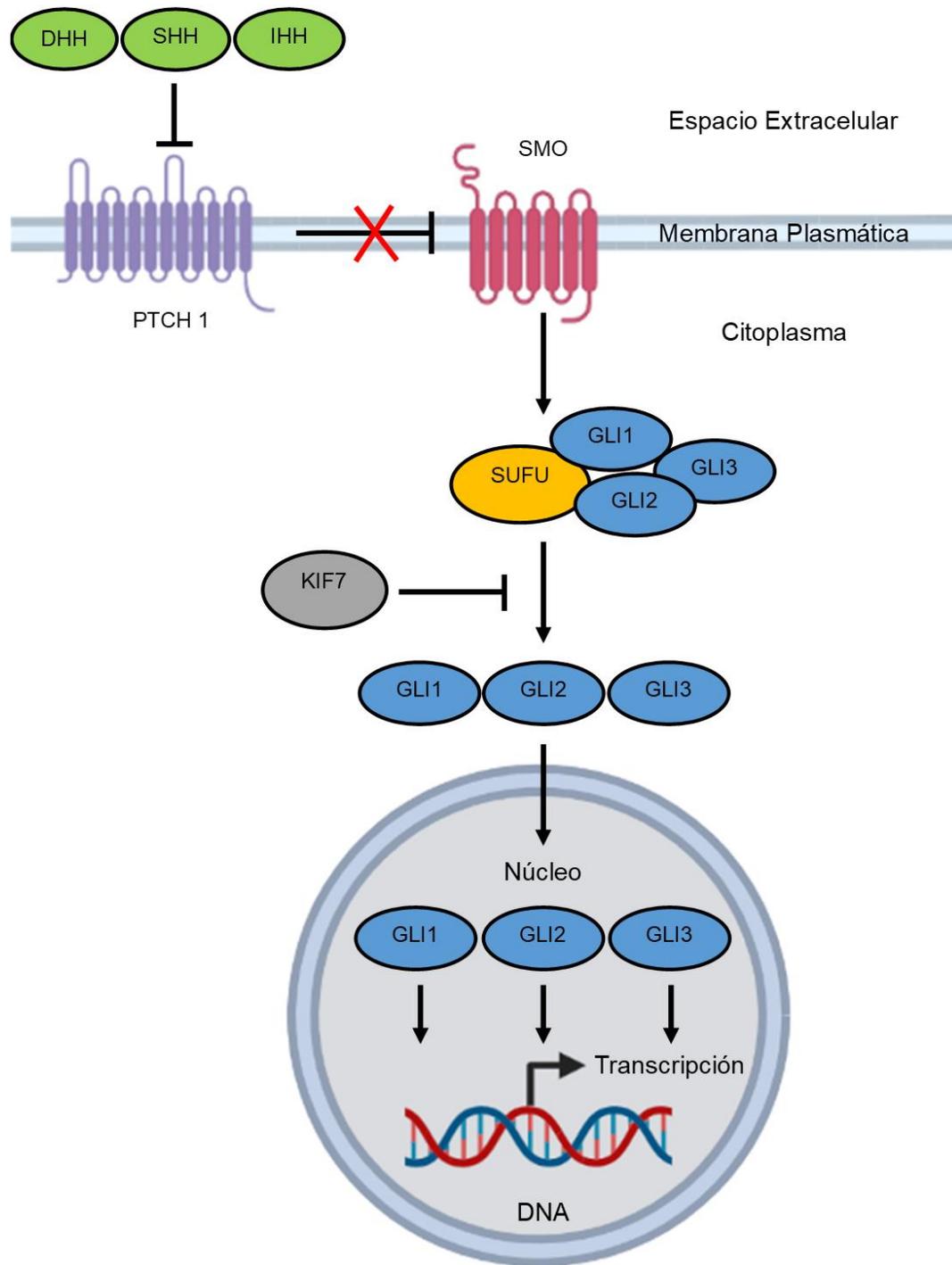


Figura 3. La vía de señalización Hedgehog (Hh) canónica. La vía Hh se encuentra apagada en ausencia de los ligandos extracelulares y ello hace que los factores transcripcionales GLI se queden en el citoplasma. La presencia de algún ligando de la vía Hh (DHH, SHH e IHH) reprime al receptor PTCH1, activando a SMO, a SUFU y a KIF7, lo cual conduce a la liberación y translocación de los factores GLI al núcleo para modificar la transcripción de genes regulados por esta vía (Elaborado en Publisher con ayuda de Biorender).

tumores, así también se ve involucrada en la resistencia a la radioterapia y a la quimioterapia (13).

1.3 La vía Hedgehog y el cáncer

Se ha demostrado que mutaciones en SMO, PTCH1 o SUFU activan la vía Hh en ausencia de ligandos, la cual promueve la formación y el progreso del carcinoma de células basales nevoide, sarcomas relacionados con el tejido blando (fibrosarcomas y rhabdomyosarcoma), tumores en el útero (fibromas), cáncer cerebral (meduloblastoma), cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de próstata y de mama (14). Por otro lado, los ligandos Hh pueden ser producidos por células vecinas y activar también a la vía Hh, fomentando la aparición de cáncer.

Dada su naturaleza procarcinogénica, la vía Hh es blanco de terapias para el cáncer. Hasta la fecha, la FDA ha aprobado 3 compuestos que inhiben la vía Hh para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Dos de ellos (sonidegib y vismodegib) son inhibidores de SMO y están aprobados para su uso en el tratamiento de células basales, aunque también son efectivos contra otros tumores. El tercer fármaco aprobado por la FDA es el trióxido de arsénico que inhibe la acción de los GLI y está indicado para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (15). Sin embargo, otros compuestos son eficaces en la inhibición de la vía Hh pero aún no han sido aprobados para su uso en seres humanos. Entre ellos se encuentra la ciclopamina, un alcaloide esterooidal natural que al unirse al receptor SMO inactiva a la vía Hh. La ciclopamina tiene el potencial para ser usado en el futuro en el tratamiento de tumores de mama, próstata y páncreas (16). Otro compuesto en proceso de estudio es la robotnicinina, la cual inhibe la interacción entre SHH y PTCH1 (17). Finalmente, GANT58 y GANT61 han mostrado buenos resultados antitumorales *in vitro* e *in vivo* debido a que son inhibidores selectivos de los factores GLI, sin embargo, aún no están disponibles como terapias contra el cáncer (18).

1.4 La vía Hedgehog y el cáncer cervicouterino

En el cáncer cervical se ha observado alta expresión de componentes de la vía Hh (19). La inhibición de la vía Hh en células de cáncer cervical mediante ciclopamina y GANT 58 o mediante silenciamiento génico reduce la capacidad invasiva, la proliferación, la transición epitelio-mesénquima e incrementa la apoptosis (20). Adicionalmente, se ha descrito que la vía Hh participa en la resistencia a fármacos y a la radiorresistencia en el cáncer de cérvix (21, 22). Se sabe que inhibiendo componentes de la vía Hh en el cáncer cervical se puede mejorar la eficacia de la radioterapia y quimioterapia (23). Recientemente se describió que el Eupatilin, una flavona O-metilada aislada de *Artemisia asiática*, inhibe la vía Hh y con ello, suprime la proliferación de las células de cáncer de cérvix (24). Por ser un producto natural y debido a que extractos de la planta se consumen desde hace mucho tiempo, se considera que este producto tendrá pocos efectos secundarios cuando se hagan estudios de efectividad en seres humanos. Lo anterior es una motivación para encontrar más productos naturales que tengan actividad anticancerígena. Uno de tales compuestos puede ser el calcitriol, la forma más activa de la vitamina D₃.

1.5 La vitamina D

La vitamina D es una prohormona liposoluble con múltiples funciones, entre las que destaca la regulación del metabolismo del calcio y del fosfato, el control de la expresión de genes asociados con la proliferación y la diferenciación celular, la modulación del sistema inmune (mejorando el sistema inmune innato e inhibiendo las respuestas inmunes adaptativas), que posee efectos neuro-protectores y hasta actividad antienvjecimiento. Además, reduce la aparición de enfermedades severas autoinmunes y cardiovasculares y, por último, previene la aparición de diferentes tipos de cáncer en los seres humanos (25).

Existen dos formas de vitamina D: la vitamina D₂ proveniente de alimentos de origen vegetal y fúngico, y la vitamina D₃ producida por el reino animal. La diferencia entre ellas es que la vitamina D₂ contiene un grupo metilo extra en el carbono 24 y un

doble enlace entre el carbono 22 y 23. La vitamina D₂ se genera a partir del ergosterol en las plantas frente a la radiación de luz UVB (26). La vitamina D es obtenida a partir de la dieta, de suplementos y de la exposición de la piel a los rayos del sol. Los principales alimentos que contienen vitamina D₃ son los pescados con alto contenido graso (salmón, atún, trucha), la yema de huevo, el hígado y la leche fortificada con vitamina D₃. Entre los alimentos de origen vegetal y fúngico, los hongos son los únicos alimentos con un aporte significativo de vitamina D₂. Ambas formas de la vitamina D provenientes de la dieta se absorben en el intestino delgado y son incorporadas en quilomicrones, de allí son transportadas por el sistema linfático a la circulación sistémica, en donde son acarreadas por la proteína de unión a la vitamina D (27).

Aunque la ingesta contribuye con una fracción del requerimiento diario de vitamina D en el organismo, el principal aporte de esta vitamina es mediante fotosíntesis cutánea. Para ello, el 7-dehidrocolesterol (provitamina D₃) que se encuentra en la piel se transforma en previtamina D₃ cuando se expone a luz ultravioleta B (UVB) de longitudes de onda comprendidas entre los 280 y 315 nm. Este compuesto sufre una isomerización térmica en la piel que lo convierte en vitamina D₃ (26) (figura 4).

El calcitriol es la forma activa de la vitamina D₃ y se genera a partir de dos hidroxilaciones sobre la molécula de la vitamina D₃ (figura 5). La primera hidroxilación ocurre en el hígado por la enzima CYP27A1 en el carbono 25 formando la molécula 25(OH)D₃ (calcidiol). La segunda hidroxilación es provocada por la enzima CYP27B1 en el riñón, generando de este modo el calcitriol (1 α , 25(OH)₂D₃) (28).

Cabe destacar que la biosíntesis de calcitriol es un mecanismo finamente regulado por el propio calcitriol, por la hormona paratiroidea y por el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (28).

