



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**EFFECTO ANTITUMORAL DEL CALCITRIOL EN COMBINACIÓN  
CON EL TGF- $\beta$ 1 EN LAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE  
PRÓSTATA PC-3 Y DU 145**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. GARCÍA OLIVARES MITZI**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DAVID BARRERA HERNÁNDEZ**  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICION SALVADOR ZUBIRÁN

**COMITÉ TUTOR: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

**DRA. ELIZABETH ORTIZ SÁNCHEZ**  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**EFFECTO ANTITUMORAL DEL CALCITRIOL EN COMBINACIÓN  
CON EL TGF- $\beta$ 1 EN LAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE  
PRÓSTATA PC-3 Y DU 145**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. GARCÍA OLIVARES MITZI**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DAVID BARRERA HERNÁNDEZ**  
**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICION SALVADOR ZUBIRÁN**

**COMITÉ TUTOR: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM**

**DRA. ELIZABETH ORTIZ SÁNCHEZ**  
**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2022**



**COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**OFICIO CPCB/837/2022**

**ASUNTO: Oficio de Jurado**

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
**Directora General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **1 de agosto de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **GARCÍA OLIVARES MITZI** con número de cuenta **307128607** con la tesis titulada **“EFECTO ANTITUMORAL DEL CALCITRIOL EN COMBINACIÓN CON EL TGF-  $\beta$ 1 EN LAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE PRÓSTATA PC- 3 Y DU 145”**, realizada bajo la dirección del **DR. DAVID BARRERA HERNÁNDEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA  
Vocal: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA  
Vocal: DR. HUGO LÓPEZ MUÑOZ  
Vocal: DRA. DIANA BARRERA OVIEDO  
Secretario: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN

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

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 13 de septiembre de 2022

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.**, institución de excelencia académica en la que fui aceptada para cursar mis estudios de doctorado.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca, otorgada durante mis estudios de Doctorado, con número de becario 587887 y por el apoyo económico con número de registro CB-2016/282770, otorgado como sustento a la investigación

**A los miembros del Comité Tutor:**

A mi tutor principal, **Dr. David Barrera Hernández**, y a los miembros del comité tutor, **Dr. Luis Arturo Baiza Gutman** y **Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez** por su valiosa dirección y sus comentarios atinados en la revisión y mejora de este escrito, con lo que me permitieron mejorar en mi formación profesional y calidad de trabajo.

## *AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL*

*A mis papás Herminia Olivares y Javier García, por su apoyo, amor, palabras de aliento y confianza que siempre me han brindado a lo largo de mi carrera académica y personal. Por enseñarme y animarme a nunca rendirme. ¡Son los mejores!*

*A Itzel Atyael, por su honestidad, compañía, cariño, risas y aventuras durante este trayecto escolar y personal.*

*A Aldo Guadarrama, por su amor, cariño, consejos y paciencia que me trajeron paz y tranquilidad en el segundo tramo del Doctorado.*

*A mis amigas del Laboratorio de Biología de la Reproducción, (Catalina Castro, Andrea Olmos, Nancy Noyola, Mariana Segovia, Isela Martínez, Gabby Hernández, Sofía López y Ana Gómez) por siempre estar en la disposición de ayudarme y aconsejarme en los momentos de duda. Por su compañía y amistad que me hicieron más llevadera mi estadía en el laboratorio.*

*A mis amigos, Karla Hernández, Lizeth Urbina, Brayan Barroso, Ale Rojas, Anahí Flores y Alberto M, por su amistad, sus consejos y su cariño que en conjunto siempre me han regresado el ánimo, la motivación y lograr ver la luz al final del túnel.*

*Agradezco enormemente al Dr. David Barrera, a la Dra. Elizabeth Ortiz y al Dr. Luis Baiza por su apoyo, comentarios acertados, ánimos y jaladas de orejas que de pronto necesitaba para sacar el proyecto. Por darme la oportunidad de trabajar con ellos, de compartirme sus conocimientos y sobre todo su tiempo. Por su paciencia y dedicación gracias.*

*Agradezco a la Dra. Sandra Romero por su apoyo y valiosas contribuciones para la realización de este proyecto.*

*Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán” (INCMNSZ), Departamento de Biología de la Reproducción “Dr. Carlos Gual Castro”, lugar donde realice los ensayos experimentales de mi tesis y a los Comité de Ética y Comité de Investigación de este Instituto, por la revisión y aprobación del protocolo experimental con número de registro CONBIOÉTICA-09-CEI-011-20160627, REF. 3520.*

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

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. ABSTRACT</b> .....	3
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
3.1 Cáncer de próstata.....	5
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	7
4.1 Objetivos particulares.....	7
<b>5. ANTECEDENTES</b> .....	8
5.1 Factor de Crecimiento Transformante beta 1; TGF- $\beta$ 1.....	8
5.1.1 TGF- $\beta$ 1 y el crecimiento celular.....	8
5.1.2 Invasión y TGF- $\beta$ 1.....	10
5.1.3 Transición epitelio mesénquima, TGF- $\beta$ 1 y Cáncer de Próstata.....	11
5.2 Calcitriol.....	12
5.2.1 Inhibición del CP por el calcitriol.....	13
5.2.2 Metabolismo y modo de acción del calcitriol.....	14
5.2.3 Calcitriol, invasión y migración.....	15
5.2.4 Calcitriol y TGF- $\beta$ 1.....	15
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	17
6.1 Cultivo celular.....	17
6.2 Ensayos de crecimiento celular.....	17
6.3 Ensayos de apoptosis.....	19
6.4 Extracción de RNA.....	19
6.4.1 Procesamiento de los microarreglos.....	20
6.4.2 Análisis de datos de los microarreglos y análisis de vías.....	21
6.5 Estudios de expresión génica.....	21
6.5.1 Obtención de DNA complementario.....	22
6.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	22
6.6 Ensayo de expresión de proteínas por western blot.....	24
6.7 Ensayo de ELISA.....	24
6.7.1 Cuantificación de la secreción de la MMP-2 y de la MM-9.....	24

6.7.2 Cuantificación de la secreción de la hCG- $\beta$ .....	25
6.8 Ensayo de cierre de herida.....	26
6.9 Análisis estadístico.....	27
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
7.1 Efecto del calcitriol, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y su combinación sobre el crecimiento de las células PC-3 y DU 145.....	28
7.2 Efecto del calcitriol, los TGF- $\beta$ s y su combinación sobre la apoptosis en las líneas celulares PC-3 y DU145.....	30
7.3 Evaluación del transcriptoma de la línea celular PC-3 por microarreglo en ausencia y presencia del calcitriol, TGF- $\beta$ 1 y su combinación .....	31
7.4 Validación del microarreglo mediante la expresión génica de <i>CYP24A1</i> , <i>IGFBP3</i> , <i>CCNA1</i> y <i>CDKN1A</i> por qPCR.....	34
7.5 Expresión análoga y discordante de genes regulados.....	38
7.6 Análisis de enriquecimiento de vías derivados de los genes modulados por los tratamientos.....	39
7.7 Panorama de enriquecimiento de genes específicos alterados por los tratamientos.....	43
7.8 Efectos de los tratamientos sobre la expresión génica de las MMPs.....	45
7.9 Efecto del calcitriol sobre la secreción de MMP-2 y MMP-9.....	46
7.10 Efectos del TGF- $\beta$ 1 y su combinación con calcitriol sobre la hCG $\beta$ ....	47
7.11 Ensayo de Cierre de herida.....	48
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>49</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>55</b>
<b>11. ANEXO: ARTÍCULO REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO.....</b>	<b>64</b>

## 1. RESUMEN

El calcitriol y el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1) son moléculas que están involucradas en varios procesos biológicos, como la proliferación, diferenciación, migración e invasión celular. Sus efectos pueden ser similares u opuestos dependiendo del tipo y contexto celular. En el cáncer de próstata, existe evidencia de los efectos antitumorales del calcitriol y datos controversiales en relación con el TGF- $\beta$  en su regulación. De hecho, se ha asociado la deficiencia del calcitriol y la alteración de la vía de señalización del TGF- $\beta$  con el desarrollo de esta enfermedad. A la fecha, existe información limitada sobre los efectos del calcitriol y el TGF- $\beta$  en combinación. Por lo cual, en este estudio usando las líneas celulares de cáncer de próstata PC-3 y DU 145, analizamos los efectos del calcitriol y el TGF- $\beta$ 1 solos y en combinación sobre el crecimiento de la población celular por la técnica de sulforodamina B, la migración por cierre de herida, la apoptosis por citometría de flujo, los cambios en la expresión génica por microarreglos y qPCR, así como la proteína por Western blot y ELISAs. Además, se validaron los resultados de blancos moleculares relacionados con la evolución de este tipo de cáncer. En ambas líneas celulares de cáncer de próstata tanto el calcitriol como el TGF- $\beta$ 1 disminuyen la proliferación celular, siendo mayor el efecto en combinación. Los ensayos de citometría mostraron que la apoptosis celular no se modificó significativamente entre los diferentes esquemas de tratamiento. Con la finalidad de estudiar la regulación genómica por los tratamientos, usando las células PC-3, identificamos por microarreglo y análisis bioinformático la expresión diferencial de genes, los cuales determinaron distintos paisajes transcripcionales en cada esquema de tratamiento, encontrando un mayor número de genes diferencialmente expresados por el co-tratamiento, seguido por TGF- $\beta$ 1 y calcitriol, respectivamente. Entre los genes regulados al alta por el co-tratamiento están *CYP24A1*, *IGFBP3*, *CDKN1A*, *NOX4* y *UBE2D3* mientras que *CCNA1*, los miembros de la familia *CT45A* y *APOBEC3*, entre otros, se regularon a la baja. Estos genes están relacionados con la carcinogénesis y por lo tanto fueron elegidos para su estudio y validación. Mediante firmas públicas de ARN, se correlacionó que la inhibición de la proliferación obtenida en experimentos *in vitro* está ligada al ciclo celular. Con estos resultados, se estableció una asociación de los genes modulados por el tratamiento

combinatorio con el potencial impacto clínico utilizando datos de cáncer de próstata de referencia.

Adicionalmente, determinamos que el TGF $\beta$ -1 tiene un efecto dual en las líneas PC-3 y DU145 ya que, aunque inhibe su proliferación, induce su migración celular y marcadores de invasión como la gonadotropina coriónica humana (hCG) y las metaloproteinasas (MMP)-2 y -9 de matriz. De manera interesante, el calcitriol inhibió la migración celular inducida por el TGF- $\beta$ 1 y bloqueo tanto el estímulo de este factor sobre la expresión génica de estos marcadores, como la secreción de la MMP-9 y la hCG $\beta$ .

En conclusión, este trabajo corroboró los efectos antitumorales del calcitriol y que sus acciones combinadas con el TGF- $\beta$ 1 podrían crear sinergias para mejorar sus efectos individuales sobre la proliferación celular. Además, mostró que calcitriol es un regulador de las acciones de TGF- $\beta$ 1 sobre la migración y la invasión celular de las líneas celulares de cáncer de próstata PC-3 y DU145, logrando en conjunto, reprogramar la señalización del cáncer de próstata. Por lo anterior, se sugiere que la suplementación con vitamina D puede mediar sus efectos antineoplásicos al modular la señalización de este factor de crecimiento para prevenir el desarrollo de cáncer de próstata o disminuir la gravedad de esta malignidad.



## 2. ABSTRACT

Calcitriol and transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) are involved in several biological processes, such as cell proliferation, differentiation, migration, and invasion. Their cellular effects may be similar or opposite depending on the cell type and context. In prostate cancer, there is evidence of the antitumor effects of calcitriol and controversial data on the action of TGF- $\beta$ . In fact, calcitriol deficiency and alteration of the TGF- $\beta$  signaling pathway have been associated with the development of this disease. To date, there is limited information on the effects of calcitriol and TGF- $\beta$ 1 in combination. Therefore, in this study using the prostate cancer cell lines PC-3 and DU 145, we analyzed the effects of calcitriol and TGF- $\beta$ 1 alone and in combination on cell growth by the sulforhodamine B technique, migration by wound-healing assay and apoptosis by flow cytometry. Additionally, the results of molecular targets related to the evolution of this type of cancer were validated. Both calcitriol and TGF- $\beta$ 1 decrease cell proliferation on prostate cancer cell lines, whereas co-incubation resulted in the most significant inhibition of cell growth in comparison to what observed with each independent treatment. Cytometry assays showed that cell apoptosis was not significantly increased by the different treatment schemes.

In order to study the genomic regulation by the treatments, we use high-throughput microarray profiling of PC-3 cells upon independent and combinatory treatments, we identified distinct transcriptional landscapes of each intervention, with a higher effect established by the combinatorial treatment, following by TGF- $\beta$ 1 and later by calcitriol. Among the genes upregulated by co-treatment are *CYP24A1*, *IGFBP3*, *CDKN1A*, *NOX4*, and *UBE2D3* while *CCNA1*, members of the *CT45A* family, and *APOBEC3*, among others, were downregulated. These genes are related to carcinogenesis and therefore were chosen for study and validation. We applied public RNA signatures on our whole-transcriptomic analysis, it was correlated that the inhibition of proliferation obtained in *in vitro* experiments was linked to the cell cycle. With these results, an association of genes modulated by combinatorial treatment with potential clinical impact was established using baseline prostate cancer data.

Additionally, we determined that TGF $\beta$ -1 has a dual effect on the PC-3 and DU145 lines since, although it inhibits their proliferation, it induces cell migration and invasion markers such as human chorionic gonadotropin (hCG) and metalloproteinases (MMP). -2 and -9. Interestingly, calcitriol inhibited cell migration induced by TGF- $\beta$ 1 and blocked both the stimulation of this factor on the gene expression of these markers and the secretion of MMP-9 and hCG $\beta$ .

In conclusion, this work corroborated the antitumor effects of calcitriol and that its actions combined with TGF- $\beta$ 1 could create synergies to improve their individual effects on cell proliferation. In addition, it was shown that calcitriol is a regulator of the actions of TGF- $\beta$ 1 on cell migration and invasion of the prostate cancer cell lines PC-3 and DU145, together achieving reprogramming of prostate cancer signaling. Therefore, vitamin D supplementation can mediate its antineoplastic effects modulating TGF- $\beta$ 1 signaling to prevent the development of prostate cancer or reduce the severity of this malignancy.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Cáncer de próstata (CP)

El cáncer de próstata (CP) es una patología de etiología multifactorial, caracterizada por heterogeneidad génica y fenotípica. De acuerdo con la organización mundial de la salud, el CP ocupa el segundo lugar de incidencia y el sexto en mortalidad entre la población masculina entre 65 y 72 años a nivel mundial [1]. En el caso particular de México, el CP representa el primer lugar tanto en incidencia como mortalidad [2].

El CP se origina cuando las células de la próstata comienzan a crecer fuera de control. Siendo entre otros factores, la activación del receptor de andrógenos (AR; por sus siglas en inglés: androgen receptor) un factor implicado en el desarrollo de esta enfermedad. Los andrógenos pertenecen al grupo de hormonas esteroides sexuales masculinas, los cuales se unen al AR para llevar a cabo sus efectos tales como el crecimiento, diferenciación y supervivencia de las células epiteliales, manteniendo la estructura y función de la próstata. Sin embargo, cuando hay un desequilibrio en la regulación normal por andrógenos, se puede ocasionar hiperplasia prostática benigna y/o CP. De hecho, el 90% de los cánceres de próstata son adenocarcinomas que requieren la presencia de andrógenos para su desarrollo y progresión [3].

Entre las medidas terapéuticas para tratar al CP se encuentra la terapia de privación de andrógenos (ADT por sus siglas en inglés, androgen deprivation therapy), la cual resulta conveniente para aquellos pacientes que presentan CP avanzado, metastásico o de recurrencia después de algún tratamiento [4]. En general, la ADT implica castración quirúrgica o farmacológica (agonista o antagonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante y antiandrógenos) para reducir los niveles de andrógenos séricos como la 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 dependiente de la estimulación androgénica [5]. Sin embargo, en muchos casos a pesar de disminuir la testosterona circulante, el tumor sigue siendo dependiente vía la activación del AR [6].

Debido a la heterogeneidad de las células tumorales, muchos pacientes que inicialmente responden a la ADT desarrollan resistencia al tratamiento y sufren una enfermedad con alta morbilidad denominada CP resistente a la castración (CRPC por sus siglas en inglés: castration resistant prostate cancer) [7]. Dicha transformación favorece su actividad proliferativa e invasiva conduciendo a un fenotipo más agresivo, transición que tiene como características el aumento de la concentración del antígeno prostático específico (dos mediciones consecutivas en un periodo de 1 a 3 semanas), el surgimiento de lesiones en hueso y de nuevos tumores [6, 7] para la cual existen pocas opciones terapéuticas [8, 9].

Por lo anterior, investigaciones que exploren las múltiples vías de activación celular y su regulación en el cáncer son de gran relevancia para proponer nuevas estrategias como posibles potenciadores quimioterapéuticos que prevengan, retrasen o aminoren el desarrollo de esta enfermedad. Dentro de las moléculas de interés, en esta tesis, nos enfocamos en los efectos del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ; por sus siglas en inglés: transforming growth factor beta) y de la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D (calcitriol; forma hormonal activa de la vitamina D), dos moléculas químicamente no relacionadas que se han propuesto como mediadores en el desarrollo del CP.

## **4. OBJETIVO**

Evaluar el efecto del calcitriol en combinación con el TGF- $\beta$ 1 sobre la proliferación y migración celular en las líneas celulares de cáncer de próstata PC-3 y DU 145.

### **4.1 Objetivos particulares**

1. Evaluar el efecto del calcitriol en combinación con el TGF- $\beta$ 1 sobre el crecimiento celular de las células DU 145.
2. Estudiar el efecto del calcitriol, TGF- $\beta$ 1 y su combinación sobre la apoptosis de las líneas celulares PC-3 y DU 145.
3. Evaluar el efecto del calcitriol, TGF- $\beta$ 1 y su combinación sobre el perfil transcripcional de las células PC-3.
4. Analizar la expresión génica y proteica de los inhibidores de ciclinas CDKN2A y CDKN1A en ausencia y presencia de los tratamientos.
5. Evaluar el efecto del calcitriol en combinación con el TGF- $\beta$ 1 sobre la expresión génica y proteica de las MMPs -2 y -9.
6. Estudiar el efecto del calcitriol con el TGF- $\beta$ 1 sobre la invasión celular de las líneas celulares PC-3 y DU-145.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1 Factor de Crecimiento Transformante beta 1; TGF- $\beta$ 1

La próstata es un sitio de producción continua de varios componentes de la eyaculación, así como del TGF- $\beta$  [10]. La superfamilia del TGF- $\beta$  incluye un amplio grupo de sustancias: entre ellos: los TGF- $\beta$ s (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3), las proteínas morfogénicas de hueso, los factores de diferenciación de crecimiento, las activinas, las inhibinas y el factor inhibitorio Mülleriano. Cada miembro regula procesos biológicos como el desarrollo embrionario, la diferenciación de células madre, la regulación inmune, la cicatrización de heridas, la inflamación y el crecimiento celular, entre otros [11, 12].

La señalización del TGF- $\beta$  se da a través de su interacción con los receptores cinasas de serina treonina transmembranales tipo I y II (T $\beta$ RI y T $\beta$ RII), los cuales forman un complejo heterotetramérico que fosforila a las proteínas mediadoras llamadas Smad2 y Smad3 que se unen a su vez con el transductor de señalización, Smad4. Una vez activadas, el complejo proteico (Smad2, Smad3 y Smad 4) se transloca al núcleo donde regula la transcripción de genes blanco [13].

La regulación de la carcinogénesis por los TGF- $\beta$ s es compleja; ya que se ha reportado que estos tienen actividades supresoras y promotoras de tumores dependiendo del tipo y contexto celular [14]. Las actividades supresoras de tumores del TGF- $\beta$  predominan en los tejidos normales y en etapas tempranas del cáncer, mientras que en estados avanzados promueve eventos oncogénicos como la migración, la invasión y la transición epitelio mesénquima (EMT; por sus siglas en inglés epitelial mesenchymal transition) [15, 16].

#### 5.1.1 TGF- $\beta$ y el crecimiento celular

Considerando que el efecto del TGF- $\beta$  depende de la presencia de sus receptores en los diferentes tipos celulares, en el CP el TGF- $\beta$  no tiene efecto en células que no expresan el receptor T $\beta$ RII, como es el caso de la línea celular de cáncer de próstata LNCaP [17]. Además, en otros estudios la pérdida o reducción en la expresión del T $\beta$ RI y del T $\beta$ RII en

tumores primarios de próstata se le ha asociado como un marcador de mal pronóstico [18-21].

En contraste, en las células que expresan los receptores T $\beta$ RI y T $\beta$ RII, el TGF- $\beta$  inhibe la proliferación como en las células normales de próstata derivadas de cultivo primario y líneas celulares como la RWPE-1 [22-24] e incluso células tipo CRPC [24-26]. Sin embargo, en este último fenotipo existen datos controversiales del efecto antiproliferativo del TGF- $\beta$  [24, 27]. Las diferencias en los resultados obtenidos por los diferentes grupos pueden deberse a los tiempos de incubación empleados, así como a las concentraciones del TGF- $\beta$ 1 utilizadas, ya que dependiendo de las concentraciones utilizadas del TGF- $\beta$  en los cultivos celulares, este factor puede tener efectos estimulantes o inhibitorios de la proliferación [28].

Entre los mecanismos que median la proliferación celular, se encuentra la regulación del ciclo celular, un proceso que es regulado positivamente por las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDKs por su siglas en inglés cyclin-dependent kinases), las cuales pertenecen a una gran familia de cinasas de serinas y treoninas que son activadas cuando se unen a sus proteínas reguladoras llamadas ciclinas [29]. La interacción ciclinas/CDKs permite el paso a través de las diferentes fases del ciclo celular [30]. Las CDKs pueden ser reguladas negativamente por los CDKI (CDKI por sus siglas en inglés: cyclin-dependent kinases inhibitory), de los cuales se conocen dos familias: la familia INK4 (p15, p16, p18 y p19) y la familia Cip/Kip (p21, p27 y p57). Mientras que miembros de la familia INK4 interactúan principalmente con la forma monomérica de la cinasa, los de la familia Cip/Kip se unen al complejo ciclina-CDK, inhibiendo así, el ciclo celular [31].

La expresión de este grupo de proteínas es controlada por diferentes factores de crecimiento incluido el TGF- $\beta$ . Así, el TGF- $\beta$  regula positivamente a los CDKIs p15, p21, p27 y a la CDK2, con la subsecuente supresión de c-Myc arrojando el ciclo celular en la fase G1 [32], en epitelios normales de próstata [33-35] y en líneas celulares de tipo CRPC [36]. Este evento es mediado por la activación de la vía canónica de señalización dependiente de las Smads [37].

Estos datos coinciden con los resultados observados tras la transfección del T $\beta$ RII en la línea LNCaP, donde el TGF- $\beta$  estimuló la expresión de p21, p27 y p57 e indujo el arresto del ciclo celular en la fase G1 [34]. Sin embargo, debido a la existencia de datos

controversiales en la literatura hace falta estudios adicionales que evalúen la expresión y activación de estas proteínas *in vitro* e *in vivo* utilizando modelos animales para su estudio.

### 5.1.2 Invasión y TGF- $\beta$

La invasión implica la degradación de la membrana basal por las células tumorales. Esta membrana es una estructura de la matriz extracelular (ECM; por sus siglas en inglés extracellular matrix), sobre la cual, las células epiteliales proliferan y se diferencian, siendo un marcador histológico que indica que el carcinoma ha adquirido propiedades invasivas [38]. Entre las moléculas que se encargan de la proteólisis de la membrana basal y la ECM se menciona a las metaloproteinasas de matriz (MMPs; por sus siglas en inglés matrix metalloproteinases) cuya producción exacerbada está implicada en la progresión del cáncer [39-41].

Las MMPs son endopeptidasas dependientes de zinc o calcio que degradan principalmente colágeno, elastina, laminina, fibronectina y proteoglucanos, y están involucrados en facilitar la invasión para que las células tumorales pueden diseminarse a través de los vasos y torrente sanguíneos para formar nuevos tumores en tejidos distantes de los que les dieron origen (metástasis) [42, 43].

Aunque existen varias clases de MMPs, la mayoría de los estudios se llevaron a cabo sobre la MMP -2 y MM-9 debido a su alta expresión y actividad en pacientes con CP y principalmente su asociación con metástasis [43, 44]. En particular, en tejidos derivados de pacientes con CP, la MMP-9 se encuentra altamente expresada y está asociada a un alto índice de Gleason (GS 8–10), indicador de agresividad del CP [45, 46]. De forma interesante, el TGF- $\beta$ 1 y el TGF- $\beta$ 2 promueven la expresión, secreción y actividad de la MMP-2 y la MMP-9 en diferentes líneas celulares de CP [26, 40, 47-49] lo que indica que estos factores favorecen el proceso de migración e invasión celular.

Se ha observado que su expresión es regulada positivamente por la unión de la cinasa PBK (por sus siglas en inglés: PDZ-binding kinase (PBK) o T-LAK cell-originated protein kinase (TOPK)) a los promotores de la MMP-2 y la MMP-9 en CP vía la activación de  $\beta$ -catenina [50].



Otra molécula relacionada con migración inducida por el TGF- $\beta$ 1 es la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG por sus siglas en inglés; human chorionic gonadotropin) [51]. La hCG es una molécula heterodimérica con subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , secretada principalmente por las células trofoblásticas durante el embarazo [52]. Sin embargo, se ha observado un aumento de los niveles de hCG $\beta$  con el desarrollo de varios tipos de cáncer, como el colorrectal, el de ovario, próstata y mama, y se considera de mal pronóstico [52]. De manera adicional, la hCG $\beta$  induce migración e invasión vía la activación de ERK1/2 y la inducción de MMP-2 en células DU-145 [53].

### **5.1.3 Transición epitelio mesénquima, TGF- $\beta$ y CP**

La transición epitelio mesénquima (EMT; por sus siglas en inglés: epithelial mesenchymal transition), es un proceso en el que las células epiteliales polarizadas pierden su organización y uniones intercelulares, reprograman la expresión génica y desarrollan múltiples cambios bioquímicos que las capacitan para adquirir un fenotipo mesenquimal, lo que permite una alta capacidad invasiva, resistencia a eventos apoptóticos y una elevada producción de componentes que degradan la ECM [54].

En particular, durante la progresión del CP, las células epiteliales pueden experimentar una EMT, que se caracteriza por modificaciones morfológicas (cambio de células cuboidales a células alargadas como fibroblastos) y cambios bioquímicos en los marcadores de las células epiteliales como la E-cadherina, las  $\beta$ -cateninas y las ocludinas cuya regulación negativa conduce a la pérdida de la adhesión celular mientras que la regulación positiva de los marcadores de EMT como la vimentina, fibronectina y la N-cadherina, permiten que las células puedan migrar y hacer metástasis [55]. Entre los principales mediadores de la EMT, están el TGF- $\beta$ , el factor de crecimiento epidérmico (EGF) [56, 57] y el factor de crecimiento similar a la insulina [58].

Se ha descrito que la EMT en el CP es regulada a través de diferentes vías de señalización que incluyen la activación de la vía Notch-Hedgehog. En efecto, el silenciamiento del Notch-4 resulta en una disminución de la migración e invasión de las células PC-3 y afecta la expresión de marcadores de la EMT [59].

En particular, el TGF- $\beta$ , activa diferentes vías de señalización y factores de transcripción específicos que están relacionados con la inducción de la EMT. Así, se ha reportado que el TGF- $\beta$  activa la cascada Ras-Raf-MEK1 e induce la expresión de marcadores moleculares como la vimentina, fibronectina y de factores de transcripción como Slug y Twist2 facilitando la invasión y motilidad de células tumorales de próstata [60].

Por otra parte, la fosforilación de c-jun estimulada por el TGF- $\beta$  promueve la expresión de Snail1 [61, 62]. Snail 1, inducido por el TGF- $\beta$ , es capaz de regular negativamente la expresión de HLA-I (HLA-I; por sus siglas en inglés human leukocyte antigen antígeno leucocitario humano clase I) y favorecer la expresión de marcadores de EMT en las líneas celulares DU 145 y PC-3 [63].

Asimismo, el TGF- $\beta$  es capaz de inducir la EMT en las células BPH-1 de hiperplasia benigna de próstata, estos experimentos demostraron que la interacción Snail2 / Slug inducida por el TGF- $\beta$ 1, regula positivamente la expresión de vimentina y la migración celular. Lo anterior sugiere que el factor de transcripción Slug y Snail son relevantes para el inicio de la EMT en este tipo celular [64].

El factor de transcripción Twist, también inducido por el TGF- $\beta$ , promueve la EMT en tejidos de pacientes con CP [27, 56] y con un fenotipo CRPC en las células 22Rv1 [65]. Conjuntamente, se sabe que Twist1 puede interaccionar con otros factores de transcripción como STAT3 y el factor 1-alfa inducible por hipoxia (HIF1 $\alpha$ ; por sus siglas en inglés Hypoxia-inducible factor 1-alpha) promoviendo la invasión y la EMT en células de CP [66]. Por otro lado, la EMT se ha asociado con el desarrollo del CRPC [67].

## **5.2 Calcitriol**

En las últimas dos décadas, diversos estudios sugieren que el calcitriol tiene un papel preventivo y protector contra diferentes tipos de cáncer incluyendo al CP [68]. Los primeros trabajos que proponen de forma indirecta una relación entre el calcitriol y el CP comenzaron con estudios epidemiológicos. Dado que la síntesis de vitamina D es inicialmente inducida por la luz solar en la piel; se planteó una relación inversa entre el nivel de radiación solar asociada con los niveles séricos de vitamina D y la mortalidad por CP [69]. Determinando que la deficiencia del calcidiol (precursor del calcitriol) en un rango < 20 ng/mL, aumenta el riesgo de desarrollar CP hasta 1.6 veces [70]. Sin embargo, otros grupos indicaron que altos

niveles séricos de calcidiol (> 45 ng/ml) aumentan también el riesgo de desarrollar CP [71, 72]. Determinando que mantener un rango óptimo (30-44 ng/ml) de la vitamina D es crucial en la regulación de este tipo de cáncer.