El calcitriol es una hormona esteroide muy potente que tiene muchas funciones importantes. Una vez que el calcitriol ha realizado sus funciones, debe ser degradado. El calcitriol se degrada por una vía oxidativa mediante la acción de la

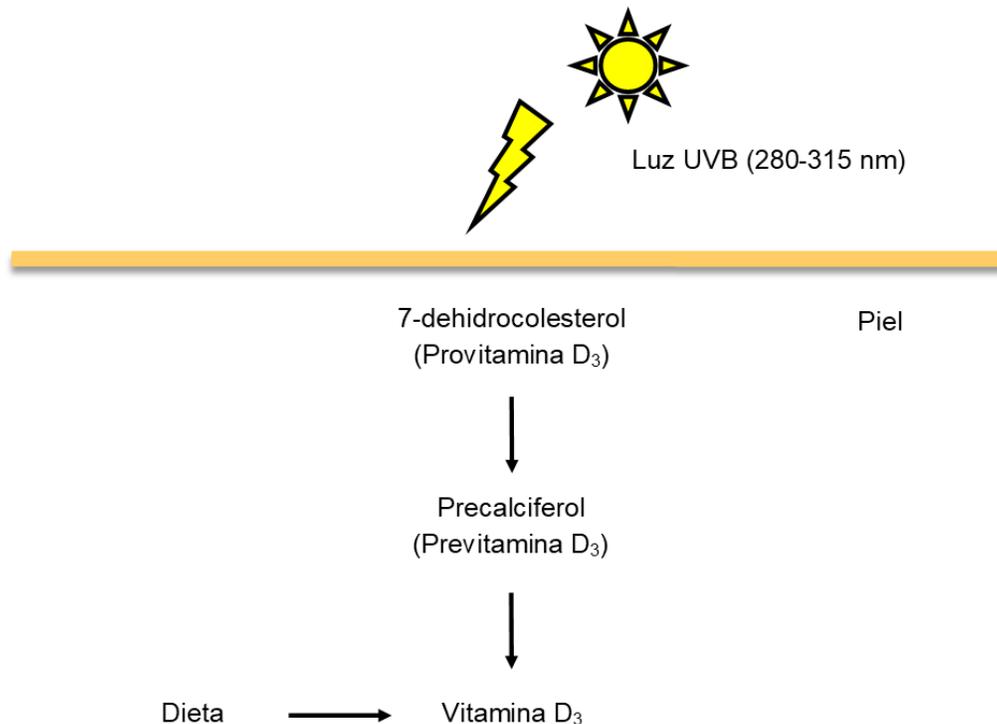


Figura 4. La fotosíntesis de la vitamina D₃. Bajo luz ultravioleta UVB, el 7-dehidrocolesterol cutáneo se convierte primero en previtamina D₃ y posteriormente en vitamina D₃.

enzima calcitriol 24-hidroxilasa o CYP24A1 formando inicialmente 1,24,25(OH)₃D₃ y finalmente al ácido calcitroico que se elimina por la bilis (figura 6). Este mecanismo previene la acumulación tóxica del calcitriol que pudiera causar hipercalcemia. De hecho, el gen CYP24A1 es el gen más inducible por el calcitriol en todos los tejidos del organismo (28).

1.6 Mecanismos de acción del calcitriol mediados por el receptor de la vitamina D

Las principales acciones biológicas del calcitriol son consecuencia de sus efectos sobre la regulación de la transcripción. Cuando el calcitriol entra a la célula por difusión pasiva se une al receptor de la vitamina D (VDR), un miembro de la superfamilia de receptores nucleares. Dentro de la célula, el VDR activado con

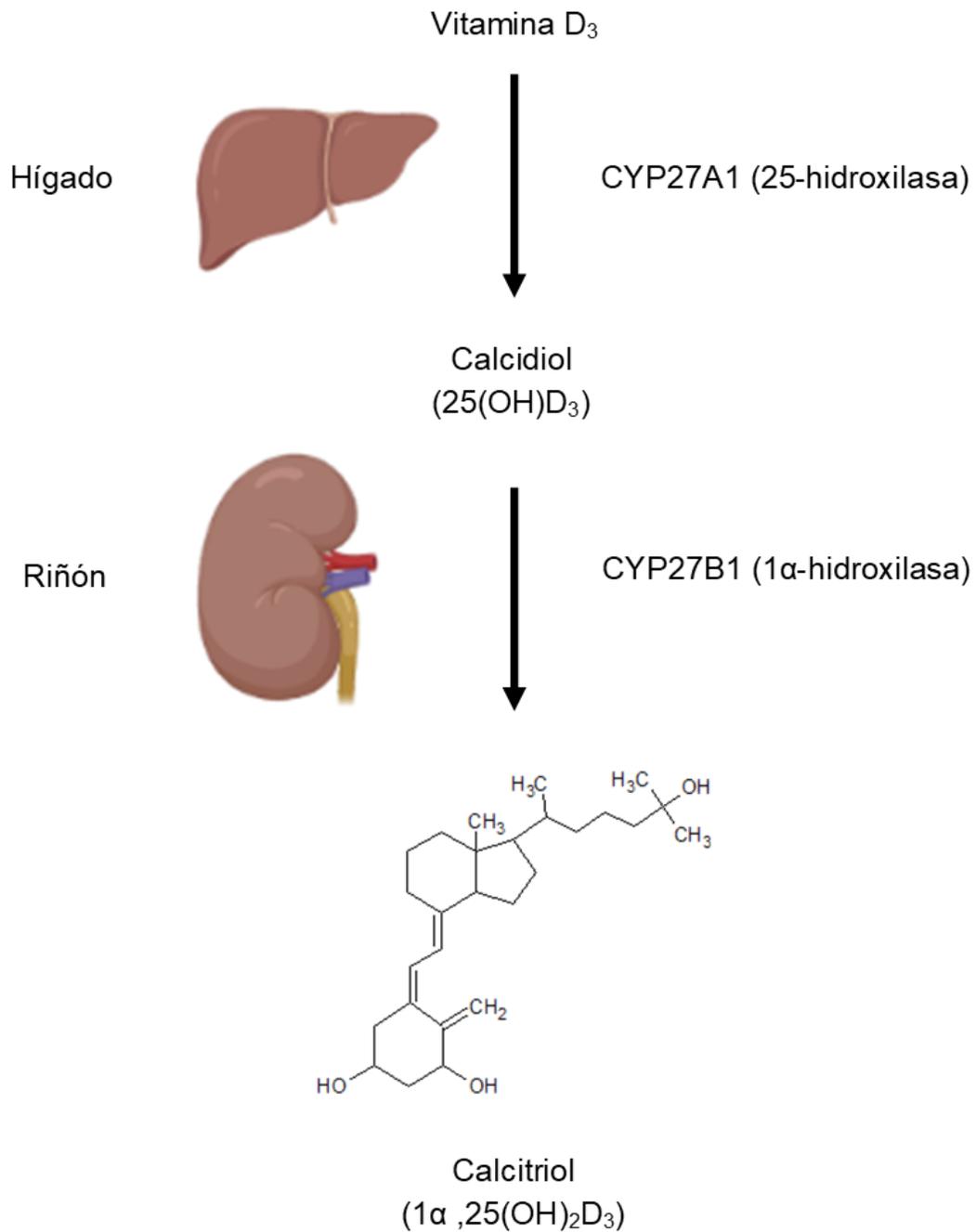


Figura 5. Biosíntesis del calcitriol. La forma hormonal de la vitamina D₃, el calcitriol, se produce por la acción secuencial de hidroxilasas del hígado y del riñón. (Elaborado en Publisher con ayuda de Biorender).

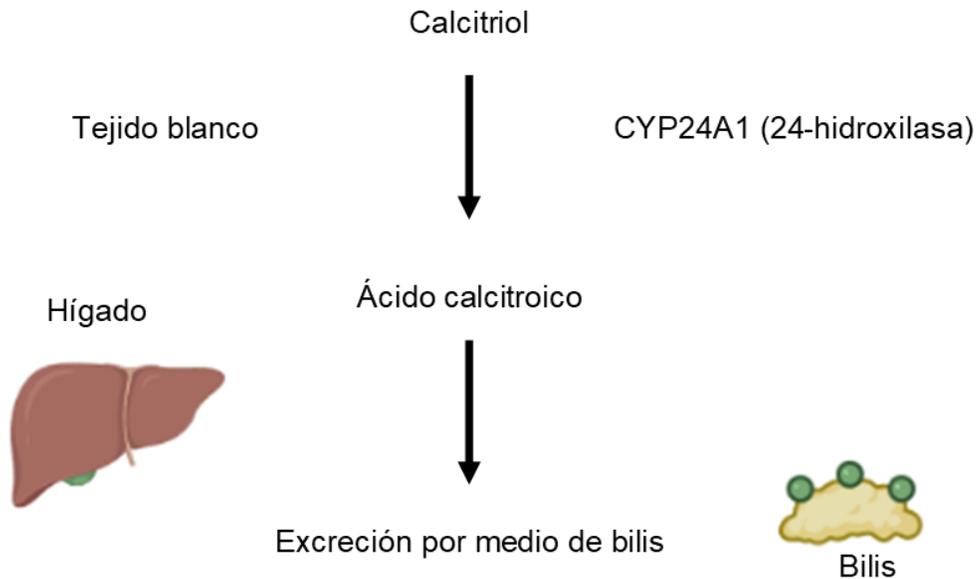


Figura 6. Catabolismo del calcitriol. La enzima CYP24A1 o también llamada calcitriol 24-hidroxilasa, es la enzima encargada de la degradación del calcitriol en ácido calcitroico, el cual se elimina en la bilis. (Elaborado en Publisher con ayuda de Biorender).

calcitriol se une al receptor de retinoides X (RXR) y este heterodímero se une al DNA en secuencias específicas conocidas como elementos de respuesta a la vitamina D (VDREs) en las regiones promotoras de los genes y con ello modifican la transcripción (figura 7) (29). En la mayoría de los genes calcitriol-regulados, el VDR activa la transcripción reclutando coactivadores transcripcionales y a la RNA polimerasa (figura 7A). En otros casos, el dímero VDR-RXR unido a elementos de respuesta negativos recluta a correpresores y factores remodeladores de la cromatina que inhiben la transcripción (figura 7B).

Como todos los esteroides, el calcitriol también presenta efectos no genómicos a nivel de la membrana plasmática que involucran la generación rápida de segundos mensajeros, activando diversas proteínas cinasas y canales iónicos (26).