### **5.2.1 Inhibición del CP por el calcitriol**

Trabajos llevados a cabo *in vitro* y en modelos animales han mostrado efectos alentadores del calcitriol en contra del CP. En particular, se ha demostrado el efecto inhibitorio de esta hormona sobre el crecimiento de células normales y malignas de próstata. Por ejemplo, el calcitriol inhibe la proliferación de células normales de próstata (RWPE-1) [73], de cultivo primario de tejido normal prostático [74], así como de las líneas celulares de cáncer de próstata con un fenotipo dependiente de andrógenos o de tipo CRPC (PC-3 y DU 145) [75-77]. Los efectos involucran principalmente el arresto del ciclo celular, la reducción del daño al DNA, la regulación por microRNAs, inducción de apoptosis, supresión de la angiogénesis y migración celular, entre otros [78-82].

Al respecto, el calcitriol vía la activación de su receptor (VDR; por sus siglas en inglés: vitamin D receptor) induce la expresión de p21 en la línea celular de próstata RWPE-1 [73]. Con respecto al CP, el calcitriol disminuye la fosforilación de la proteína de retinoblastoma, induce a p21, disminuye la actividad de la CDK2 y arresta el ciclo celular en la fase G0-G1 en la línea celular LNCaP y PC-3 [75, 83, 84]. Al parecer, la inducción de p21 está regulada por otras moléculas como la proteína transportadora tipo 3 del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-3; por sus siglas en inglés: insulin-like growth factor binding protein-3) ya que tras el tratamiento con calcitriol se presenta un estímulo de la expresión de IGFBP-3 y p21 [85]. El cual, es un camino del calcitriol y del EB1089 (un análogo del calcitriol) para inhibir el crecimiento celular de las células PC-3 [77].

Adicionalmente, el calcitriol inhibe el crecimiento de células normales y tumorales al favorecer la producción del TGF- $\beta$ 1 [86]. En este sentido, el calcitriol y el EB1089 estimulan la secreción del TGF- $\beta$  en líneas celulares de cáncer de mama, colon y próstata [87-90]. Lo anterior se verificó al incubar las células PC-3 y MCF-7 con anticuerpos anti-TGF- $\beta$ , lo cual bloquea el efecto inhibitorio del crecimiento celular estimulado por el calcitriol [25, 89]

Además, el pretratamiento con calcitriol estimula la expresión de los receptores T $\beta$ RI y T $\beta$ RII en las células Caco-2 (resistentes a TGF- $\beta$ ) y PC-3, respectivamente [25, 90].

Aunque el calcitriol, en general, inhibe el crecimiento de las células de CP, la línea celular LNCaP han mostrado ser más sensibles a sus acciones antiproliferativas comparado con las células DU 145 y PC-3 [76]. Esto podría estar relacionado con la diferencia en expresión del VDR y a la constante de disociación con su ligando, ya que LNCaP tienen una mayor abundancia del VDR y una mayor afinidad a su ligando ( $7.5 \times 10^{-11}$  M [LNCaP],  $5.4 \times 10^{-11}$  M [DU 145] y  $6.3 \times 10^{-11}$  M [PC-3]) comparado con las líneas celulares de tipo CRPC [76, 91].

### **5.2.2 Metabolismo y modo de acción del calcitriol**

El metabolismo de la vitamina D ha sido extensivamente estudiado [72]. En él intervienen principalmente el citocromo CYP27B1 que usa como sustrato al calcidiol para hidroxilarlo en el carbono 1 y formar así al calcitriol (metabolito activo de la VD) [92, 93] y el citocromo CYP24A1 que regula la cantidad bioactiva del calcitriol mediante la inactivación y/o la degradación de este secoesteroide [94].

Aunque las células de CP expresan tanto al CYP27B1 como al CYP24A1, su presencia está disminuida e incrementada, respectivamente, en estas células [95, 96], lo que reduciría tanto la biodisponibilidad local del calcitriol como potencialmente los efectos biológicos de esta hormona en este tipo de cáncer.

Por otra parte, las células de CP además de tener los citocromos de la síntesis y degradación del calcitriol, cuenta con el VDR. Un factor de transcripción que tras la unión de su ligando forma un heterodímero obligado con el receptor de retinoides RXR [68, 92, 97, 98]. Este complejo (calcitriol/VDR/RXR) reconoce los elementos de respuesta a vitamina D en regiones promotoras de genes blancos, que ocasiona el reclutamiento de co-activadores o co-represores para estimular o inhibir la expresión génica [92]. Por otro lado, el calcitriol ejerce sus efectos biológicos a través de una vía no genómica que implica la activación de receptores membranales [99, 100]. Una vez que el calcitriol se une a este tipo de receptores, se pueden activar diferentes moléculas de señalización generando la producción de segundos mensajeros ( $\text{Ca}^{2+}$ , AMP cíclico, fosfatidilinositol 3,4,5 trisfosfato), seguida de la activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK por sus siglas en inglés: mitogen-activated protein kinases), entre otros [98, 101].

### 5.2.3 Calcitriol, invasión y migración

El calcitriol inhibe la motilidad y la invasión celular de las líneas celulares de cáncer de próstata humano, LNCaP, PC-3 y DU 145 [102] y al contrario al TGF- $\beta$ , el calcitriol inhibe la expresión de las MMP-2 y -9 (Tabla 1) sugiriendo que por este efecto ejerce supresión de la invasión celular [80, 103, 104]. Datos interesantes que se conjuntan con el hecho de que el calcitriol puede inhibir la actividad de la MMP-2 inducida por el TGF- $\beta$ 1/ $\beta$ 2 en células de cáncer de colon [105].

El calcitriol es un regulador negativo de la EMT ya que induce diferenciación, baja la expresión de marcadores mesenquimales y reduce la invasión y migración celular [106, 107]. Asimismo, el calcitriol es capaz de inducir la E-cadherina en células de CP [78, 108].

### 5.2.4 Calcitriol y TGF- $\beta$

El calcitriol y el TGF- $\beta$  son moléculas que ejercen efectos que en algunas ocasiones suelen ser similares y en otras completamente diferentes. Por ejemplo, se ha observado que ambas moléculas inhiben el crecimiento de las células del CP, sin embargo, con respecto a la invasión celular, el calcitriol la inhibe mientras que el TGF- $\beta$  la estimula.

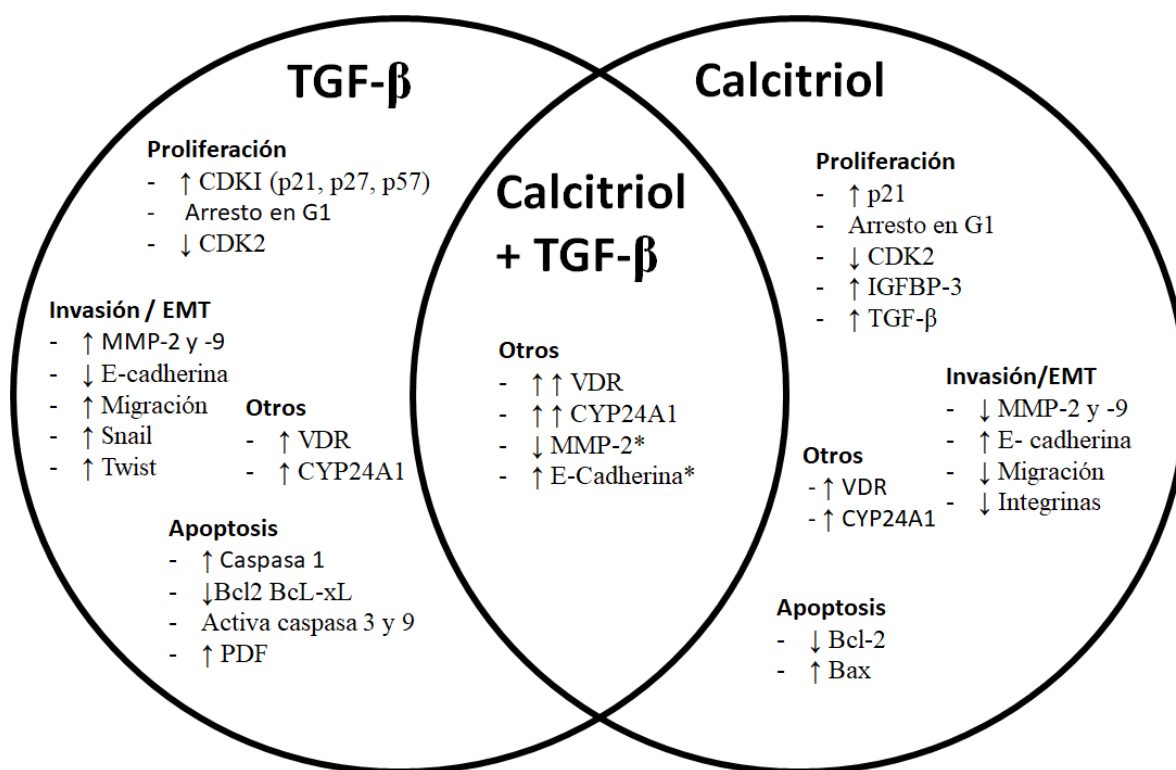
Los efectos del calcitriol y el TGF- $\beta$  de manera independiente han sido mostrado en diversos estudios. No obstante, poco se sabe de la regulación recíproca entre estas dos moléculas. Al respecto, el TGF- $\beta$  puede regular positivamente moléculas implicadas en la señalización y/o metabolismo de calcitriol y viceversa. Por ejemplo, la expresión y actividad del VDR y la expresión de *CYP24A1* es estimulada por el TGF- $\beta$  en las células MeT-5A y WPMY-1. De manera interesante, la expresión del VDR y *CYP24A1* incrementó aún más, cuando las células fueron incubadas con estas dos moléculas [109, 110].

Con respecto al efecto del calcitriol sobre el TGF- $\beta$ , el calcitriol es capaz de inducir la secreción y acumulación del TGF- $\beta$  y la expresión del receptor T $\beta$ RII [25, 86, 90].

De todo lo anterior, se puede plantear la existencia de una regulación cooperativa entre el calcitriol y el TGF- $\beta$  con un fin común. Por ejemplo, la coincubación del calcitriol y TGF- $\beta$  inhibe con mayor eficacia el crecimiento de células de cáncer de colon y próstata comparado con los tratamientos por si solos [90, 109]. Adicionalmente, datos en la literatura han demostrado que el VDR puede interactuar con elementos de la vía de señalización del

TGF- $\beta$ , como es el caso de la interacción y formación del complejo VDR-SMAD3, los cuales, en conjunto podrían sinergizar o antagonizar genes específicos que en determinado momento pudieran mediar la progresión del cáncer [111].

Datos en la literatura nos muestran que el calcitriol modula la producción exacerbada de las MMPs así como la EMT inducidas por el TGF- $\beta$  [110] controlando de esta forma la invasión tumoral, sugiriendo que la suplementación con vitamina D (para alcanzar concentraciones óptimas de calcitriol) en pacientes con esta neoplasia y que cursan con bajas concentraciones de vitamina D, podría ayudar a aminorar o disminuir los efectos adversos de este tipo de cáncer (Fig.1).



**Figura 1.** Regulación de genes en CP por el TGF- $\beta$  y el calcitriol. \* Células bronquiepiteliales.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Cultivo celular

En este estudio se utilizó como modelo biológico a la línea celular de cáncer de próstata humana PC-3 (CRL-1435™) y DU 145 (HTB-81) con bajo número de pases (5-10 pases). Las células PC-3 y DU145 fueron obtenidas de ATCC (por sus siglas en inglés; American Type Culture Collection) y mantenidas en medio RPMI 1640 (Gibco®, EE. UU.), suplementado con 5 % de suero fetal bovino (SFB) (Biowest, EE. UU.), 100 mg/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco® EE. UU.) e incubadas a 37°C en una atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub> y 96 % de humedad.

### 6.2 Ensayos de crecimiento celular

El crecimiento celular se evaluó mediante la técnica de la sulforodamina B (SRB) de acuerdo con el protocolo de Vichai y Kirtikara [112]. De manera general, se sembró en cajas de 96 pozos de poliestireno (Costar 3590, EE. UU.), una curva estándar de 250, 500, 1250, 1500, 1750 y 2000 células en pozos por triplicado y un total de 1250 células por pozo en el resto de la caja, dejando la periferia libre de células (Fig. 2). Las placas fueron incubadas por 24 h a 37°C a una atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub> y 96 % de humedad. Para los ensayos, las células fueron tratadas por sextuplicado con una curva de calcitriol (0.1 – 100 nM) (Sigma, EE. UU.) y TGF-β1 y TGF-β2 (0.1, 1, 5, 10 y 50 ng/mL) (Prepro Tech, EE. UU.). Adicionalmente, se utilizó el calcitriol (10 nM) con TGF-β1 o TGF-β2 (200 pM) para realizar los ensayos de co-incubación. Los tratamientos se realizaron en medio RPMI (Gibco®, EE. UU.) suplementado con 5 % de SFB y 100 mg/ml de penicilina- estreptomicina y las células fueron incubadas durante 6 días, sin cambio de medio.

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

el exceso de SRB. Las placas se sacudieron y se secaron a temperatura ambiente dejando invertida la placa sobre una cama de papel.

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

Con o sin células

Solución salina

Blanco /medio

Curva celular

### Caja 0

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

### Caja de tratamientos (Tx)

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

Figura 2. Cajas de ensayos de proliferación.



### **6.3 Ensayo de apoptosis**

Los ensayos de apoptosis se analizaron por doble tinción con anexina V y yoduro de propidio (IP) empleando el kit Alexa Fluor 488 annexin V/ Dead Cell Apoptosis (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un total de 100,000 células fueron sembradas en cajas de 100 mm e incubadas por 24 h. Las células fueron sembradas en cajas de cultivo celular de 100 mm a una densidad de 100,000 células y se incubaron 24 h a 37°C a una atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub> y 96 % de humedad. Posteriormente las células fueron tratadas con calcitriol y TGF-β solos o en co-incubación por 4 días. A continuación, las células se despegaron con ácido etilenodiaminotetracético al 0.2%, se recolectaron en PBS y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min. Concluido el tiempo, se decantó el sobrenadante y las células se tiñeron con 1.5 mL de la solución de anti-anexina V acoplado a Fluor 488 (1:25) y IP (100 µg / mL) durante 20 min a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Al término las células fueron lavadas y centrifugadas a 3000 rpm por 5 min. Finalmente, las células fueron fijadas con 1 mL de paraformaldehído al 4 % en PBS y almacenadas a 4°C hasta su lectura.

Las células teñidas fueron analizadas usando el citómetro de flujo (FACSCalibur, BD) para determinar la población de células apoptóticas. La emisión de fluorescencia fue medida a 530 y 575 nm usando una excitación de onda de 488 nm.

### **6.4 Extracción del RNA**

Las células PC-3 fueron sembradas en cajas de 6 pozos (Thermo Fisher, Corea) empleando 150 000 células por pozo. Posteriormente fueron incubadas con calcitriol (10 nM), TGF-β (5 ng/mL) o su combinación durante 24 h.

Para la extracción del RNA se utilizó Trizol (Sigma-Aldrich, EE. UU.) de acuerdo con la técnica de Chomczynski y Sacchi [113]. Para ello, a cada pozo se les añadió 600 µl de Trizol y las células fueron raspadas y recolectadas en tubos de 1.5 ml, a los cuales se les adicionó 200 µl de cloroformo frío, se les agitó con un vórtex y se centrifugaron (microcentrífuga Eppendorf 5417R, EE. UU.) por 20 min a 13672 g a 4°C. A continuación, se recuperó la fase acuosa transparente superior de cada tubo y se transfirió cada muestra a un nuevo tubo de forma independiente y se les adicionó a cada tubo 500 µl de isopropanol

frio, se les agito y se centrifugaron por 20 min más a 13200 rpm a 4°C. Concluido el tiempo, se decantó el sobrenadante y el botón celular formado se resuspendió en 1 ml de etanol al 75% mediante agitación con el uso del vortex, y se centrifugó por 20 min a 13200 rpm a 4 °C. Al término se decantaron los tubos y se dejaron invertidos para secar el exceso de etanol. Finalmente, el precipitado de RNA antes de su secado total se resuspendió con 21 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

La cuantificación del RNA se evaluó en el espectrofotómetro Synergy HT (BioTek, EE. UU) para lo cual se usaron 2 µl de la muestra en la placa y se dio paso a la lectura. Este equipo reporta de forma automática la concentración del RNA en µg/µl considerando la relación de la absorbancia a 260/280 nm. El valor de esta relación se utilizó como indicador de pureza del RNA, en la cual un valor de 1.8-2.0 fue considerado para hacer los análisis de microarreglos. Las muestras con una integridad > 9.0 fueron utilizadas para los microarreglos.

#### **6.4.1 Procesamiento de los microarreglos**

La calidad del RNA se evaluó en el equipo Agilent BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, EE. UU.). Las muestras de RNA con una integridad > 9.0 se emplearon para ser procesadas en los ensayos de microarreglos. Las muestras se hibridaron con el chip Clariom D (Affymetrix, Santa Clara, EE. UU.) para evaluar la expresión global. Se evaluaron dos matrices con experimentos independientes por condición para un total de N = 8. Los procedimientos de hibridación, lavado y escaneo se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante en las instalaciones de INMEGEN.

#### **6.4.2 Análisis de datos de los microarreglos y análisis de vías**

Para el análisis de los datos generados se utilizó el conjunto de herramientas de Bioconductor en el software estadístico R. Este procesamiento se realizó mediante la opción “expreso” en el paquete “affy” del conjunto de herramientas Bioconductor e incluyó antecedentes de ajuste, eliminación de ruido de fondo y normalización. Para el control de la variabilidad entre los arreglos, el conjunto de datos se normalizó utilizando el método de análisis múltiple robusto RMA (por sus siglas en inglés, robust Multi-array Average) [114]. Los genes se anotaron con biomaRt [115] y las pruebas duplicadas para el mismo gen se eliminaron mediante la seleccionando la sonda con el rango intercuartil más alto. El perfil de genes expresados diferencialmente se calculó con el paquete limma [116] mediante una prueba t moderada y el valor p ajustado mediante el método FDR. Los genes con un valor logarítmico de veces de cambio FC (por sus siglas en inglés fold of change) de  $\pm 0,5$  y un valor de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos. Los datos de creación de perfiles están disponibles a través del repositorio de datos de Gene Expression Omnibus (GEO) con el número de acceso GSE159116.

Los análisis de enriquecimiento se realizaron con la herramienta Enrichr [117] usando KEGG y gene ontology para procesos biológicos. Se consideraron significativas las vías con valores de p (prueba de Fisher)  $\leq 0.05$ , puntuación combinada  $> 10$  y al menos 4 miembros del gen anotados. Los gráficos se realizaron en R con el paquete ggplot.

#### **6.5 Estudios de expresión génica por qPCR**

En cajas de 6 pozos (Thermo Fisher, Corea) fueron sembradas 150,000 células y 24 h después de la siembra las células fueron tratadas e incubadas con calcitriol, TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2, solos (curva de cada uno) o en combinación a las concentraciones antes descritas por 24 h adicionales. Para la extracción del RNA se utilizó el reactivo comercial Trizol (Sigma-Aldrich, EE. UU.) de acuerdo con la técnica de Chomczynski y Sacchi [113] antes descrita.

### **6.5.1 Obtención del DNA complementario**

Para la síntesis del DNA complementario (cDNA) se empleó el kit comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche, Alemania). De acuerdo con las instrucciones del fabricante, en un tubo estéril de 200  $\mu$ l se colocaron 2  $\mu$ g de RNA junto con 1  $\mu$ l de Oligo dT 50  $\mu$ M y agua grado PCR para ajustar un volumen final de 15  $\mu$ l por tubo. Posteriormente, los tubos fueron colocados en el termociclador Veriti (Applied Biosystems, Singapur) y se mantuvieron a 65 °C durante 10 min para favorecer la unión de las timidinas del Oligo-dT a las bases complementarias de adenina de las colas poli A de los RNA mensajeros. Después, las muestras se enfriaron a 4°C durante 1 min y se les agregó a cada muestra 7  $\mu$ l de una mezcla, previamente preparada, que contenía; 4  $\mu$ l del amortiguador 5X, 0.5  $\mu$ l del inhibidor de RNAasa (40 U/ $\mu$ L), 2  $\mu$ l de la mezcla de los desoxinucleotidos (dNTPs, 10 nM) y 0.5  $\mu$ l de la enzima transcriptasa reversa (20 U/ $\mu$ l). La reacción de síntesis del cDNA se llevó a cabo a 55°C por 30 min para la alineación y por último a 85°C por 5 min para la inactivación de la enzima. El cDNA obtenido se guardó a -20°C hasta su amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

### **6.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)**

La qPCR se llevó a cabo usando el kit comercial LightCycler Taqman Master (Roche, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para lo cual, 2  $\mu$ l del cDNA de interés previamente obtenido, se resuspendió en una mezcla que contenía 5.7  $\mu$ l de agua grado PCR, 0.1  $\mu$ l del iniciador sentido y antisentido (20  $\mu$ M), 0.1  $\mu$ l de la sonda de hidrólisis y 2  $\mu$ l de la DNA polimerasa TaqMan® (Master mix, 5X) obteniendo un volumen final de reacción de 10  $\mu$ l. Para la amplificación se utilizaron placas de 96 pozos que, tras la colocación de la muestra sobre la mezcla, se centrifugó a 1500 rpm durante 2 min y se colocó en un termociclador LightCycler® 480 II (Indianapolis, EE. UU.), previamente programado para realizar la qPCR según las condiciones que se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1. Protocolo de amplificación del cDNA por qPCR**

Ciclos	Temperatura (°C)	Evento	Tiempo (s)
1	95	Activación de la 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 la Universal Probe Library Design Center de Roche. Los resultados se analizaron empleando el método de cuantificación relativa  $\Delta\Delta C_t$  ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ), referidos a la condición experimental sin tratamiento.

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

Gen	Orientación del oligonucleótido		Amplicón (nt)	Numero de accesoión	No. sonda
	Sentido	Antisentido			
<i>CYP24A1</i>	CATCATGGCCA TCAAAACAA	GCAGCTCGACTGG AGTGAC	65	N_001302510.1	88
<i>IGFBP3</i>	AACGCTAGTGC CGTCAGC	CGGTCTTCCTCCG ACTCAC	104	NN_004994.2	1
<i>CCNA1</i>	AAATGGGCAGT ACAGGAGGA	CCACAGTCAGGGA GTGCTTT	111	NM_003254.2	78
<i>CDKN1A</i>	TCACTGTCTTGT ACCCTTGTGC	GGCGTTTGGAGTG GTAGAAA	127	NM_003255.4	32
<i>CDKN2A</i>	CTACTGAGGAG CCAGCGTCTA	CTGCCCATCATCA TGACCT	66	NM_002046.3	66
<i>UBE2D3</i>	CCTCACATCGG TCTTGTGC	AGGATTGTCTCGT CTCACACC	104	NM_003340.6	53
<i>CT45A2</i>	CACTGCCATTTT GTGAGGTG	CTGTTTTATCGGT CATTGTTTCC	25	NM_152582.6	64
<i>GAPDH</i>	AGCCACATCGC TGAGACAC	GCCAATACGACC AAATCC	66	NM_002046.3	60
<i>MMP-2</i>	ATAACCTGGAT GCCGTCGT	AGGCACCCTTGAA GAAGTAGC	63	N_001302510.1	70
<i>MMP-9</i>	GCCACCCGAGT GTAACCATA	GAACCAATCTCAC CGACAGG	67	NN_004994.2	6
<i>HCGβ</i>	TGTGCATCACC GTCAACAC	CTCCCAGAGCAAG GCAGATC		NM_001271756 .2	43

## **6.6 Ensayo de expresión de proteínas por wester blot**

Para expresión proteica de CDKN1A y CDKN2A, las células fueron incubadas en presencia o ausencia de calcitriol y TGF- $\beta$  solos o en combinación durante 48h. Posteriormente, las células fueron lisadas con solución de lisis (8.1 mM fosfato sódico dibásico, 1.5 mM fosfato sódico monobásico, 2.7 mM de cloruro de potasio, 137 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, pH 7.4) e inhibidores de proteasa. La proteína total se cuantificó por el método de Bradford [118].

Las proteínas de interés se separaron por electroforesis vertical con 10% de poliacrilamida y se cargó 50  $\mu$ g de proteína total. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de floruro de polivinilideno la cual fue bloqueada con TBST (20 mM Tris-base, 500 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) con leche al 5 % por 1h. A continuación, se realizaron 3 lavados con TBST y las membranas se incubaron toda la noche a 4°C en presencia del anticuerpo primario: anti-CDKN1A (1:100, Santa Cruz), anti-CDKN2A (1:100, Santa Cruz) y GAPDH (1:10000, Sigma) a 4°C. Después de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (1:2000, Santa Cruz) durante 2 h a temperatura ambiente. Concluido el tiempo, las membranas se lavaron nuevamente y las proteínas de interés se visualizaron usando el reactivo luminiscente Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad), en el fotodocumentador de imágenes ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) y el programa Image Lab (Bio-Rad). La cantidad de proteína detectada en cada caso fue normalizada con el GAPDH usado como control de carga.

## **6.7 Ensayo de ELISA**

### **6.7.1 Cuantificación de la secreción de la MMP-2 y de la MMP-9**

La MMP-2 y la MMP-9 secretadas al medio de cultivo fueron cuantificadas mediante el ensayo de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas: por sus siglas en inglés; enzyme-linked immunosorbent assay) empleando el estuche kit Human MMP-2 y MMP-9 DuoSet (R&D systems, EE. UU). El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pozos (Costar, Corning Incorporated, EE. UU) con los medios obtenidos después de 48 h en presencia de los diferentes tratamientos con calcitriol y TGF- $\beta$ 1 solos y en combinación. En breve, se diluyó el anticuerpo de captura a la concentración de trabajo (2  $\mu$ g/ml y 1  $\mu$ g/ml para la MMP-

2 y la MMP-9 respectivamente), se añadieron 100 µl de esta solución a cada pozo y se incubó toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, la placa se lavó un total de tres veces con solución de PBS y 20 0.05% Tween 20. A continuación, la placa se bloqueó añadiendo 300 µl de solución de bloqueo (PBS, 1% BSA) y se incubó durante 1 h, concluido el tiempo se lavó la placa.

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

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

### **6.7.2 Cuantificación de la secreción de la hCG-β**

La hCG-β secretadas al medio de cultivo fue cuantificada mediante el ensayo de ELISA empleando el estuche comercial DRH β-HCG (DRG Instruments GnbH, Alemania). En breve, se colocaron 25 µl de los estándares para la curva de calibración y 200 µl de la muestra problema en la placa que está recubierta con el anticuerpo anti-hCGβ. Posteriormente, se le añadió 100 µl de la enzima conjugada, se mezcló y se incubó por 60 min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo, la placa se lavó 5 veces con agua destilada y se eliminó el exceso. A continuación, a cada pozo se le adicionó 100 µl de la solución sustrato y se incubó por 15 min más. Para detener la reacción enzimática se les agregó 50 µl de solución de paro. Finalmente, la placa fue leída en un espectrofotómetro Multiskan MS

fotómetro tipo 352 (Labsystems, Finlandia) a una longitud de onda de 450 nm y los resultados fueron obtenidos en pg/ml normalizados con cantidad total de proteína.

### **6.8 Ensayos de cierre de herida**

La capacidad de migración de las células DU 145 y PC-3 se evaluó utilizando un ensayo de cierre de herida. Las células se sembraron en placas de 24 pozos a una concentración de 130 000 y 110 000 células por pozo para DU 145 y PC-3, respectivamente. Las placas fueron incubadas por 24 h a 37°C a una atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub> y 96 % de humedad. Posterior a la incubación, la monocapa celular se lavó con solución Hanks´ (HBSS; por sus siglas en inglés Hanks´ balanced salt solution) y posteriormente se generó una herida lineal en la monocapa con una punta de pipeta de plástico estéril de 100 µl. A continuación, los pozos se lavaron con HBSS para eliminar cualquier residuo celular. Posteriormente, las células se incubaron 24 h más en medio RPMI 1640 libre de suero fetal bovino. En seguida, las células se incubaron con calcitriol (10nM), TGF-β1 (5 ng/ml) o su combinación en medio RPMI 1640 libre de suero fetal bovino y mitomicina C (10 µg/mL) las cuales se incubaron por 24h a 37°C a una atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub> y 96 % de humedad. Se tomaron las fotos correspondientes al tiempo 0 y 24h.

Concluido el tiempo de incubación se retiró el medio y las células se lavaron con HBSS para eliminar cualquier residuo celular y se tomaron las fotos con el objetivo de 10X en el microscopio invertido Nikon ECLIPSE TS100. El porcentaje de cierre de herida se calculó rastreando manualmente el área libre de células en las imágenes capturadas con el software de dominio público ImageJ (NIH, Bethesda, MD). En condiciones normales, el área de la herida disminuirá con el tiempo. La tasa de migración se puede expresar como el cambio en el área de la herida a lo largo del tiempo [119].

$$\% \text{ de cierre de herida} = \left[ \frac{At_0 - At_{\Delta}}{At_0} \right] \times 100$$

*At<sub>0</sub>* = Área de cierre de herida medida inmediatamente después de la herida