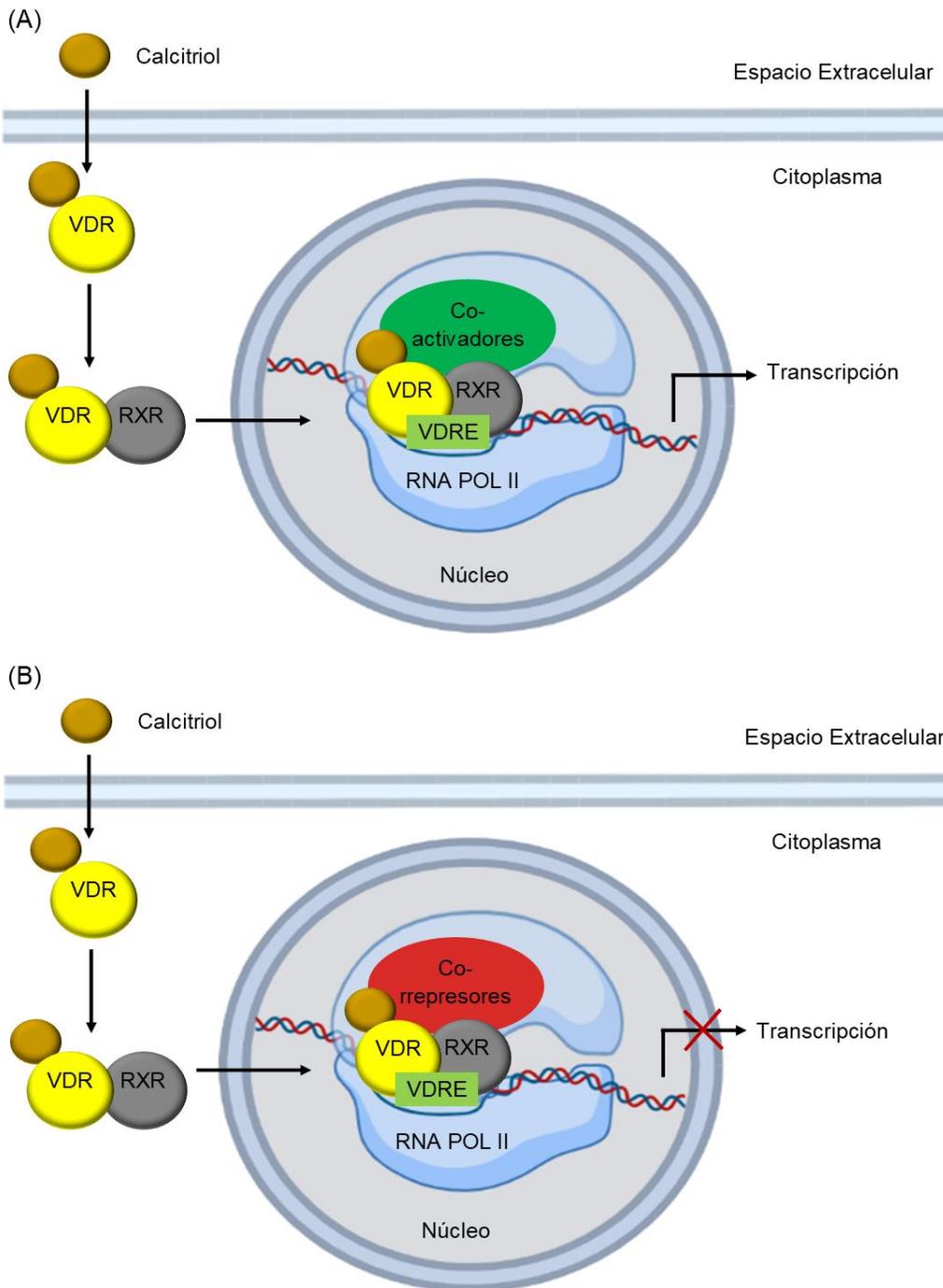


Figura 7. Mecanismos genómicos de activación (A) o represión transcripcional mediados por el calcitriol. El VDR unido al calcitriol y en forma de heterodímero con el receptor X de retinoides se une a elementos de respuesta a la vitamina D (VDREs) que pueden ser positivos (A) o negativos (B). Los VDREs positivos reclutan coactivadores y activan la transcripción mediada por la RNA polimerasa II mientras que los VDREs negativos reclutan correpresores y reprimen la transcripción (Elaborado en Publisher con ayuda de Biorender).

Cuando las concentraciones de 25(OH)D₃ en la sangre están por debajo de 20 ng/mL, se considera a la persona con deficiencia de vitamina D (30). Esta condición es un factor de riesgo para la aparición de osteoporosis, hipertensión arterial, diabetes, esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer, asma y enfermedades autoinmunes. La deficiencia de vitamina D también agrava el curso de infecciones virales como la influenza y el COVID-19 o bacterianas como la tuberculosis. De manera importante, la deficiencia de vitamina D es condicionante de la aparición de un gran número de tumores malignos (30).

1.7 Acciones antitumorales del calcitriol

El calcitriol posee efectos antiproliferativos mediante la inhibición de oncogenes que son clave en los mecanismos de invasión y metástasis en los tumores, teniendo además efectos prodiferenciales y participando en procesos antiinflamatorios (31). Adicionalmente, el calcitriol favorece la apoptosis en células anormales y evita la angiogénesis tumoral, evitando así la nutrición de los tumores. Con todos estos mecanismos, el calcitriol es considerado un agente endógeno que previene la formación de múltiples tipos de cáncer; sin embargo, una vez desarrollado un tumor, los efectos benéficos del calcitriol son limitados.

1.8 El calcitriol y el cáncer cervicouterino

En el cáncer cervicouterino, el calcitriol tiene efectos antitumorales significativos. En las células HeLa, el calcitriol inhibe la proliferación celular por disminución de la expresión del oncogén del cáncer cervical HCCR-1 e incrementando la expresión del inhibidor de cinasas dependiente de ciclinas p21 (32). Adicionalmente, el calcitriol es un inhibidor natural de la expresión del canal de potasio éter a-go-go 1 (33, 34), un marcador temprano de cáncer cervical (35). De manera importante, se ha determinado que el cáncer cervicouterino se presenta con mayor prevalencia en mujeres que cursaron con deficiencia de vitamina D (36), enfatizando el papel protector del calcitriol en este tipo de cáncer.

2. Planteamiento del problema

La represión ejercida por el receptor PTCH1 sobre SMO ha sido ampliamente estudiada y se ha determinado que no requiere interacción física entre tales moléculas. Se ha propuesto que la vitamina D₃ y el calcitriol son intermediarios importantes en la inactivación de SMO por PTCH1 (37, 38). Adicionalmente, en diversos modelos *in vivo* e *in vitro* de cáncer se ha determinado que la actividad de la vía Hh disminuye en presencia de calcitriol y ello correlaciona con la inhibición de la proliferación celular (39, 40). Entre los genes de la vía Hh, el calcitriol ha demostrado reprimir la expresión génica de GLI1 (39) y GLI2 (41). Sin embargo, no existen estudios en los que se haya estudiado la regulación individual de cada uno de los componentes de la vía Hh en modelos de cáncer cervical. En este trabajo se aborda esta cuestión y tomando en cuenta que el calcitriol posee efectos represivos sobre diversos oncogenes, se espera que esta hormona tenga efectos bloqueadores sobre la expresión génica de los componentes de esta vía oncogénica en células de cáncer cervical.

3. Hipótesis

El calcitriol inhibe la expresión génica de los componentes de la vía Hedgehog en líneas celulares de cáncer de cérvix.

4. Objetivo general

Evaluar si el calcitriol modifica la expresión génica de los componentes de la vía de señalización Hedgehog en las líneas celulares CaSki, SiHa y HeLa de cáncer cervical.

5. Objetivos específicos

Realizar tratamientos de células CaSki, SiHa y HeLa en ausencia o en presencia de calcitriol durante 24 h.

Estudiar la expresión relativa del gen CYP24A1 en células CaSki, SiHa y HeLa en ausencia y en presencia de calcitriol.

Determinar el efecto del calcitriol sobre todos los componentes de la vía Hedgehog en células CaSki, SiHa y HeLa.

6. Metodología

6.1 Material biológico

Se utilizaron las líneas celulares establecidas de cáncer cervical CaSki, SiHa y HeLa (ATCC catálogos CRL-1550, HTB-35 y CCL-2, respectivamente, E.E.U.U.). Las células CaSki contienen en su genoma entre 400 y 600 copias integradas del HPV 16. Las células SiHa tienen en el genoma 1 o 2 copias integradas del HPV 16. Las células HeLa presentan entre 10 y 50 copias integradas del HPV 18.

6.2 Cultivo celular

Las células CaSki se cultivaron en medio (RPMI, Gibco, E.E.U.U.) mientras que las SiHa y HeLa fueron cultivadas en medio DMEM con alta concentración de glucosa (RPMI, Gibco, E.E.U.U.). Todos los medios de cultivo fueron suplementados con suero fetal bovino descomplementado (SFBi) 10% y penicilina / estreptomina 1% (Gibco, E.E.U.U.). El cultivo celular se realizó en condiciones estándar (37°C, CO₂ 5% y humedad relativa de 85%).

Cada tipo celular se sembró en cajas Petri de cultivo celular de 100 mm a razón de 1.5 millones de células por caja en 5 mL de su respectivo medio de cultivo, utilizando 5 réplicas experimentales por tratamiento. Después de 24 h de incubación en el cual las células se adherían a la caja, el medio de siembra fue retirado por aspiración y fue reemplazado con los medios de tratamiento. En este trabajo se utilizaron dos tratamientos: células tratadas con calcitriol 1×10^{-7} M o células tratadas con vehículo (etanol 0.1%). Los tratamientos fueron colocados en el respectivo medio de cultivo, pero reemplazando el SFBi por suero fetal bovino descomplementado y tratado con carbón/dextrán. Las incubaciones con ambos tratamientos se llevaron a cabo durante 24 h.