*At<sub>Δ</sub>* = Área de herida medida a las 24h después de la herida



## **6.9 Análisis Estadístico**

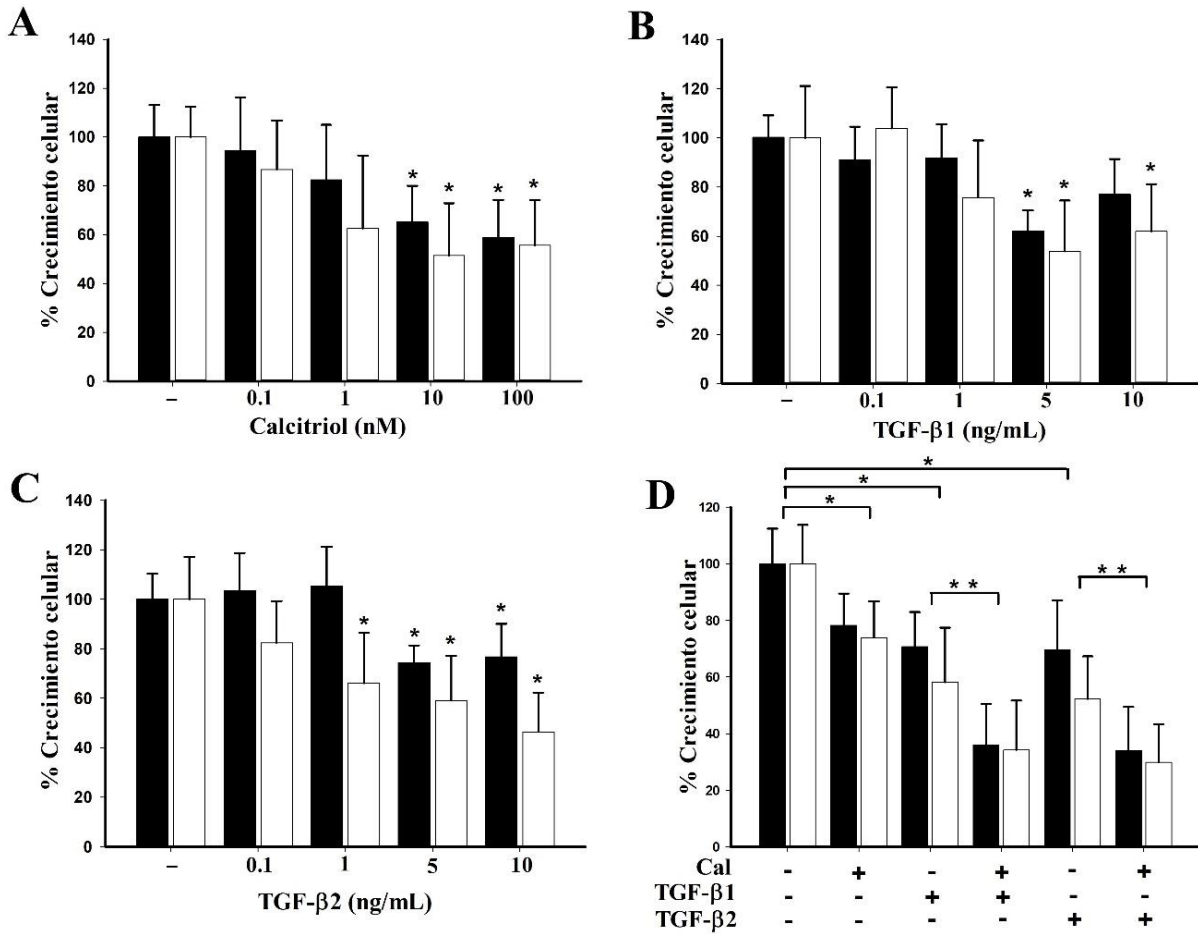
Los datos se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de al menos tres experimentos. Las diferencias estadísticas de los ensayos de proliferación, expresión génica y secreción proteica fueron determinados mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba Holm-Sidak, utilizando el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

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Efecto del calcitriol, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y su combinación sobre el crecimiento de las células PC-3 y DU 145

Las líneas celulares PC-3 y DU 145 fueron sembradas y tratadas con diferentes concentraciones de calcitriol y los TGF- $\beta$ s durante seis días de incubación. Como se aprecia en la Fig. 3, tanto el calcitriol como los TGF- $\beta$ s inhiben significativamente ( $p < 0.05$ ) el crecimiento celular de las PC-3 y DU 145.

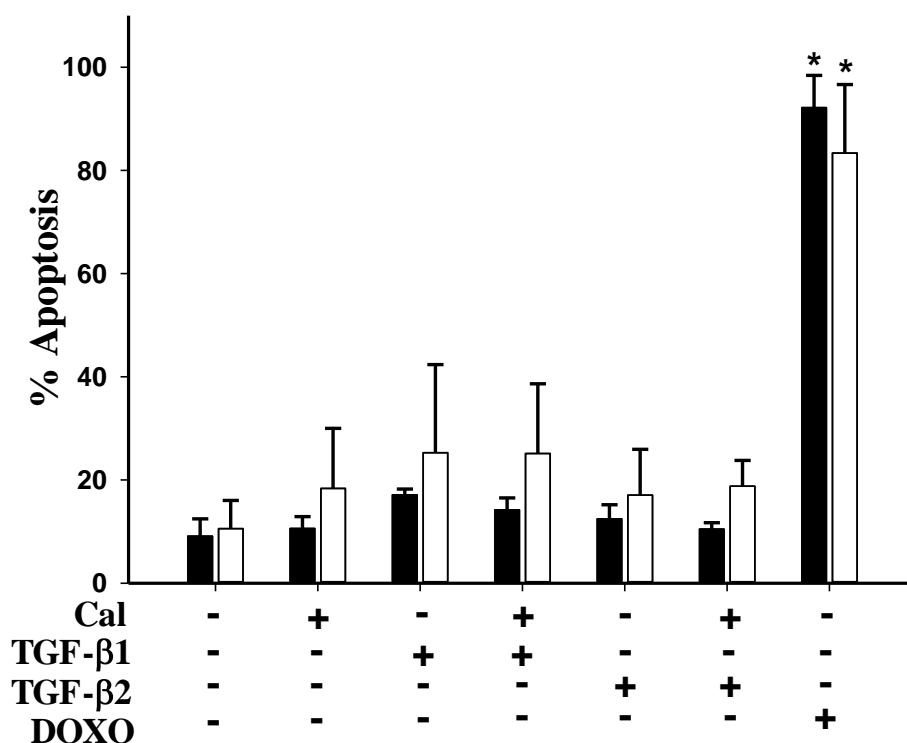
Con base en los resultados obtenidos, se eligió la concentración de 10 nM de calcitriol y 5 ng/mL de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en los siguientes experimentos con las combinaciones para ambas líneas celulares, ya que fueron las concentraciones mínimas en las cuales se observaron diferencias significativas en la inhibición del crecimiento celular. Con lo anterior, en la Fig. 3D se observó que la combinación de calcitriol con TGF- $\beta$ 1 o TGF- $\beta$ 2 resultó en una mayor inhibición del crecimiento celular en comparación con los observados con cada tratamiento de manera independiente en ambas líneas celulares ( $p < 0.05$ ). Este resultado sugiere que el tratamiento en combinación es mucho más efectivo para modular negativamente el crecimiento celular *in vitro*.



**Figura 3. Efecto en el crecimiento celular por el tratamiento de calcitriol y los TGF-βs en las líneas celulares de cáncer de próstata.** Las células PC-3 (■) y DU 145 (□) fueron incubadas durante 6 días con A) calcitriol (Cal), B) TGF-β1, C) TGF-β2 y D) Cal en combinación con TGF-β1 o TGF-β2. Cal: 10 nM; TGF-βs: 5 ng/mL. Las barras representan la media, n=4. \*p <0,05 vs control, \*\*p <0,05 vs cada compuesto solo.

## 7.2 Efecto del calcitriol, los TGF- $\beta$ s y su combinación sobre la apoptosis en las líneas celulares DU145 y PC-3

Con los resultados anteriores, se investigó si los tratamientos involucraban la vía de la apoptosis en la disminución del crecimiento celular. Para ello las células fueron tratadas con calcitriol [10 nM]; TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 [5 ng/ml] solos o en combinación por 4 días. Como se muestra en la Fig. 4, los tratamientos mostraron un efecto no significativo sobre la apoptosis en comparación con la condición control en ambas líneas celulares. Dado que se identificaron resultados similares tras el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 o TGF- $\beta$ 2, los experimentos consecutivos solo se realizaron con la incubación de calcitriol con TGF- $\beta$ 1.



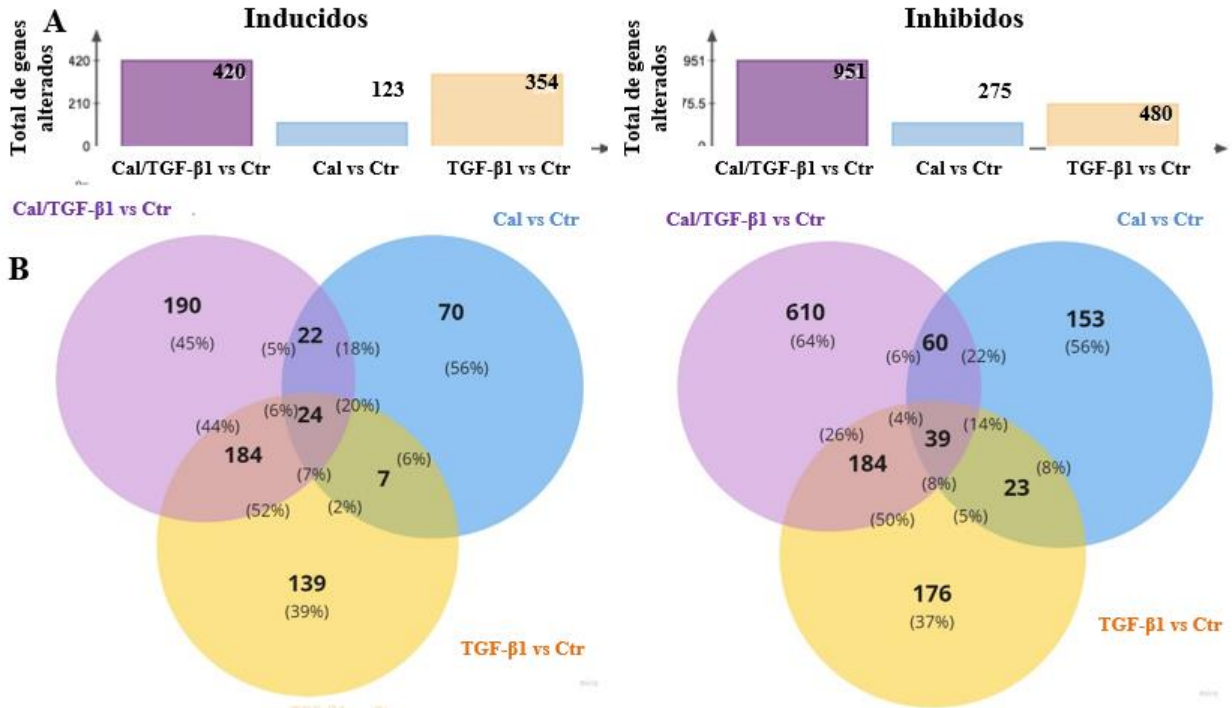
**Figura 4.** Efecto del calcitriol y los TGF- $\beta$ s sobre la apoptosis en las células de cáncer de próstata. Las células PC-3 (■) y DU 145 (□) fueron incubadas por 4 días con calcitriol, los TGF- $\beta$ s, y su combinación. La gráfica muestra el porcentaje de células apoptóticas en presencia de cada esquema de tratamiento usando doxiciclina (DOXO) como control positivo. Las barras representan la media, n=4. \*p < 0.05 vs el control.

### **7.3 Evaluación del transcriptoma de la línea celular PC-3 por microarreglo en ausencia y presencia del calcitriol, TGF- $\beta$ 1 y su combinación**

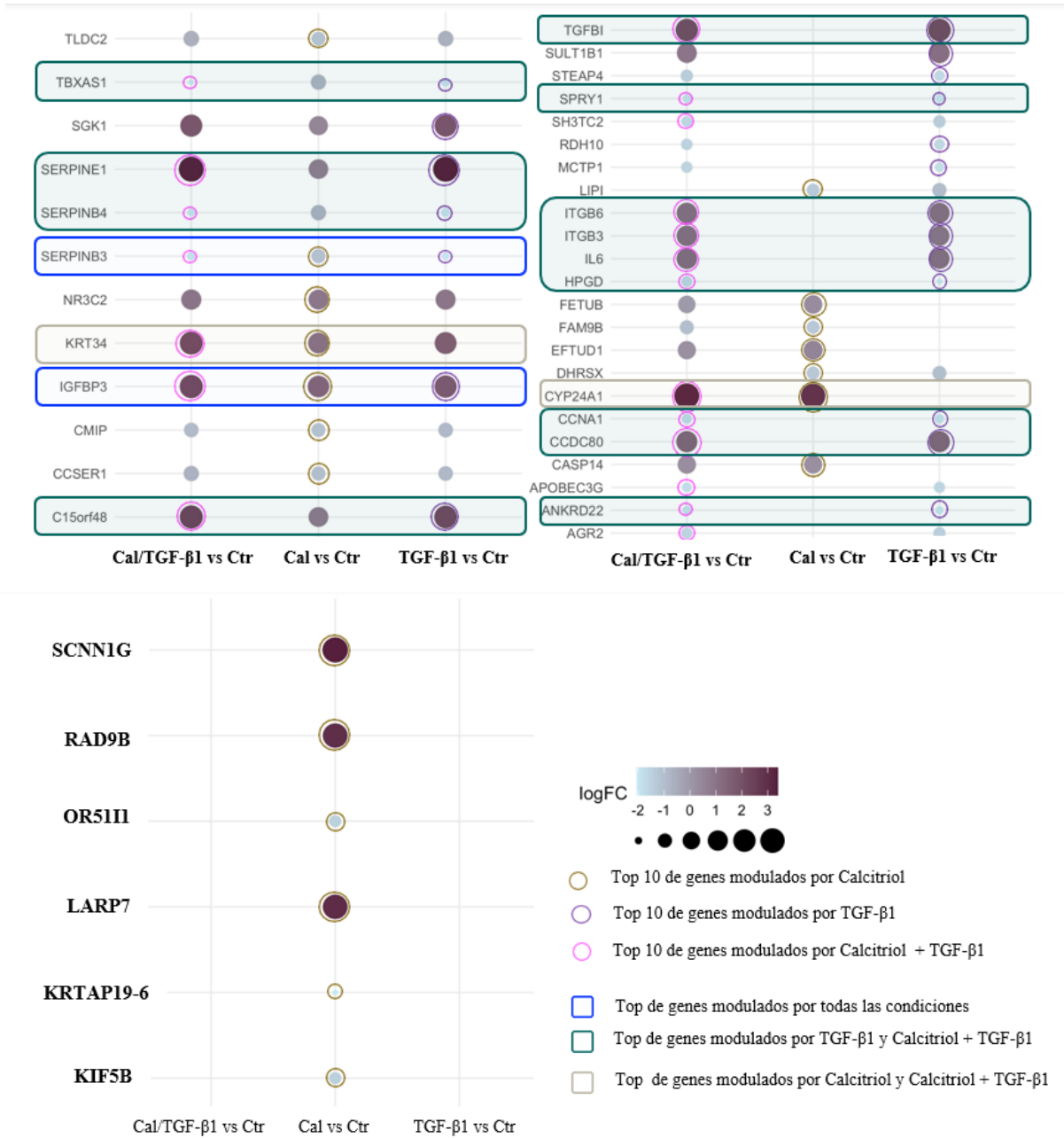
Para obtener un análisis de los cambios transcripcionales en presencia del calcitriol, el TGF- $\beta$ 1 y su combinación, se usaron las células PC-3. El mayor número de genes regulados por los tratamientos fue bajo el esquema de combinación (N = 1371), seguido de la incubación con TGF- $\beta$ 1 (N = 834) y finalmente con el calcitriol (N = 398) (Fig. 5A). Cabe destacar que la mayoría de los efectos transcripcionales resultaron en la inhibición de varios transcritos (Fig. 5B).

Al comparar la expresión de los transcriptomas entre cada tratamiento, la mayoría de los genes expresados diferencialmente fueron exclusivos de cada tratamiento. No obstante, algunos se sobrelaparon (Fig. 5B), de los cuales el mayor número de genes que coincidieron fueron entre el TGF- $\beta$ 1 y el esquema de combinación (Fig. 5B). Asimismo, encontramos que algunos de los genes que fueron estimulados o inhibidos por la combinación fueron encontrados dentro del top 20 de genes regulados solo por los tratamientos independientes (Fig. 6).