6.3 Análisis de la expresión génica

6.3.1 Purificación de RNA total

Una vez finalizada la incubación con los tratamientos, el medio se retiró por aspiración y se procedió al aislamiento del RNA total mediante el método descrito por Chomczynski y Sacchi (42). Para ello, las células fueron tratadas con 1 mL del reactivo TRIzol (Invitrogen, E.E.U.U.) que contiene fenol e isotiocianato de guanidina para separar RNA, DNA y proteínas de las células. Posteriormente se adicionaron 0.25 mL de cloroformo frío y se agitó en vórtex para formar una emulsión. Las muestras fueron centrifugadas a 20800 x g durante 45 minutos a 4°C, de este modo se logró obtener una fase acuosa que contiene al RNA disuelto, una interfase donde se encuentra el DNA, y una fase orgánica que contiene proteínas y los demás componentes celulares. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, se agregó 1 mL de isopropanol frío, se agitó y se incubó 1 h a -70°C para precipitar al RNA y sales. Nuevamente las muestras fueron centrifugadas a 20800 x g durante 30 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se lavó con 1 mL de etanol 75% en agua tratada con pirocarbonato de dietilo (H₂O+DEPC) para disolver las sales remanentes. Después de una última centrifugación a 20800 x g durante 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante, se dejaron secar las muestras y el RNA se disolvió en H₂O+DEPC. Las muestras fueron almacenadas a -70°C y para la cuantificación se utilizó un lector de placas multimodal (Synergy HT Biotek, Agilent E.E.U.U.) colocando 2 µL de muestra y midiendo en las longitudes de onda de 260/280 nm.

6.3.2 Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Para realizar la síntesis de cDNA se utilizó el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis for RT-qPCR (ThermoFisher Scientific, E.E.U.U.). Este kit consiste de dos componentes, un tubo que contiene una versión optimizada de la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney y el inhibidor de RNasas RiboLock; y el tubo de la mezcla de la reacción 5X que contiene el amortiguador, los 4 desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), el oligo (dT)₁₈ y una mezcla de hexámeros aleatorios. Cada cDNA se obtuvo a partir de 5 µg de RNA total siguiendo

las instrucciones del fabricante. El cDNA se preparó en un termociclador 9600 (Perkin Elmer, E.E.U.U.) con el siguiente programa: 25°C por 10 minutos para alinear las secuencias de los oligonucleótidos al RNA total, 50°C por 30 minutos para la transcripción inversa y 85°C por 5 minutos para destruir al RNA molde y a la transcriptasa reversa. Los cDNAs obtenidos fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

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

La expresión génica de los componentes de la vía Hedgehog se evaluó por qPCR, un tipo de PCR en el que se monitorea la amplificación durante todos los ciclos de la reacción. El formato de detección empleado fue a base de sondas de hidrólisis tipo Taqman (Universal Probe Library, Roche, Alemania). Las sondas Taqman son moléculas pequeñas de DNA de aproximadamente 8 nucleótidos que pueden hibridarse con secuencias complementarias en el DNA a ser amplificado. Una sonda Taqman contiene un fluoróforo en el extremo 5' y un apagador en el extremo 3'. En su forma intacta (libre o unida al DNA) una sonda Taqman no emite fluorescencia debido al bloqueo de la fluorescencia del fluoróforo por el apagador mediante un mecanismo FRET (Transferencia de energía de resonancia de Förster). Sin embargo, durante la amplificación por PCR, la actividad exonucleasa 5' a 3' de la Taq DNA polimerasa remueve el apagador y libera la sonda, la cual emite fluorescencia a 530 nm de manera proporcional a los amplicones en la reacción.

Las reacciones de amplificación se realizaron mediante el formato "hot start PCR" con el kit LightCycler 480 Probes Master que contiene a la Taq DNA polimerasa inactiva con un anticuerpo y que debe ser calentada para eliminar el anticuerpo y activar de esta manera a la enzima. Las amplificaciones fueron realizadas en placas de 96 pozos en el equipo LightCycler 480 (Roche, Alemania).

En este estudio la expresión génica de los componentes de la vía Hedgehog se evaluó de forma relativa con respecto a la de un gen de expresión constante. Después de probar varios genes constitutivos potenciales, decidimos utilizar RPL32

(el gen de la proteína ribosomal L32) porque su expresión génica no fue afectada por el tratamiento con calcitriol.

Cada reacción de qPCR consistió de 2 μ L de cDNA, 2.5 μ L de agua libre de nucleasas, 0.2 μ L de cada uno de los oligonucleótidos 10 μ M (tabla 1), 5 μ L de la mezcla de reacción 2X que contiene la Taq DNA polimerasa y 0.1 μ L de la respectiva sonda de hidrólisis (tabla 1). En cada experimento se amplificó de manera paralela el gen RPL32 para normalizar los resultados y como un control del efecto del calcitriol se utilizó la inducción del gen CYP24A1.

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos y sondas de hidrólisis (Universal Probe Library) utilizadas en este estudio.

Gen	Sonda	Secuencia (5' a 3')
RPL32	17	GAAGTTCCTGGTCCACAACG
		GAGCGATCTCGGCACAGTA
CYP24A1	88	CATCATGGCCATCAAAACAA
		GCAGCTCGACTGGAGTGAC
DHH	86	GCAACAAGTATGGGTTGCTG
		CGGACCGCCAGTGAGTTA
IHH	38	TGCATTGCTCCGTCAAGTC
		CCACTCTCCAGGCGTACCT
SHH	23	GCTTCGACTGGGTGTACTACG
		GCCACCGAGTTCTCTGCT
PTCH1	05	CTTCGCTCTGGAGCAGATTT
		ACCCAGTTTAAATAAGAGTCTCTGAAA
SMO	64	TCAGCTGCCACTTCTACGAC

		GGTCACATTGGCCTGACATA
KIF7	19	GCCCTGATGCAGGAGAAG
		GCACGATGTCCTCGTTGAG
SUFU	59	GTTTGTCTCCACGGGAGTG
		TCCGAGGATAGGTTTCAGAGTTG
GLI1	07	CCAGCCAGAGAGACCAACAG
		CCCGCTTCTTGGTCAACTT
GLI2	19	CTACCTCAACCCCGTGGAC
		CTGAGAGTGGGGAGATGGAC
GLI3	26	TCAAACCCGATGAAGACCTC
		TTGTTCCCTTCGGGCTGTT

El programa de amplificación fue el siguiente: 95°C durante 10 minutos, para desnaturalizar el anticuerpo unido al sitio activo de la Taq DNA polimerasa; posteriormente 55 ciclos del siguiente programa (95°C/10 s para desnaturalizar el DNA, 60°C/30 s para la unión de los oligonucleótidos al cDNA y 72°C/1 s para la síntesis del amplicón y para la toma de la lectura de fluorescencia a 530 nm).

6.4. Análisis estadístico

Los datos de expresión de cada gen fueron normalizados respecto a los resultados del gen RPL32. El análisis estadístico entre las muestras de los dos grupos se realizó mediante la prueba t de Student, considerando un valor de $P < 0.05$ como estadísticamente significativo.

7. Resultados

7.1 El calcitriol promueve la acumulación significativa del RNAm del gen CYP24A1 en las células CaSki

Nuestro estudio comenzó con la caracterización de la respuesta de las células CaSki a la inducción del gen CYP24A1 por el calcitriol que ocurre en una gran variedad de células. Como se observa en la figura 8, el calcitriol 1×10^{-7} M provocó la acumulación significativa del RNAm del gen CYP24A1 respecto al control durante 24 de horas de incubación, validando el uso de estas células para procesos regulados por el calcitriol.

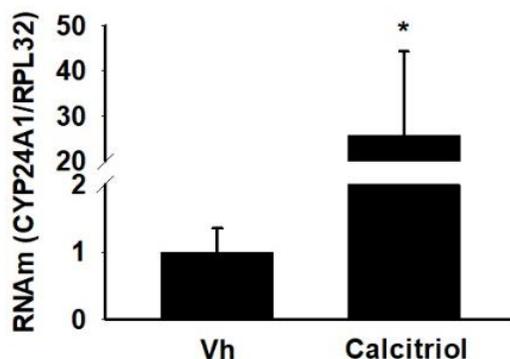


Figura 8. El calcitriol promueve la acumulación significativa del RNAm del gen CYP24A1 en las células CaSki. Las células cultivadas durante 24 h fueron incubadas en presencia de calcitriol 1×10^{-7} M o etanol 0.1% como su vehículo. Después de 24 h de incubación, se extrajo el RNA total y la expresión del gen CYP24A1 se evaluó por qPCR. Las barras representan el promedio de 2 experimentos independientes (cada uno con al menos 3 réplicas experimentales) \pm la DE de la expresión génica de CYP24A1 normalizado contra la expresión del gen constitutivo RPL32. * $P < 0.05$ vs. vh.

7.2 Efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de los ligandos de la vía Hh en las células CaSki

Posteriormente se evaluó la expresión génica relativa de los ligandos Hh en las células CaSki. La figura 9 muestra que aunque los genes SHH, DHH e IHH se expresan en las células CaSki, el calcitriol no provocó cambios en la acumulación de los RNAm de ninguno de ellos.

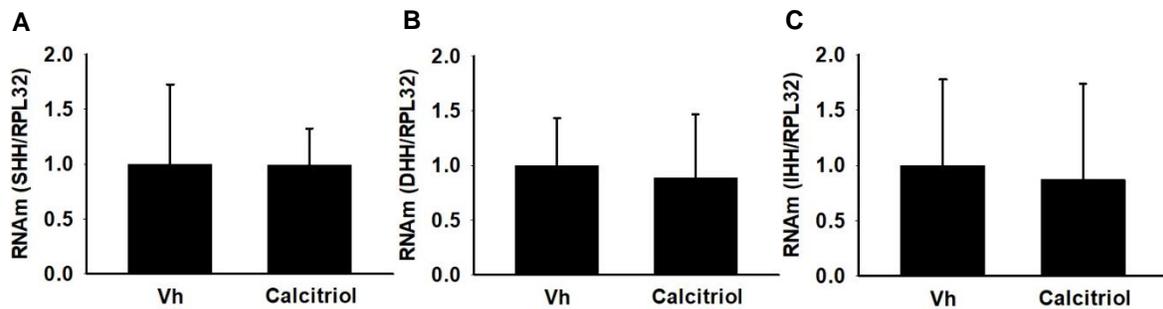


Figura 9. Efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de los ligandos de la vía Hedgehog en las células CaSki. Las células cultivadas durante 24 h fueron incubadas en presencia de calcitriol 1×10^{-7} M o etanol 0.1% como su vehículo. Después de 24 h de incubación, se extrajo el RNA total y la expresión de los genes SHH (A), DHH (B) e IHH (C) se evaluó por qPCR. Las barras representan el promedio de 2 experimentos independientes (cada uno con al menos 3 réplicas experimentales) \pm la DE de cada expresión génica normalizada contra el gen constitutivo RPL32.

7.3 Efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de la vía Hh en las células CaSki

La figura 10 muestra el efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm del resto de componentes de la vía Hh en las células CaSki. De manera interesante, los RNAm de los genes KIF7 y GLI3 fueron significativamente menos abundantes por el calcitriol 1×10^{-7} M respecto a sus respectivos controles (Figura 10 C y G). Se observó expresión de los RNAm de PTCH1, SMO, SUFU, GLI1 y GLI2 (figura 10) y aunque el calcitriol no tuvo cambios significativos sobre estos genes, se notó en todos los casos una tendencia a la disminución respecto a sus respectivos controles.

7.4 El calcitriol promueve la acumulación significativa del RNAm del gen CYP24A1 en las células SiHa

Del mismo modo que trabajamos con células CaSki, en esta tesis también utilizamos células SiHa. Iniciamos nuevamente la caracterización del efecto del calcitriol sobre el gen CYP24A1. En estas células, el calcitriol provocó una gran acumulación del RNAm de CYP24A1 (alrededor de 600 veces) respecto al vehículo (figura 11).

Tomando en cuenta el resultado anterior, las células SiHa se consideraron un buen modelo para el estudio del calcitriol sobre la expresión génica de la vía Hh.

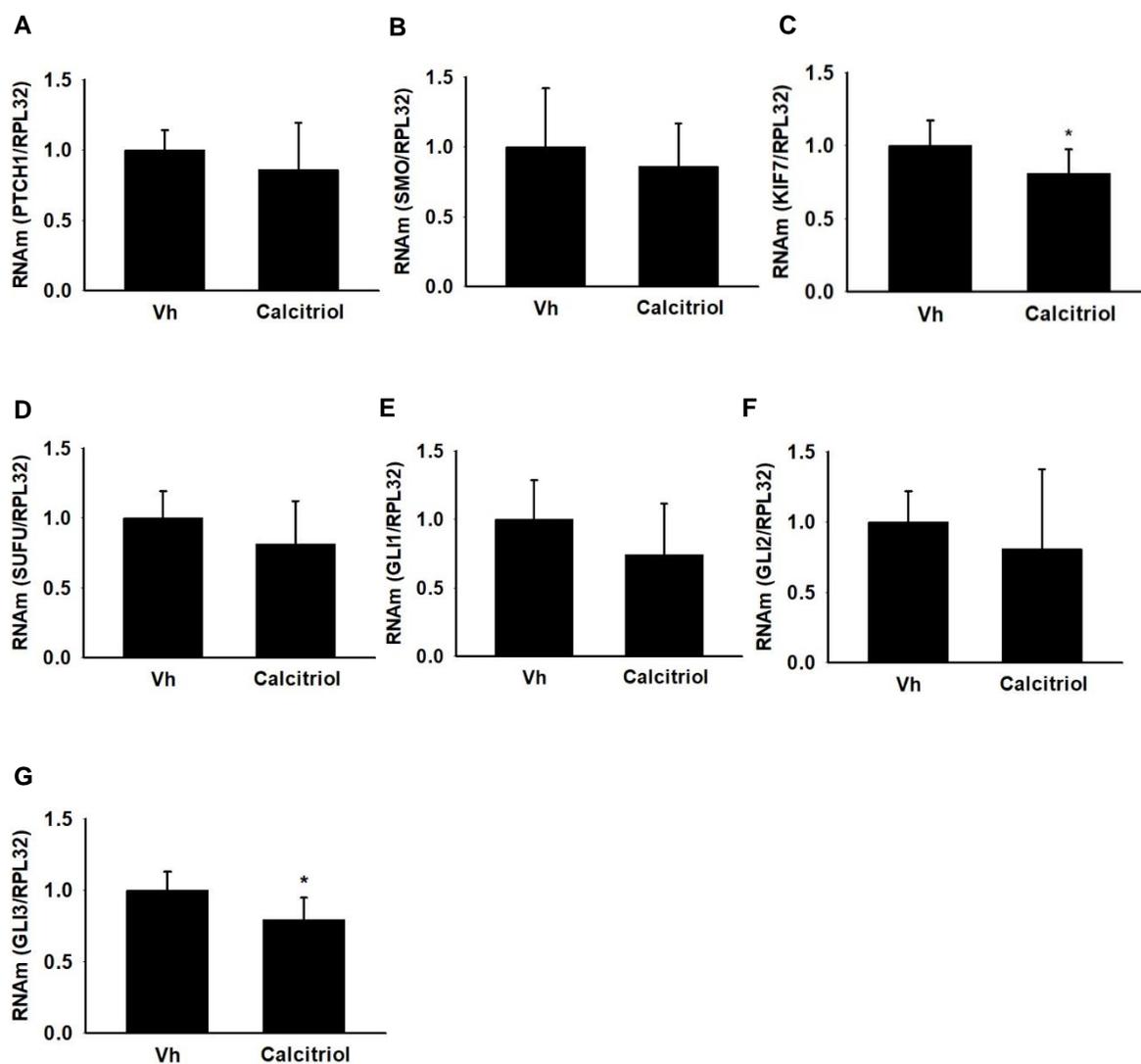


Figura 10. Efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de componentes de la vía Hedgehog en las células CaSki. Las células cultivadas durante 24 h fueron incubadas en presencia de calcitriol 1×10^{-7} M o etanol 0.1% como su vehículo. Después de 24 h de incubación, se extrajo el RNA total y la expresión de los genes PTCH1 (A), SMO (B), KIF7 (C), SUFU (D), GLI1 (E), GLI2 (F) y GLI3 (G) se evaluó por qPCR. Las barras representan el promedio de 2 experimentos independientes (cada uno con al menos 3 réplicas experimentales) \pm la DE de cada expresión génica normalizada contra el gen constitutivo RPL32. * $P < 0.05$ vs. vh.

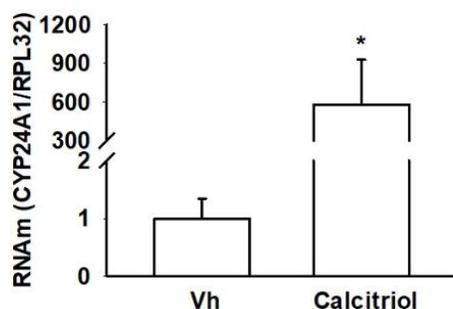


Figura 11. El calcitriol promueve la acumulación significativa del RNAm del gen CYP24A1 en las células SiHa. Las células cultivadas durante 24 h fueron incubadas en presencia de calcitriol 1×10^{-7} M o etanol 0.1% como su vehículo. Después de 24 h de incubación, se extrajo el RNA total y la expresión del gen CYP24A1 se evaluó por qPCR. Las barras representan el promedio de 3 experimentos independientes (cada uno con al menos 3 réplicas experimentales) +/- la DE de la expresión génica de CYP24A1 normalizado contra la expresión del gen constitutivo RPL32. * $P < 0.05$ vs. vh.

7.5 Efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de los ligandos de la vía Hh en las células SiHa

La figura 12 muestra el efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de los ligandos Hh SHH, DHH e IHH en las células SiHa. La figura 12C muestra la disminución significativa de la acumulación del RNAm gen IHH en presencia de calcitriol en células de cáncer cervical SiHa. Para los ligandos SHH y DHH, el calcitriol mostró una tendencia no significativa a disminuir la acumulación de sus RNAm (figuras 12A y B).

7.6 Efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de la vía Hh en las células SiHa

Se evaluó el efecto del calcitriol sobre la acumulación de RNAm de PTCH1, SMO, KIF7, SUFU, GLI1, GLI2 y GLI3 en las células SiHa (figura 13). En estas células, únicamente el RNAm del gen GLI2 fue significativamente menos abundante en presencia del calcitriol respecto a su vehículo (figura 13F). Todos los demás genes

de la vía Hh se expresaron pero no fueron afectados por el calcitriol en las células SiHa (figura 13).

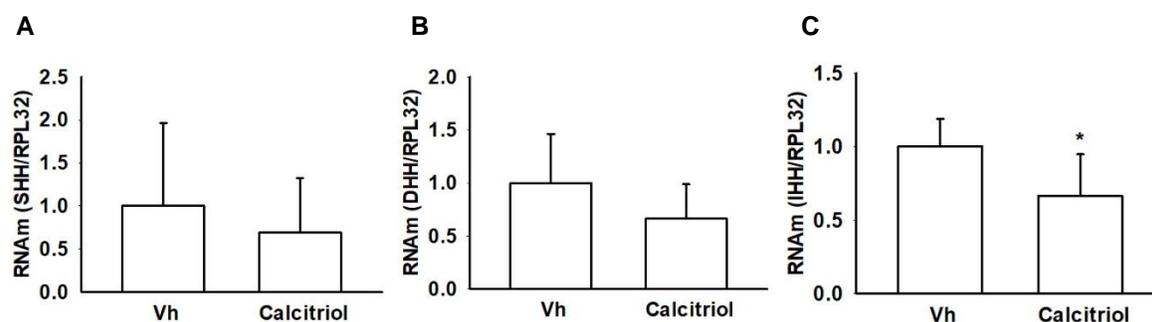


Figura 12 Efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de los ligandos de la vía Hedgehog en las células SiHa. Las células cultivadas durante 24 h fueron incubadas en presencia de calcitriol 1×10^{-7} M o etanol 0.1% como su vehículo. Después de 24 h de incubación, se extrajo el RNA total y la expresión de los genes SHH (A), DHH (B) e IHH (C) se evaluó por qPCR. Las barras representan el promedio de 3 experimentos independientes (cada uno con al menos 3 réplicas experimentales) +/- la DE de cada expresión génica normalizada contra el gen constitutivo RPL32. * $P < 0.05$ vs. vh.

7.7 El calcitriol promueve la acumulación significativa del RNAm del gen CYP24A1 en las células HeLa

Las últimas células de cáncer cervical usadas fueron las células HeLa. Nuevamente iniciamos con la investigación del efecto del calcitriol sobre el gen CYP24A1. En las células HeLa, el calcitriol provocó la acumulación significativa (alrededor de 20 veces) del RNAm del gen CYP24A1 respecto al vehículo (figura 14), validando el uso de estas células en experimentos posteriores con calcitriol.

7.8 Efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de los ligandos de la vía Hh en las células HeLa

Posteriormente evaluamos el efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de los ligandos Hh en las células HeLa. La figura 15 muestra que el calcitriol no tuvo

efectos significativos sobre la acumulación de los RNAm de DHH e IHH e inclusive se observa que el calcitriol tiende a acumular más RNAm de SHH, aunque el cambio no resultó significativo.