En general, los resultados muestran que un porcentaje relevante del mRNA modulado es único para cada tratamiento y que el TGF- $\beta$ 1 es la molécula con mayor efecto, influyendo sobre los programas de expresión génica en el tratamiento en combinación y, por lo tanto, podría tener un papel más destacado en el control de las respuestas de la célula.



**Figura 5. Comparación de la cantidad de genes modulados por el calcitriol, TGF-β1 y su combinación.** A) Número total de genes estimulados (izquierda) e inhibidos (derecha) ( $\log_{FC} \pm 0,5$ , valor  $p < 0,05$ ) por los tratamientos vs control. B) Diagramas de Venn que muestran los genes sobrelapados entre los tratamientos. Calcitriol (Cal), tratamiento combinatorio (Cal + TGF-β1) y control (Ctr).

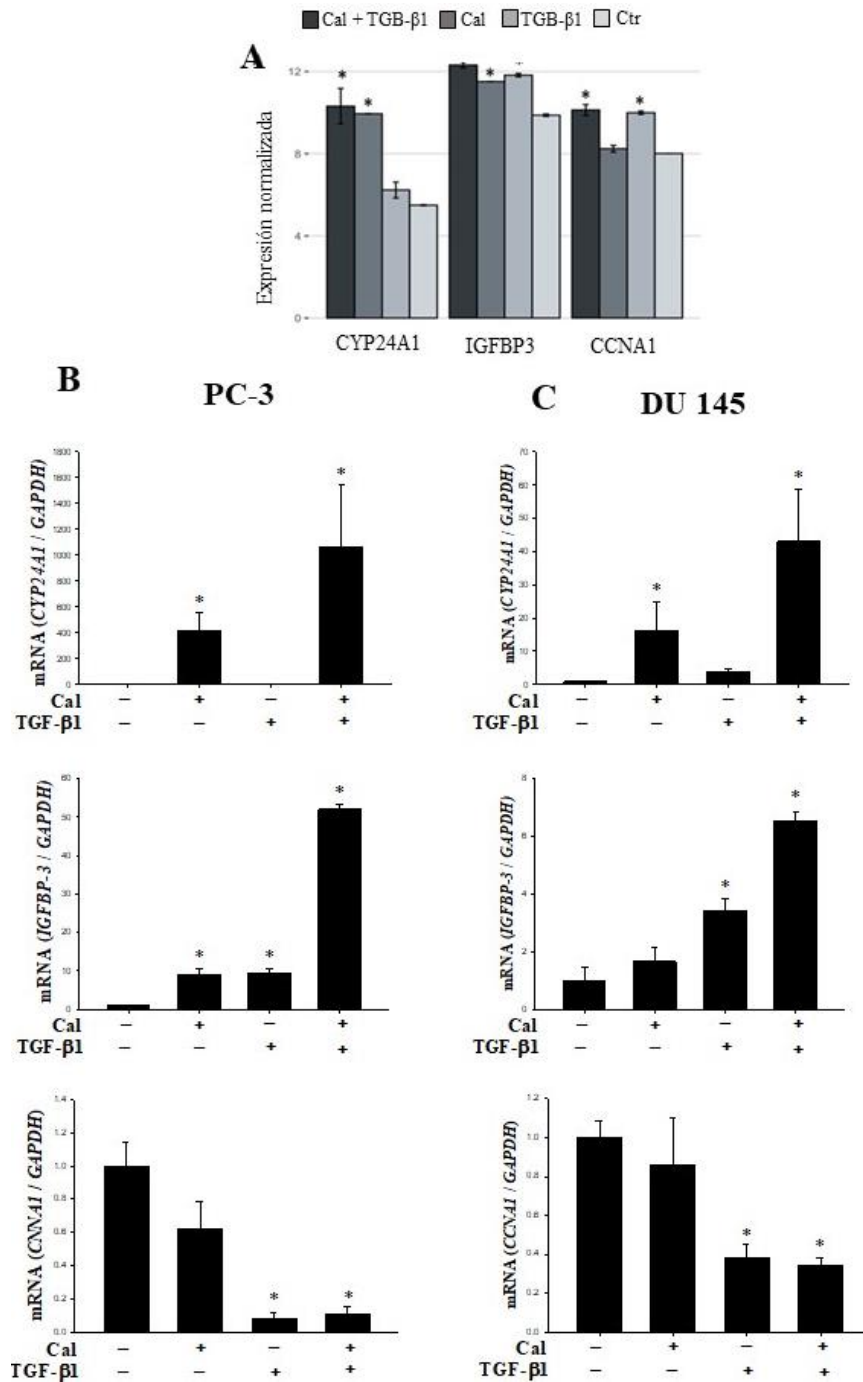


**Figura 6. Descripción general del panorama transcripcional modulado por calcitriol, TGF-β1 y los tratamientos en combinación.** Gráfico de burbujas que muestra los patrones de expresión génica y la coocurrencia de los 20 principales genes modificados por los tratamientos, Calcitriol (Cal), tratamiento combinatorio (Cal + TGF-β1) y control (Ctr).

#### **7.4 Validación del microarreglo mediante la expresión génica de *CYP24A1*, *IGFBP3*, *CCNA1* y *CDKN1A* por qPCR**

Para la validación de los ensayos del microarreglo, se tomaron de forma independiente algunos de los genes del top 20 y fueron analizados por qPCR (Fig. 6). Similar a los datos de microarreglos, el *CYP24A1* e *IGFBP3* fueron regulados positivamente por el calcitriol en ambas líneas celulares. Así como *IGFBP3* también fue modulado significativamente por el TGF- $\beta$ 1. Lo anterior, concuerda con trabajos anteriores [85, 110, 120], y respaldan nuestros resultados como controles de eficacia de cada tratamiento. Contrario a lo observado con los genes descritos, el gen *CCNA1* fue modulado a la baja por la combinación de los tratamientos (Fig. 7).

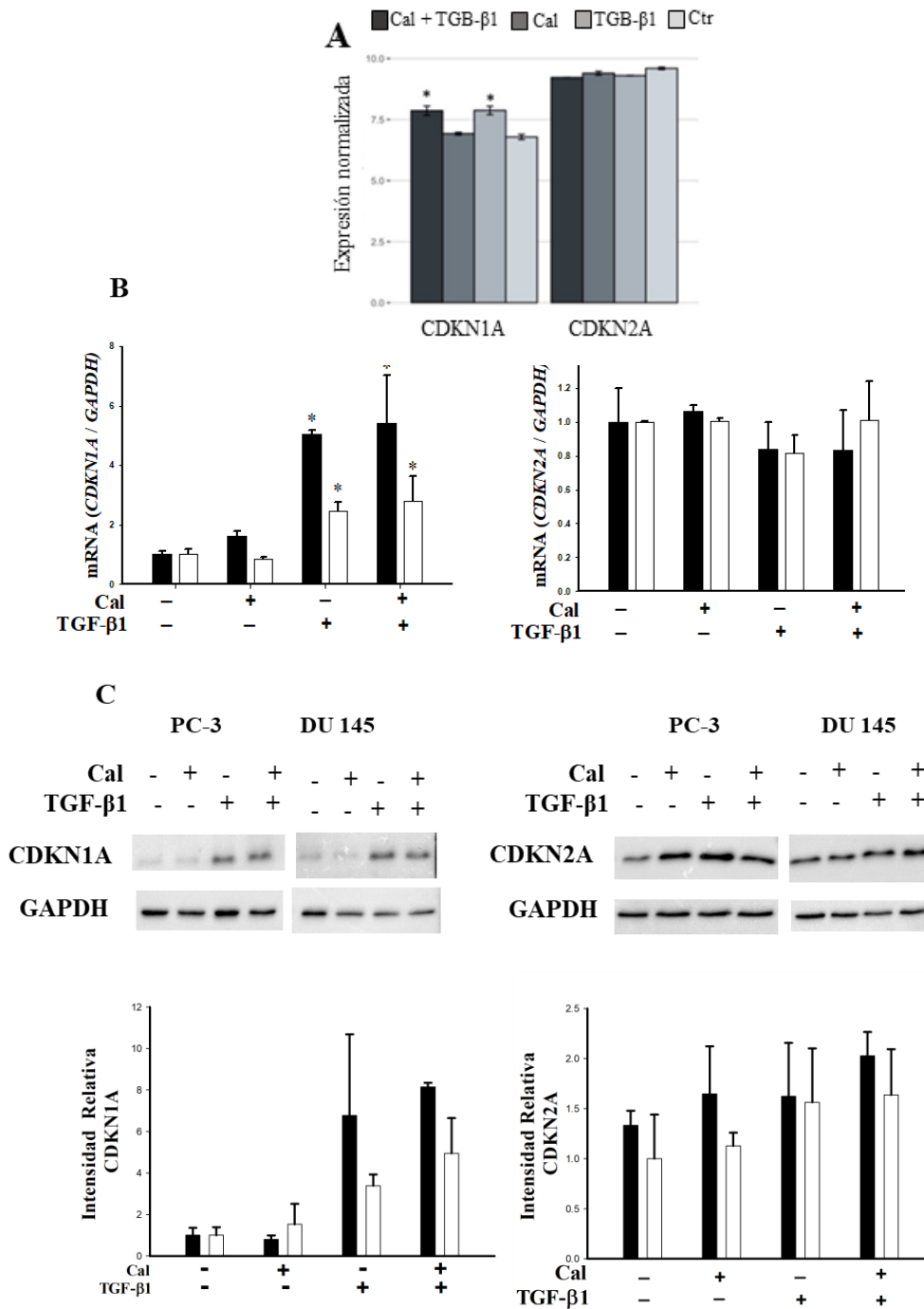




**Figura 7. Validación de la expresión génica del *CYP24A1*, *IGFBP3* y *CCNA1* por qPCR.** A) Resultados obtenidos por microarreglo en células PC-3, B) validación de la expresión génica del *CYP24A1*, *IGFBP3* y *CCNA1* por qPCR en B) PC-3 y C) DU145 que se incubaron en ausencia o presencia de los diferentes tratamientos durante 24 h. Calcitriol (Cal). Cada barra representa la media  $\pm$  S.D. n=3. Los datos de qPCR se normalizaron frente a la expresión del gen *GAPDH*. Los valores para el control se establecieron en 1. \* $p < 0.05$  vs control.

Otros genes elegidos para validación fue el *CDKN1A*, el cual fue sobre-expresado por el TGF- $\beta$ 1 y la combinación (Fig. 8A), lo cual nos proporciona información sobre cómo el TGF- $\beta$ 1 actúa sobre los inhibidores de CDK y *CDKN2A*, otro gen relacionado con el ciclo celular, que no presentó cambio significativo en ninguno de los tratamientos en el análisis de microarreglos (Fig. 8A). Como se observa, TGF- $\beta$ 1 indujo la regulación positiva de *CDKN1A*, pero no de *CDKN2A* (Fig. 8B).

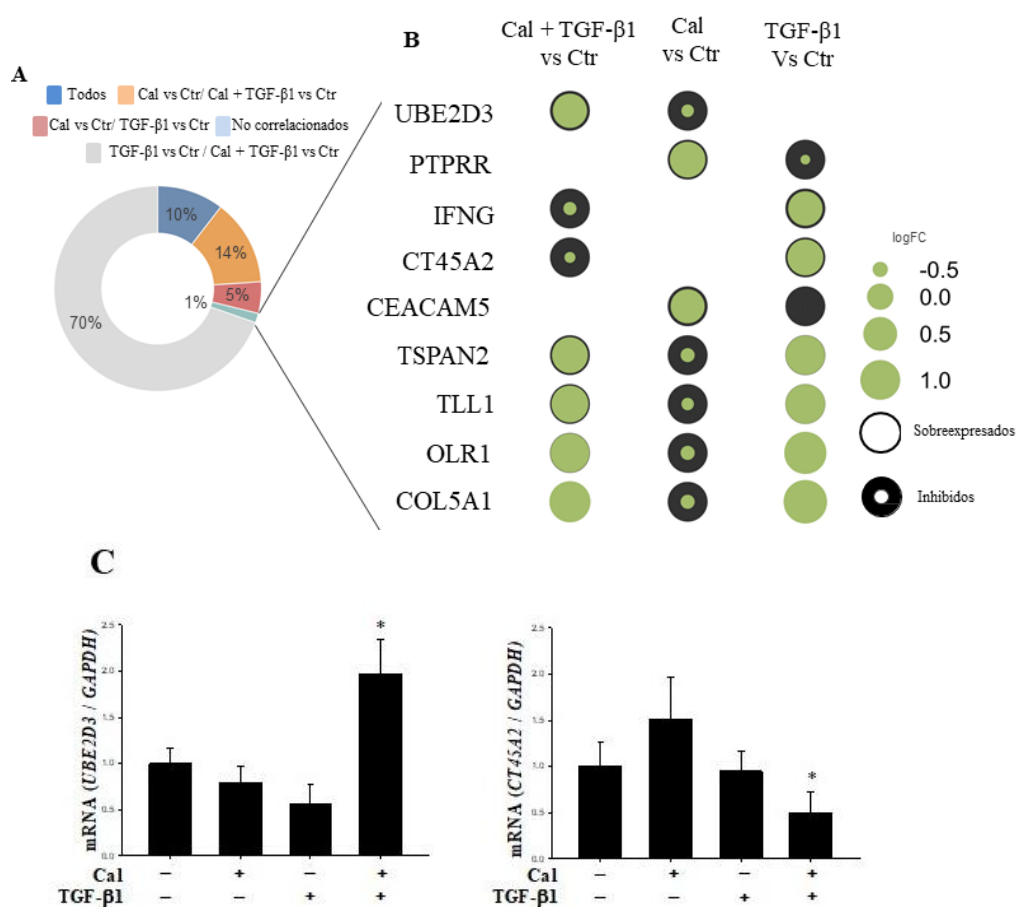
Este efecto sobre *CDKN1A* también se observó a nivel de proteína (Fig. 8C). En particular, y contrario a los perfiles de expresión génica, demostramos que la combinación reguló moderadamente al alza el nivel de proteína *CDKN2A* en comparación con el control (Fig. 8C).



**Figura 8. Validación de la expresión de CDKN1A y CDKN2A por qPCR y Western Blot.** A) Resultados obtenidos por microarreglo en células PC-3, B) validación por qPCR de la expresión génica CDKN1A y CDKN2A en las células PC-3 (■) y DU145 (□) que se incubaron en ausencia o presencia de los tratamientos durante 24 h. C) Expresión proteica de CDKN1A y CDKN2A 48 h después del tratamiento (imágenes representativas de tres experimentos independientes). Las barras representan la media  $\pm$  S.D. de 3 medidas independientes. Los datos de qPCR se normalizaron con el gen constitutivo *GAPDH*. Al control se le atribuyo el valor de 1 \* $p < 0.05$  vs control

## 7.5 Expresión análoga y discordante de genes regulados

La expresión de los genes expresados diferencialmente más comunes aumentó o disminuyó de manera similar entre los diferentes tratamientos, mientras que alrededor del 1% de las transcripciones presentaron una expresión discordante entre las condiciones de los tratamientos (Fig. 9B). Un ejemplo de estos genes es *UBE2D3*, sobreexpresado en la combinación y silenciado con calcitriol, o *CT45A2*, que se expresó de forma opuesta con el tratamiento de TGF- $\beta$ 1 (sobreexpresado) y la combinación (inhibido) (Fig. 9B). Estos genes se validaron por qPCR y se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en el microarreglo (Fig. 9C).



**Figura 9. Genes alterados de manera similar u opuesta por el calcitriol, TGF- $\beta$ 1 y la combinación.** A) Diagrama de dona que muestra la frecuencia de genes alterados en común entre los diferentes tratamientos. B) Diagrama de burbujas que muestra el patrón de expresión de genes discordantes entre tratamientos. C) Expresión de los genes *UBE2D3* y *CT45A2* con calcitriol, TGF- $\beta$ 1 y la combinación en células PC-3. Las barras representan la media  $\pm$  S.D. n = 3. Los resultados se normalizaron vs la expresión del gen *GAPDH*. Los valores del control se establecieron en 1. \* $p < 0.05$  vs control.

## 7.6 Análisis de enriquecimiento de vías derivados de los genes modulados por los tratamientos

Para examinar otras funciones potenciales entre los tratamientos se realizaron análisis de vías de enriquecimiento a partir de los datos del microarreglo en las células PC-3.

El análisis de enriquecimiento de vías identificó en el tratamiento con calcitriol, genes relacionados con la respuesta a la vitamina, el autoprosesamiento de proteínas, la senescencia replicativa así como, la regulación de la secreción de la hormona de crecimiento, la regulación negativa de la adhesión celular mediada por integrinas y el proceso catabólico del AMPc (Fig.10A). En relación con el TGF- $\beta$ 1, los genes estimulados enriquecieron la respuesta a la vía de los iones metálicos, la cicatrización de heridas, la diseminación de las células epidérmicas y la organización de la matriz extracelular, mientras que los genes inhibidos fueron relacionados con la edición de citidina a uridina, proceso catabólico de nucleótidos cíclicos y la respuesta a la señalización de heparina, entre otros (Fig. 10B).

Con respecto al tratamiento en combinación, los análisis mostraron que varios genes regulados positivamente están involucrados en la regulación negativa de la fosforilación de las proteínas SMADs, la vía de señalización del TNF y la regulación de la migración celular. Mientras que los genes regulados negativamente participan en la edición de citidina a uridina, la regulación negativa de la adhesión celular mediada por la integrina y la regulación de la transposición, entre otros (Fig. 10C).

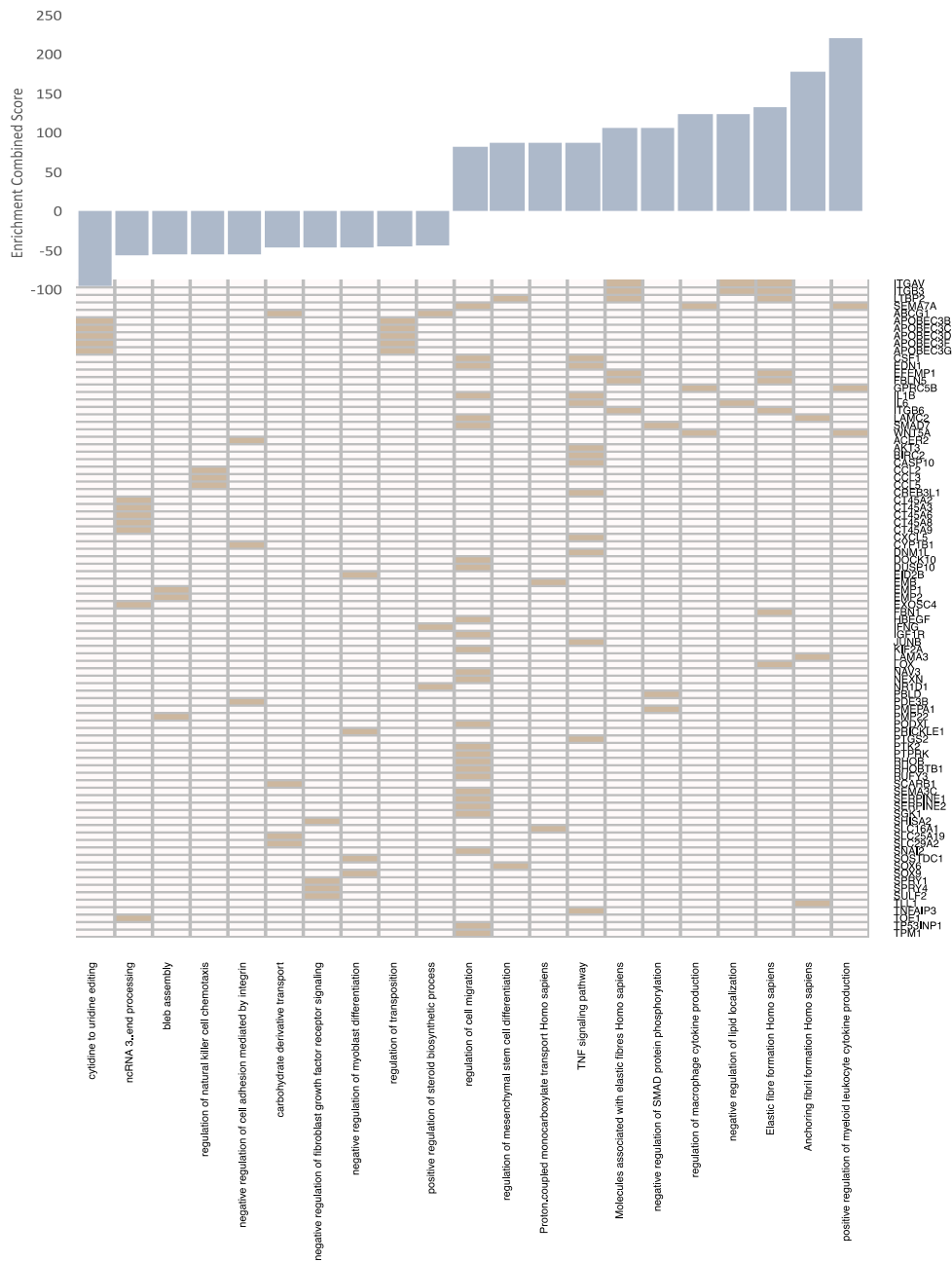
Cabe mencionar que el tratamiento en combinación moduló genes considerados como biomarcadores y/o con un papel oncogénico relacionado con el crecimiento celular. Entre ellos, los miembros de los antígenos de cáncer/testículo los cuales estaban regulados negativamente (*CT45A2*, *CT45A3*, *CT45A6*, *CT45A8* y *CT45A9*), así como *EXOSC4*, *TOE1* y genes pertenecientes a la familia de genes de citidina desaminasa (*APOBEC3B*, *APOBEC3C*, *APOBEC3D*, *APOBEC3E* y *APOBEC3G*) (Fig. 10C).

# A Calcitriol vs Control





## C Calcitriol-TGF-β1 vs control



**Figura 10. Análisis de enriquecimiento de vías (Top20) de genes expresados diferencialmente por el tratamiento con: A) Calcitriol, B) TGF-β1 y C) la combinación.** Los genes se trazaron en un mapa de calor (abajo) que indica en qué vías de señalización se anotan y los diagramas de barras (superior) que indican la puntuación de enriquecimiento de cada vía calculada por la herramienta Enrichr. Los gráficos muestran genes regulados tanto al alza como a la baja.



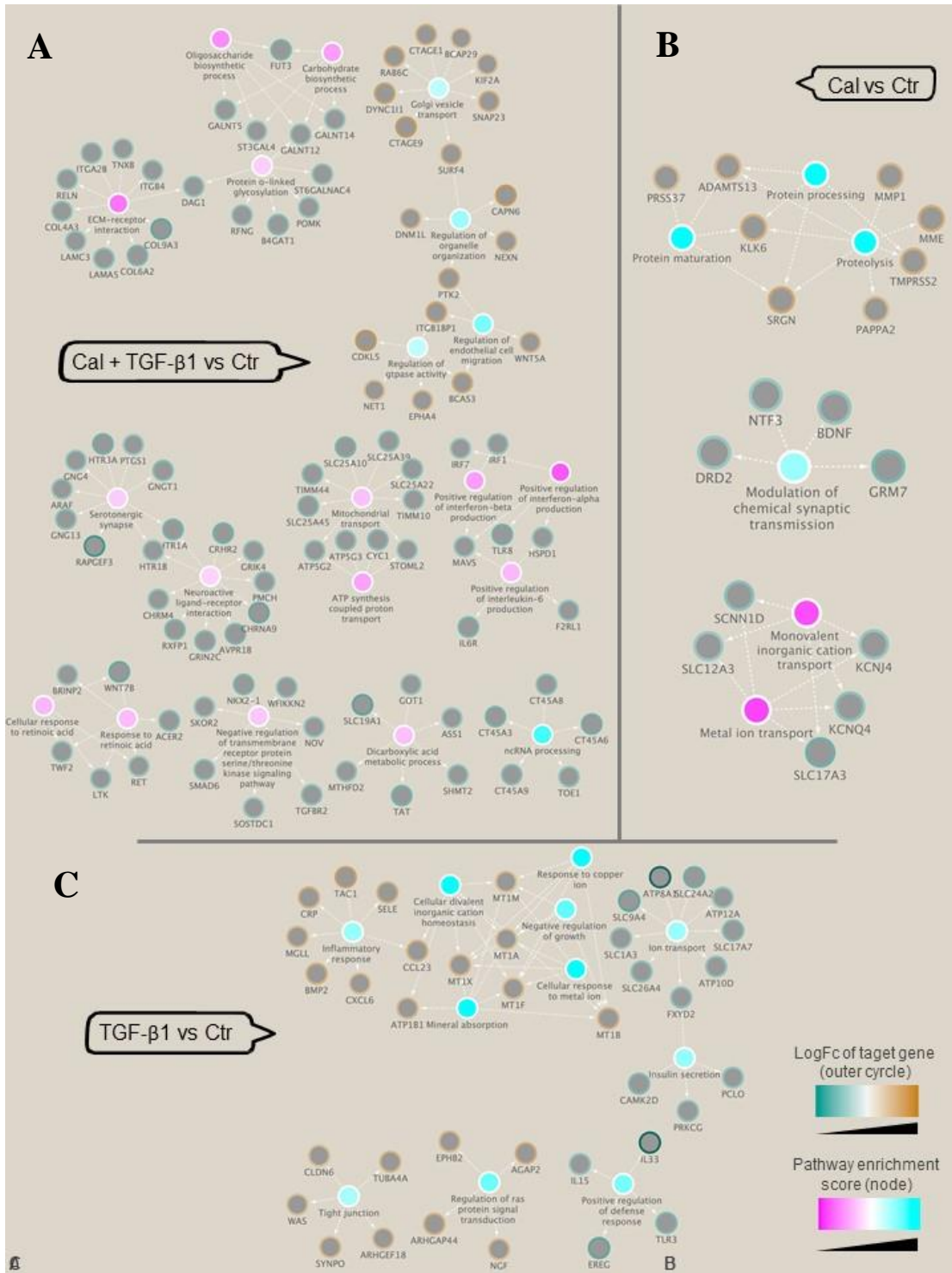
## **7.7 Panorama de enriquecimiento de genes específicos alterados por los tratamientos**

Para examinar genes expresados diferencialmente regulados de manera específica del tratamiento, se identificaron vías enriquecidas por genes regulados solo por un tratamiento. El análisis de enriquecimiento de la vía identificó una disminución significativa del metabolismo de carbohidratos y energía tras el tratamiento en combinación, lo que confirma la relevancia de estas vías en procesos celulares vinculados como el crecimiento celular (Fig. 11A).

Además, la combinación impactó negativamente en los componentes de la matriz extracelular que están involucradas en la tumorigénesis y metástasis como las integrinas. También, el procesamiento de proteínas fue afectada tras el tratamiento con calcitriol (Fig. 11B).

De manera interesante, se observó un efecto opuesto, sobre el transporte de iones entre el tratamiento con calcitriol (regulado a la baja) y TGF- $\beta$ 1 (regulado al alza) (Fig. 11B-C). Finalmente, otras funciones celulares reguladas positivamente por la incubación de TGF- $\beta$ 1 fueron la respuesta inmune y las uniones estrechas (Fig. 11C).

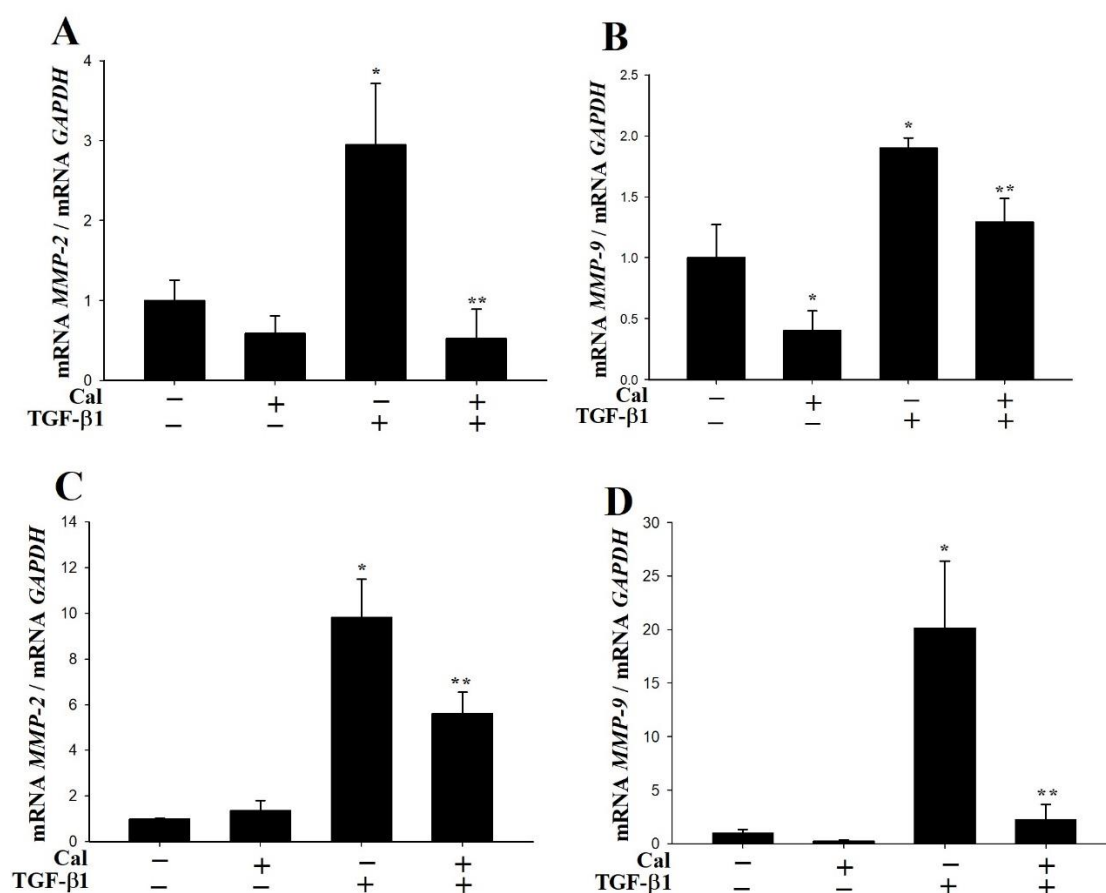
Estos datos nos permitieron identificar que los tratamientos independientes y combinados en un modelo celular de cáncer, establecen un paisaje transcripcional diferente, aunque algunos genes y vías moduladas sean comunes.