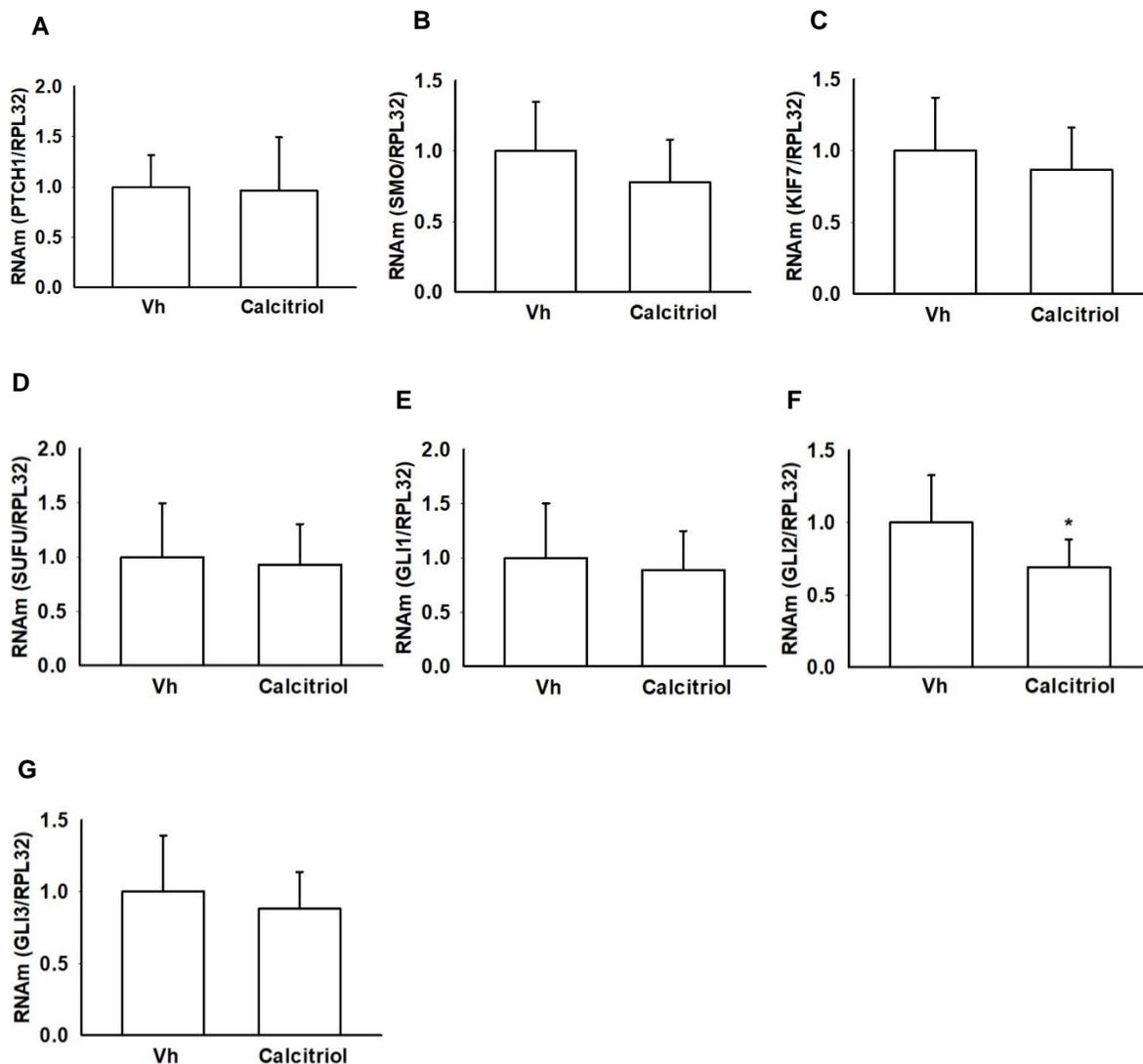


Figura 13. Efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de componentes de la vía Hedgehog en las células SiHa. Las células cultivadas durante 24 h fueron incubadas en presencia de calcitriol 1×10^{-7} M o etanol 0.1% como su vehículo. Después de 24 h de incubación, se extrajo el RNA total y la expresión de los genes PTCH1 (A), SMO (B), KIF7 (C), SUFU (D), GLI1 (E), GLI2 (F) y GLI3 (G) se evaluó por qPCR. Las barras representan el promedio de 3 experimentos independientes (cada uno con al menos 3 réplicas experimentales) \pm la DE de cada expresión génica normalizada contra el gen constitutivo RPL32. *P<0.05 vs. vh.

7.9 Efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de la vía Hh en las células HeLa

Finalmente, evaluamos el efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de los genes Hh en las células HeLa. La figura 16 muestra que el calcitriol no tuvo efecto sobre la acumulación de ninguno de los transcritos estudiados.

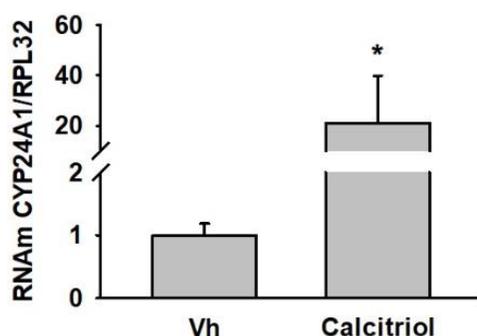


Figura 14. El calcitriol promueve la acumulación significativa del RNAm del gen CYP24A1 en las células HeLa. Las células cultivadas durante 24 h fueron incubadas en presencia de calcitriol 1×10^{-7} M o etanol 0.1% como su vehículo. Después de 24 h de incubación, se extrajo el RNA total y la expresión del gen CYP24A1 se evaluó por qPCR. Las barras representan el promedio de 3 experimentos independientes (cada uno con al menos 3 réplicas experimentales) \pm la DE de la expresión génica de CYP24A1 normalizado contra la expresión del gen constitutivo RPL32. * $P < 0.05$ vs. vh.

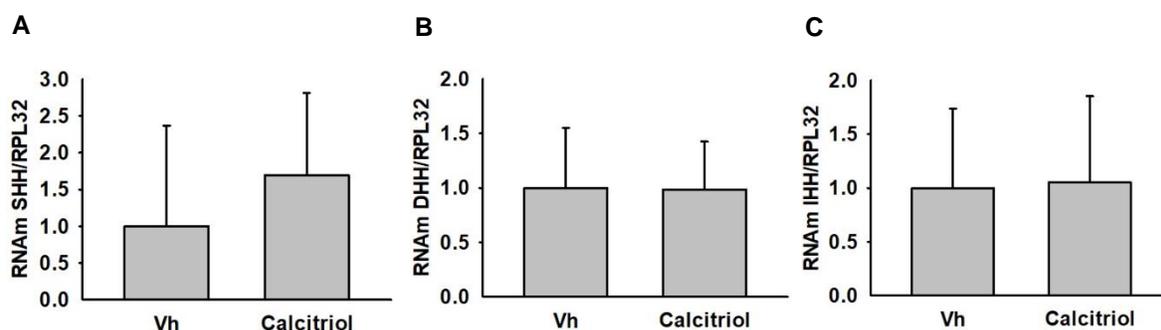


Figura 15. Efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de los ligandos de la vía Hedgehog en las células HeLa. Las células cultivadas durante 24 h fueron incubadas en presencia de calcitriol 1×10^{-7} M o etanol 0.1% como su vehículo. Después de 24 h de incubación, se extrajo el RNA total y la expresión de los genes SHH (A), DHH (B) e IHH (C) se evaluó por qPCR. Las barras representan el promedio de 3 experimentos independientes (cada uno con al menos 3 réplicas experimentales) \pm la DE de cada expresión génica normalizada contra el gen constitutivo RPL32.

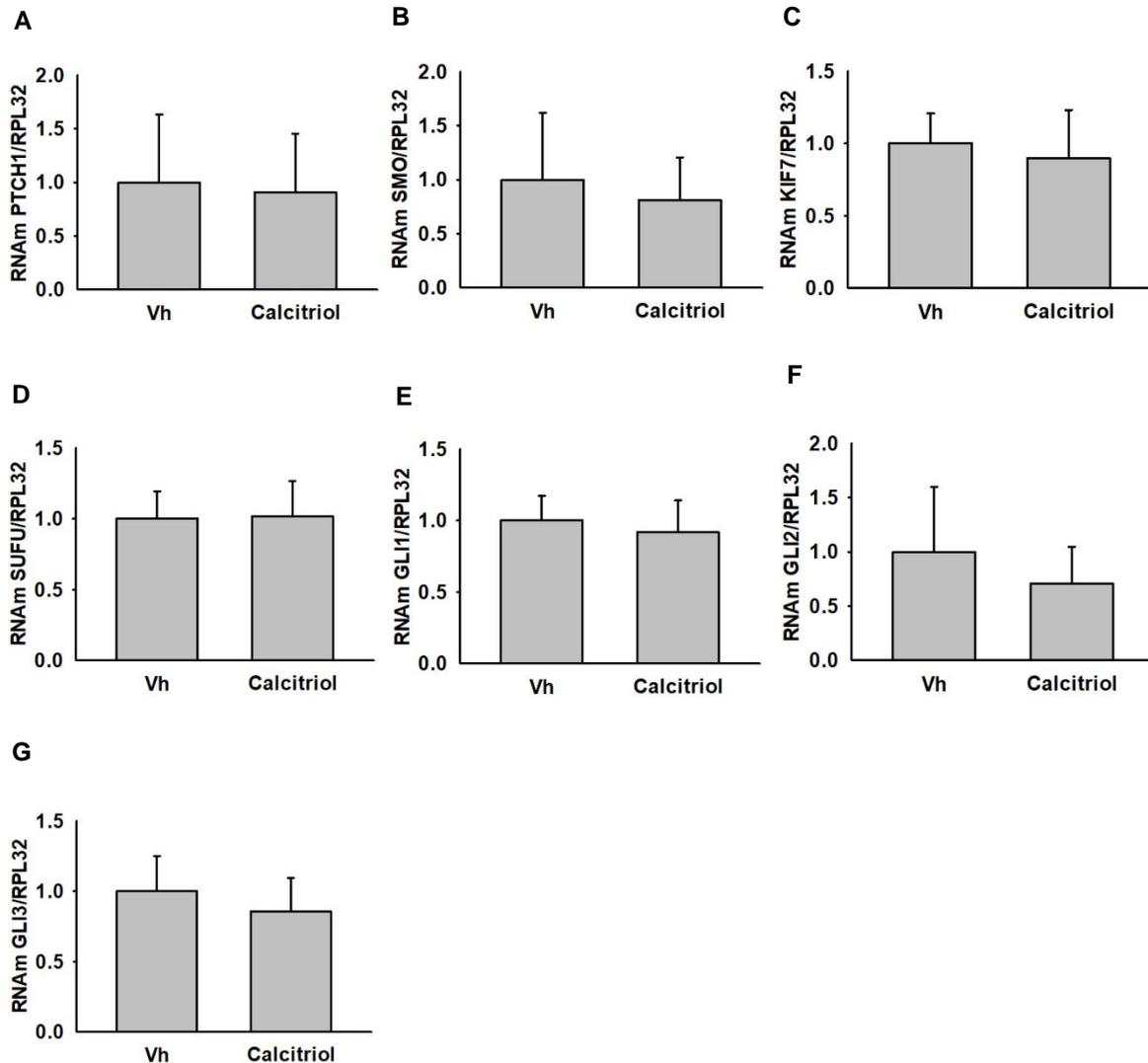


Figura 16. Efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de componentes de la vía Hedgehog en las células HeLa. Las células cultivadas durante 24 h fueron incubadas en presencia de calcitriol 1×10^{-7} M o etanol 0.1% como su vehículo. Después de 24 h de incubación, se extrajo el RNA total y la expresión de los genes PTCH1 (A), SMO (B), KIF7 (C), SUFU (D), GLI1 (E), GLI2 (F) y GLI3 (G) se evaluó por qPCR. Las barras representan el promedio de 3 experimentos independientes (cada uno con al menos 3 réplicas experimentales) \pm la DE de cada expresión génica normalizada contra el gen constitutivo RPL32.

8. Discusión

En el presente trabajo de tesis evaluamos el efecto del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm de componentes de la vía Hh en 3 diferentes líneas de cáncer cervical que poseen secuencias de HPVs de alto riesgo integradas en su genoma. De manera interesante, todos los transcritos de la vía Hh fueron detectados bajo nuestras condiciones experimentales en ausencia y en presencia de calcitriol. Aunque los resultados aquí presentados se limitaron a la acumulación de RNAm y no se estudiaron ni la abundancia de las proteínas ni sus actividades biológicas, consideramos que nuestros resultados dan apoyo a que la vía Hh está activa en las tres líneas celulares. A excepción del cerebro adulto que continúa expresando SHH (43), se considera que todos los componentes de la vía Hh no se expresan en los tejidos adultos ni a nivel de RNAm ni de proteína. La detección de los transcritos de la vía Hh probablemente implica que son traducidos a proteínas funcionales. Un estudio previo concluyó que efectivamente la vía Hh está activa en las líneas celulares CaSki, SiHa y HeLa e inclusive en otras líneas celulares establecidas de cáncer de cérvix como C33A y C4-1 (19). De manera importante, la vía Hh en las células CaSki, SiHa y HeLa promueve la proliferación y la migración celular (19). Otros reportes indican que la vía Hh también participa en el crecimiento, la invasión, la metástasis, la recurrencia, la resistencia a fármacos y a la radioterapia en el cáncer cervicouterino avanzado (21). La vía Hh se encuentra encendida desde las lesiones precursoras del cáncer cervicouterino e incrementa gradualmente su actividad conforme progresa el cáncer (44). También se ha descrito viabilidad reducida de células de cáncer cervical secundaria a la alta expresión del microRNA-506, un supresor tumoral que impacta negativamente la expresión de GLI3 (45). Por lo tanto, la desregulación de la vía Hh está involucrada en la carcinogénesis cervical (19).

En relación a la regulación de la vía Hh por el calcitriol, existen algunos reportes en la literatura. En un estudio realizado en carcinoma de células basales se encontró que el calcitriol bloqueó la proliferación celular mediante la supresión de la actividad de la vía Hh (46). Sin embargo, en el trabajo referido únicamente se describió el

efecto represor del calcitriol sobre la actividad de la vía Hh medida como la transactivación del factor de transcripción GLI (46). Cabe destacar que nuestro estudio es el primero que aborda la regulación del calcitriol sobre la acumulación de los RNAm individuales de cada uno de los componentes de la vía Hh en modelos *in vitro* de cáncer cervical. Los resultados mostraron que el calcitriol disminuyó la acumulación de los RNAm de los genes KIF7 y GLI3 en las células CaSki, de IHH y GLI2 en las células SiHa y de ninguno de la vía Hh en las células HeLa. A este respecto, datos previamente reportados en tumores epidérmicos muestran que el VDR unido al calcitriol regula de manera negativa a cada uno de los componentes de la vía Hh a nivel de proteína (39). Tomando en cuenta este reporte, se esperaría que toda la vía Hh hubiese sido inhibida por el calcitriol a nivel de RNAm. Sin embargo, solamente se encontró menor acumulación de algunos RNAm de la vía Hh por el calcitriol. Los resultados de la presente tesis fueron obtenidos durante la pandemia COVID-19 y creemos que hicieron falta más repeticiones con un número mayor de muestras para caracterizar en detalle el efecto regulador del calcitriol sobre los RNAm de la vía Hh en las líneas celulares estudiadas de cáncer cervicouterino. También hizo falta estudiar la acumulación de cada RNAm y de las proteínas Hh durante diferentes tiempos en ausencia y en presencia de calcitriol. En todo caso, los resultados obtenidos en esta tesis son muy alentadores pues es el primer estudio que sugiere que los genes KIF7 e IHH podrían ser reprimidos por el calcitriol.

KIF7, un homólogo de mamíferos del gen *Costal2* de *Drosophila*, codifica para un motor molecular presente en los cilios celulares que funciona como un regulador negativo de la vía Hh previniendo la liberación de los factores GLI2 en la ausencia de ligandos Hh. Sin embargo, KIF7 también puede funcionar como un regulador positivo de la vía Hh al prevenir el procesamiento de GLI3 a su forma represora (47). Dadas las propiedades antiproliferativas del calcitriol (25), es probable que la segunda opción explique mejor la disminución en la acumulación del RNAm de KIF7 por el calcitriol que observamos en las células CaSki. Sin embargo, hacen falta más experimentos para conocer más de este interesante resultado.

Por otro lado, IHH es uno de los ligandos que activan la vía Hh. La proteína IHH se sintetiza como un zimógeno que produce varias isoformas después de su procesamiento proteolítico. El fragmento que contiene el extremo amino participa en la señalización de la vía Hh, particularmente en la formación del hueso (48). La proteína IHH se ha encontrado altamente expresada en células de cáncer de mama (49), de páncreas (50) y de colon (51). Sin embargo, el gen IHH así como los otros ligandos Hh muestra una regulación compleja porque puede activar la vía Hh de la propia célula que los produce (regulación autocrina) o encender la vía Hh de células vecinas (regulación paracrina). Dado que en el cáncer cervicouterino se expresan abundantemente los componentes Hh incluyendo a IHH (19, 23), la disminución en la acumulación observada en nuestro estudio por el calcitriol sobre el RNAm de IHH en las células CaSki merece ser estudiada con más detalle.

En relación a los probables mecanismos que expliquen nuestros resultados globales, la mayor proporción de genes regulados por el calcitriol son debidos a una mayor tasa de transcripción (29), tal y como ocurrió en el gen CYP24A1 en las tres líneas celulares de cérvix (figuras 8, 11 y 14). La inducción observada sobre el gen CYP24A1 es debida a la cooperación funcional de dos elementos de respuesta al calcitriol que se encuentran en la región promotora del gen CYP24A1 encargado del catabolismo del calcitriol (52). La respuesta del gen CYP24A1 al estímulo con calcitriol se considera una prueba de que una célula contiene un VDR funcional (33, 53) y que entonces esa célula puede ser utilizada para la investigación de procesos calcitriol-regulados. Por otro lado, el calcitriol también puede funcionar como un represor de la expresión de genes (29). En casos así, las regiones promotoras de los genes contienen elementos de respuesta negativos para el calcitriol que reclutan al VDR activado y algunos correpresores transcripcionales. Un mecanismo inhibitorio de este tipo es el responsable de la represión del canal de potasio oncogénico éter α -go-go-1 mediado por el calcitriol en células de cáncer cervical (34). Estos mecanismos inhibitorios involucran el reclutamiento de comoduladores transcripcionales con actividad de acetilasas de histonas que mantienen enrollada la cromatina, evitando con ello la transcripción. Es probable que un mecanismo así

pueda ser responsable de la disminución de la acumulación de RNAm de los genes KIF7 e IHH por el calcitriol, lo cual requiere ser investigado en el futuro.

Otros transcritos de genes que también fueron disminuidos por el calcitriol en nuestro estudio fueron GLI2 y GLI3. Tanto GLI2 como GLI3 son factores de transcripción que tienen funciones activadoras y represoras de la transcripción dependiendo de su procesamiento proteolítico (54). Sin embargo, ambos factores de transcripción son considerados oncogénicos y se encuentran altamente expresados en diversos tumores humanos (14). Previamente se describió que el calcitriol reprime al gen GLI2 en modelos de cáncer de riñón (41). Con respecto a GLI3, no se ha descrito que el calcitriol regule su expresión. Cabe destacar que las proteínas GLI se utilizan para estudiar los efectos de diversos factores sobre la actividad de toda la vía Hh, independientemente del efecto directo que pudiera tener el calcitriol sobre la expresión de estos factores de transcripción. Este escenario es plausible puesto que el calcitriol es regulador transcripcional de muchos factores de transcripción. Dos ejemplos de factores de transcripción implicados en el cáncer y que son regulados por el calcitriol son myc (55) y el factor inducible por la hipoxia HIF (56).

Merece destacarse el hecho de que en nuestro estudio no observamos un patrón de regulación que se mantuviera en las tres líneas celulares, lo cual puede ser debido a que hicieron falta estudios para encontrar las condiciones en las cuales el calcitriol mostrara su efecto represor sobre toda la vía Hh. También puede ser que la vía Hh sea regulada de manera diferente en cada línea celular.

En resumen, la vía Hh es una vía de señalización importante que se encuentra activa en el cáncer cervicouterino y que tiene varios componentes en los cuales el calcitriol disminuyó modesta pero significativamente la acumulación de sus transcritos. Esto es una motivación para redoblar esfuerzos en estudios adicionales que consideren esta vía de señalización como blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer cervicouterino.

9. Conclusiones

Los transcritos de los componentes de la vía Hh se expresaron en las células CaSki, SiHa y HeLa de cáncer cervical.

En las células CaSki, el calcitriol disminuyó significativamente la acumulación del RNAm de KIF7 y GLI3 pero no tuvo efecto sobre los demás transcritos de los componentes de la vía Hh.

En las células SiHa, el calcitriol disminuyó significativamente la acumulación del RNAm de IHH y GLI2 pero no tuvo efecto sobre los demás transcritos de los componentes de la vía Hh.

10. Bibliografía

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
2. Berman TA, Schiller JT. Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: One cause, two diseases. *Cancer.* 2017;123(12):2219-29.
3. Prati B, Marangoni B, Boccardo E. Human papillomavirus and genome instability: from productive infection to cancer. *Clinics (Sao Paulo).* 2018;73(suppl 1):e539s.
4. Andersson S, Rylander E, Larsson B, Strand A, Silfversvard C, Wilander E. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. *Eur J Cancer.* 2001;37(2):246-50.
5. Li H, Wu X, Cheng X. Advances in diagnosis and treatment of metastatic cervical cancer. *J Gynecol Oncol.* 2016;27(4):e43.
6. Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. Cervical cancer. *Lancet.* 2019;393(10167):169-82.
7. Canfell K. Towards the global elimination of cervical cancer. *Papillomavirus Res.* 2019;8:100170.
8. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* 1980;287(5785):795-801.
9. Ohba S. Hedgehog Signaling in Skeletal Development: Roles of Indian Hedgehog and the Mode of Its Action. *Int J Mol Sci.* 2020;21(18).
10. Sun X, Are A, Annusver K, Sivan U, Jacob T, Dalessandri T, et al. Coordinated hedgehog signaling induces new hair follicles in adult skin. *Elife.* 2020;9.
11. Qi X, Friedberg L, De Bose-Boyd R, Long T, Li X. Sterols in an intramolecular channel of Smoothed mediate Hedgehog signaling. *Nat Chem Biol.* 2020;16(12):1368-75.
12. Zhang J, Liu Z, Jia J. Mechanisms of Smoothed Regulation in Hedgehog Signaling. *Cells.* 2021;10(8).

13. Carballo GB, Honorato JR, de Lopes GPF, Spohr T. A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Commun Signal*. 2018;16(1):11.
14. Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci*. 2018;18(1):8-20.
15. Carpenter RL, Ray H. Safety and Tolerability of Sonic Hedgehog Pathway Inhibitors in Cancer. *Drug Saf*. 2019;42(2):263-79.
16. Chai F, Zhou J, Chen C, Xie S, Chen X, Su P, et al. The Hedgehog inhibitor cyclopamine antagonizes chemoresistance of breast cancer cells. *Onco Targets Ther*. 2013;6:1643-7.
17. Stanton BZ, Peng LF, Maloof N, Nakai K, Wang X, Duffner JL, et al. A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells. *Nat Chem Biol*. 2009;5(3):154-6.
18. Harada K, Ohashi R, Naito K, Kanki K. Hedgehog Signal Inhibitor GANT61 Inhibits the Malignant Behavior of Undifferentiated Hepatocellular Carcinoma Cells by Targeting Non-Canonical GLI Signaling. *Int J Mol Sci*. 2020;21(9).
19. Samarzija I, Beard P. Hedgehog pathway regulators influence cervical cancer cell proliferation, survival and migration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;425(1):64-9.
20. Sharma A, De R, Javed S, Srinivasan R, Pal A, Bhattacharyya S. Sonic hedgehog pathway activation regulates cervical cancer stem cell characteristics during epithelial to mesenchymal transition. *J Cell Physiol*. 2019.
21. Liu C, Wang R. The Roles of Hedgehog Signaling Pathway in Radioresistance of Cervical Cancer. *Dose Response*. 2019;17(4):1559325819885293.
22. Garcia N, Ulin M, Al-Hendy A, Yang Q. The Role of Hedgehog Pathway in Female Cancers. *J Cancer Sci Clin Ther*. 2020;4(4):487-98.
23. Chaudary N, Pintilie M, Hedley D, Hill RP, Milosevic M, Mackay H. Hedgehog inhibition enhances efficacy of radiation and cisplatin in orthotopic cervical cancer xenografts. *Br J Cancer*. 2017;116(1):50-7.

24. Wu Z, Zou B, Zhang X, Peng X. Eupatilin regulates proliferation and cell cycle of cervical cancer by regulating hedgehog signalling pathway. *Cell Biochem Funct*. 2020;38(4):428-35.
25. Gil A, Plaza-Diaz J, Mesa MD. Vitamin D: Classic and Novel Actions. *Ann Nutr Metab*. 2018;72(2):87-95.
26. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev*. 2016;96(1):365-408.
27. Bikle DD. Vitamin D: Newer Concepts of Its Metabolism and Function at the Basic and Clinical Level. *J Endocr Soc*. 2020;4(2):bvz038.
28. Jenkinson C. The vitamin D metabolome: An update on analysis and function. *Cell Biochem Funct*. 2019;37(6):408-23.
29. Carlberg C, Velleuer E. Vitamin D and the risk for cancer: A molecular analysis. *Biochem Pharmacol*. 2021:114735.
30. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357(3):266-81.
31. Diaz L, Diaz-Munoz M, Garcia-Gaytan AC, Mendez I. Mechanistic Effects of Calcitriol in Cancer Biology. *Nutrients*. 2015;7(6):5020-50.
32. Wang G, Lei L, Zhao X, Zhang J, Zhou M, Nan K. Calcitriol Inhibits Cervical Cancer Cell Proliferation Through Downregulation of HCCR1 Expression. *Oncol Res*. 2014;22(5-6):301-9.
33. Avila E, Garcia-Becerra R, Rodriguez-Rasgado JA, Diaz L, Ordaz-Rosado D, Zugel U, et al. Calcitriol down-regulates human ether a go-go 1 potassium channel expression in cervical cancer cells. *Anticancer Res*. 2010;30(7):2667-72.
34. Cazares-Ordonez V, Gonzalez-Duarte RJ, Diaz L, Ishizawa M, Uno S, Ortiz V, et al. A cis-acting element in the promoter of human ether a go-go 1 potassium channel gene mediates repression by calcitriol in human cervical cancer cells. *Biochem Cell Biol*. 2015;93(1):94-101.
35. Farias LM, Ocana DB, Diaz L, Larrea F, Avila-Chavez E, Cadena A, et al. Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer Res*. 2004;64(19):6996-7001.

36. Hosono S, Matsuo K, Kajiyama H, Hirose K, Suzuki T, Kawase T, et al. Association between dietary calcium and vitamin D intake and cervical carcinogenesis among Japanese women. *Eur J Clin Nutr.* 2010;64(4):400-9.
37. Bijlsma MF, Spek CA, Zivkovic D, van de Water S, Rezaee F, Peppelenbosch MP. Repression of smoothened by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion. *PLoS Biol.* 2006;4(8):e232.
38. Linder B, Weber S, Dittmann K, Adamski J, Hahn H, Uhmman A. A Functional and Putative Physiological Role of Calcitriol in Patched1/Smoothened Interaction. *J Biol Chem.* 2015;290(32):19614-28.
39. Uhmman A, Niemann H, Lammering B, Henkel C, Hess I, Rosenberger A, et al. Calcitriol inhibits hedgehog signaling and induces vitamin d receptor signaling and differentiation in the patched mouse model of embryonal rhabdomyosarcoma. *Sarcoma.* 2012;2012:357040.
40. Bao C, Kramata P, Lee HJ, Suh N. Regulation of Hedgehog Signaling in Cancer by Natural and Dietary Compounds. *Mol Nutr Food Res.* 2018;62(1).
41. Dormoy V, Beraud C, Lindner V, Coquard C, Barthelmebs M, Brasse D, et al. Vitamin D3 triggers antitumor activity through targeting hedgehog signaling in human renal cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 2012;33(11):2084-93.
42. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
43. Traiffort E, Angot E, Ruat M. Sonic Hedgehog signaling in the mammalian brain. *J Neurochem.* 2010;113(3):576-90.
44. Xuan YH, Jung HS, Choi YL, Shin YK, Kim HJ, Kim KH, et al. Enhanced expression of hedgehog signaling molecules in squamous cell carcinoma of uterine cervix and its precursor lesions. *Mod Pathol.* 2006;19(8):1139-47.
45. Wen SY, Lin Y, Yu YQ, Cao SJ, Zhang R, Yang XM, et al. miR-506 acts as a tumor suppressor by directly targeting the hedgehog pathway transcription factor Gli3 in human cervical cancer. *Oncogene.* 2015;34(6):717-25.

46. Tang JY, Xiao TZ, Oda Y, Chang KS, Shpall E, Wu A, et al. Vitamin D3 inhibits hedgehog signaling and proliferation in murine Basal cell carcinomas. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4(5):744-51.
47. Liem KF, Jr., He M, Ocbina PJ, Anderson KV. Mouse Kif7/Costal2 is a cilia-associated protein that regulates Sonic hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(32):13377-82.
48. Yang J, Andre P, Ye L, Yang YZ. The Hedgehog signalling pathway in bone formation. *Int J Oral Sci*. 2015;7(2):73-9.
49. Xuan Y, Lin Z. Expression of Indian Hedgehog signaling molecules in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009;135(2):235-40.
50. Kayed H, Kleeff J, Keleg S, Guo J, Ketterer K, Berberat PO, et al. Indian hedgehog signaling pathway: expression and regulation in pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2004;110(5):668-76.
51. Varnat F, Duquet A, Malerba M, Zbinden M, Mas C, Gervaz P, et al. Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med*. 2009;1(6-7):338-51.
52. Chen KS, DeLuca HF. Cloning of the human 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1263(1):1-9.
53. Gonzalez-Duarte RJ, Cazares-Ordonez V, Romero-Cordoba S, Diaz L, Ortiz V, Freyre-Gonzalez JA, et al. Calcitriol increases Dicer expression and modifies the microRNAs signature in SiHa cervical cancer cells. *Biochem Cell Biol*. 2015;93(4):376-84.
54. Haycraft CJ, Banizs B, Aydin-Son Y, Zhang Q, Michaud EJ, Yoder BK. Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet*. 2005;1(4):e53.
55. Salehi-Tabar R, Nguyen-Yamamoto L, Tavera-Mendoza LE, Quail T, Dimitrov V, An BS, et al. Vitamin D receptor as a master regulator of the c-MYC/MXD1 network. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(46):18827-32.

56. Ben-Shoshan M, Amir S, Dang DT, Dang LH, Weisman Y, Mabeesh NJ. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol) inhibits hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway in human cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(4):1433-9.