**Figura 11. Vías asociadas a la modulación específica del tratamiento.** El mapa de enriquecimiento muestra vías significativamente enriquecidas por genes alterados por un solo tratamiento en A) La combinación (Cal + TGF-β1), B) Calcitriol y C) TGF-β1. Los nodos en la red representan rutas enriquecidas. Los nodos están coloreados (círculo interior) según la puntuación de enriquecimiento de la ruta calculada por Enrichr y los genes diana (círculo exterior) están coloreados según el nivel de logFC resultante del tratamiento de contraste vs al control (Ctr).

## 7.8 Efectos de los tratamientos sobre la expresión génica de las MMPs

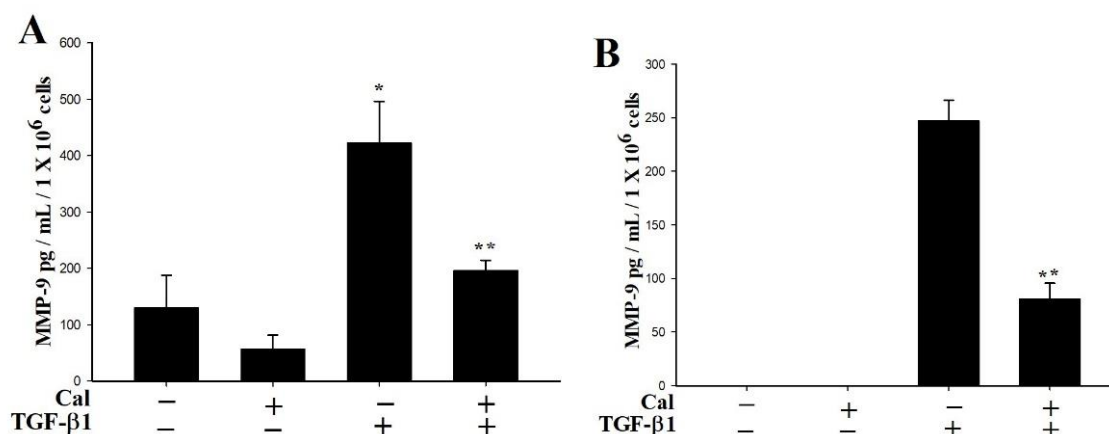
Adicionalmente estudiamos la expresión génica de MMP-2 y MMP-9 en presencia de calcitriol, TGF- $\beta$ 1 o su combinación durante 24 h en ambas líneas celulares. La incubación con calcitriol (10 nM) inhibió ( $P < 0.05$ ) el efecto estimulante del TGF- $\beta$ 1 (5 ng/mL), manteniendo a nivel basal tanto la MMP-2 y MM -9 en las células PC-3 (Fig. 12 A y B) y DU 145 (Fig. 12 C y D).



**Figura 12. El calcitriol inhibe la acción de TGF- $\beta$ 1 sobre las MMPs.** Las líneas celulares PC-3 (A y B) y DU 145 (C y D) se incubaron en ausencia o presencia de calcitriol (Cal), TGF- $\beta$ 1 o su combinación y sus efectos sobre la expresión génica de MMP-2 y MMP-9 fueron evaluados después de 24 h de tratamiento. Cada barra representa la media  $\pm$  S.D.  $n = 3$ . Los valores para el control se establecieron en 1. \* $P < 0.05$  vs control, \*\* $P < 0.05$  vs el TGF- $\beta$ 1 solo.

## 7.9 Efecto del calcitriol sobre la secreción de MMP-2 y MMP-9

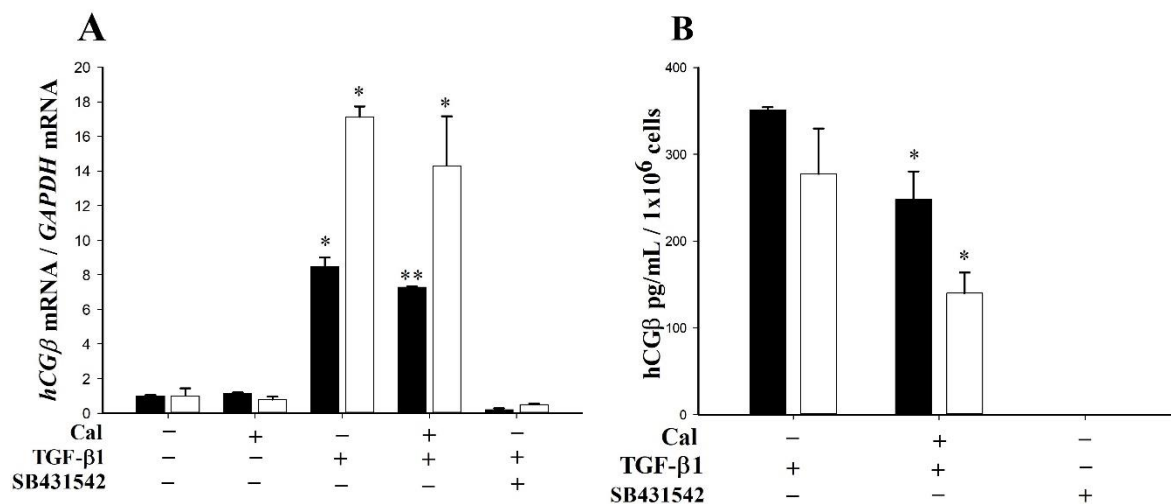
Además de la expresión génica de las MMPs, se analizó el efecto de los tratamientos sobre la secreción de la MMP-9. Como se muestra en la Fig. 13A y B, el aumento de la secreción de MMP-9 en presencia de TGF- $\beta$ 1 en las líneas celulares PC-3 y DU145 se inhibió significativamente cuando los cultivos celulares se incubaron con calcitriol y TGF- $\beta$ 1 durante 48 h. Como se ha reportado [26], la proteína MMP-2 no fue detectable por el kit ELISA que utilizamos en las células PC-3 ni en las células DU 145 incluso en presencia de TGF- $\beta$ 1.



**Figura 13. El Calcitriol inhibe la secreción de la MMP-9 inducida por el TGF- $\beta$ 1.** Se incubaron células PC-3 (A) y DU145 (B) en ausencia o presencia de calcitriol (Cal), TGF- $\beta$ 1 o su combinación y la secreción de la MMP-9 se evaluó después de 48 h. Cada barra representa la media  $\pm$  S.D. de  $n = 3$ . Al control se le atribuyo el valor de 1. \* $p < 0,05$  vs control, \*\* $p < 0,05$  vs TGF- $\beta$ 1 solo.

## 7.10 Efectos del TGF- $\beta$ 1 y su combinación con calcitriol sobre la hCG $\beta$

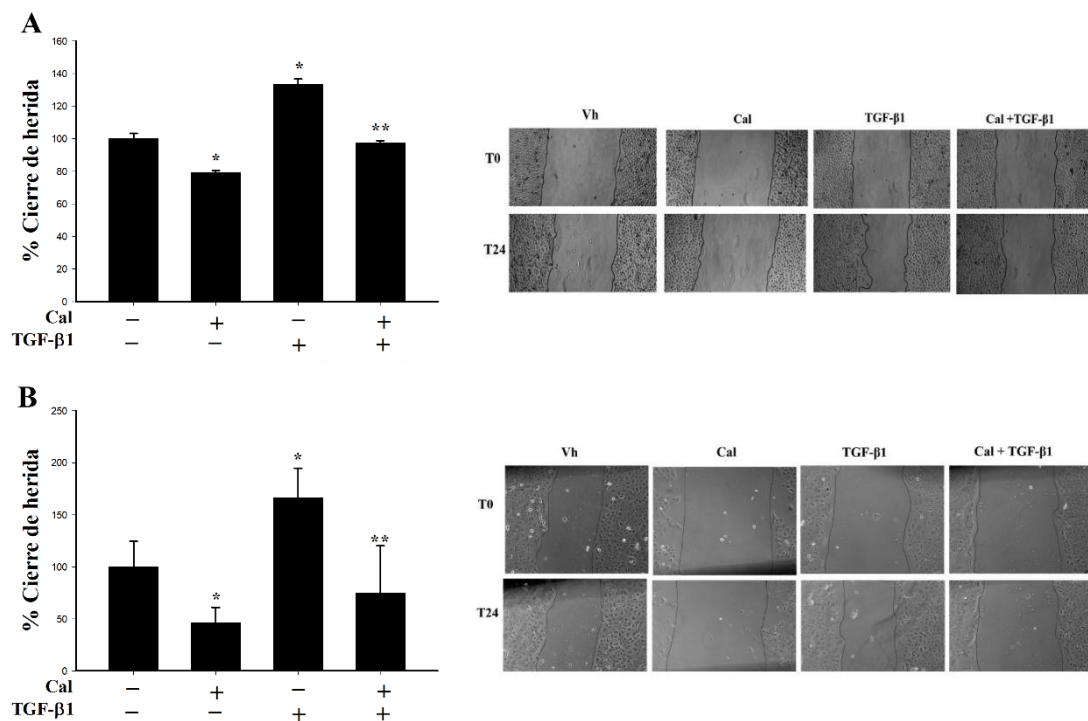
Considerando que en el análisis de microarreglos el TGF- $\beta$ 1 indujo la expresión de las isoformas de la subunidad  $\beta$  (*CGB1*, *CGB2*, *CGB5*, *CGB7*) y que estudios previos de nuestro grupo de trabajo demostraron que esta citocina indujo la secreción de HCG $\beta$  en la línea DU 145, [149] decidimos estudiar su expresión (Fig. 14A) y su secreción (Fig. 14B) en ausencia y presencia de los tratamientos. Los resultados mostraron que el TGF- $\beta$ 1 estimuló la expresión génica y la secreción de esta hormona glicoproteica en células PC-3 y DU145 mientras que el calcitriol bloqueó el efecto estimulante de TGF- $\beta$ 1. Como era de esperar, el SB431542 (inhibidor del T $\beta$ RII) bloqueó dicha estimulación.



**Figura 14. El calcitriol inhibe la expresión génica y secreción de la proteína de hCG $\beta$  inducido por el TGF $\beta$ 1.** Las líneas celulares PC-3 (■) y DU 145 (□) se incubaron con TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml), calcitriol (Cal; 10 nM) o su combinación en ausencia o presencia de SB431542 (10  $\mu$ M) y se evaluó la expresión génica (A) y secreción proteica (B). Cada barra representa la media  $\pm$  S.D. de n = 3. \* $p$  < 0,05 vs TGF- $\beta$ 1.

### 7.11 Ensayo de cierre de herida

Finalmente, se realizaron ensayos de cierre de herida, en los que se mostró que la migración de las líneas celulares PC-3 y DU 145 fue inhibida y estimulada por el calcitriol y el TGF- $\beta$ 1, respectivamente. En particular, el efecto estimulador de TGF- $\beta$ 1 fue bloqueado por el calcitriol manteniendo los niveles basales de migración en ambas líneas celulares (Fig. 15 A y B).



**Figura 15. Migración celular en ausencia y presencia de calcitriol, TGF- $\beta$ 1 o su combinación en células de cáncer de próstata.** La migración de las células PC-3 (A) y DU145 (B) se evaluó mediante ensayos de cierre de heridas después de 24 h de tratamiento. Las imágenes son representativas que muestran el área cubierta por las células al tiempo 0 y 24 h después de la herida. Aumento original 20x. El porcentaje de cierre de la herida se calculó evaluando el área libre de células en las imágenes capturadas utilizando el software ImageJ. Cada barra representa la media  $\pm$  S.D. de n = 3. Los valores para el control se establecieron en 100. \* $p < 0.05$  vs control, \*\* $p < 0.05$  vs TGF- $\beta$ 1 solo.

## 8. DISCUSIÓN

La deficiencia del calcitriol, así como el desequilibrio en las vías de señalización del TGF- $\beta$  son asociados al desarrollo del cáncer de próstata. En el presente estudio, observamos la inhibición del crecimiento celular por el calcitriol y los TGF- $\beta$ s en 2 líneas celulares de cáncer de próstata; PC-3 y DU 145. El efecto observado del calcitriol coincide con su actividad antiproliferativa reportada en diferentes líneas de células tumorales, cultivos primarios y modelos *in vivo* [68, 123-125]. Asimismo, la inhibición por el TGF- $\beta$ 1 observada en nuestro trabajo coincide con datos publicados por otros grupos de investigación [24, 26, 37, 126]. De manera interesante, los resultados obtenidos mostraron por primera vez que el tratamiento combinado del calcitriol con los TGF- $\beta$ s, inhibieron con mayor eficacia el crecimiento celular en comparación con las células tratadas con cada compuesto por separado. Un efecto que fue apoyado mediante nuestro análisis *in-silico*, el cual mostró que los tratamientos en combinación afectaron genes relacionados con el ciclo y la proliferación celular, lo cual sugiere que el calcitriol y el TGF- $\beta$  operan coordinadamente para controlar el crecimiento celular, al menos en las líneas celulares evaluadas en el presente estudio.

Cabe señalar que la muerte celular apoptótica se considera como uno de los mecanismos por los que el crecimiento celular puede verse afectado y hay reportes que señalan que esta vía es inducida tanto por el calcitriol como por el TGF- $\beta$  en líneas celulares de cáncer de próstata humano [75, 126, 127]. Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro estudio mostraron un aumento no significativo de la apoptosis celular, es decir, el efecto de los tratamientos, bajo nuestras condiciones, no indujeron una muerte celular por lo que no explican los datos obtenidos en los ensayos de crecimiento celular. Lo anterior, se apoya con los datos obtenidos mediante la aplicación de firmas de RNA a nuestro perfil génico. Además, estos resultados concuerdan con el trabajo de Igarashi et al. [128], quienes demostraron que el calcitriol a la concentración probada no indujo apoptosis en las células LNCaP.

Con la finalidad de buscar otros cambios específicos a nivel génico que pudieran dirigir el efecto sobre el crecimiento celular encabezado por el tratamiento en combinación, se analizaron otros genes del transcriptoma que fueron alterados de manera relevante. Entre ellos el gen IGFBP3, el cual es estimulado en cada esquema de tratamiento, pero con mayor fuerza en la combinación, se sabe participa en la inhibición del crecimiento de las células

PC-3 y LNCaP [25, 85, 128]. Estudios previos demostraron que el *IGFBP-3* estimulado por el calcitriol es un componente necesario para inducir a *CDKN1A*, un potente inhibidor de cinasa dependiente de ciclina [85]. En el presente estudio, los resultados mostraron que el co-tratamiento con calcitriol y TGF- $\beta$ 1 también indujeron significativamente al *CDKN1A*, lo cual sugiere una participación del *IGFBP-3* que activado por el co-tratamiento ejerce un estímulo adicional sobre *CDKN1A*. Por otro lado, tanto el TGF- $\beta$ 1 y su combinación con calcitriol inhibieron la expresión de la ciclina A1 (*CCNA1*), un regulador positivo del ciclo celular que normalmente se encuentra elevado en el cáncer de próstata [129, 130], lo que, en conjunto, podría contribuir al arresto del ciclo celular.

No obstante, los tratamientos también modificaron significativamente otros genes que pudieran ser clave en la inhibición del crecimiento celular. En particular, entre los genes diferencialmente regulados solo por la combinación, el gen *NOX4* fue el de mayor estímulo. Este gen codifica para una NADPH oxidasa, considerada como una de las principales fuentes de especies reactivas de oxígeno (ROS; por sus siglas en inglés: reactive oxygen species). Lo cual sugiere que la combinación de los tratamientos favorece a través de *NOX4*, la producción de ROS, facilitando así la activación de la vía de las SMAD 2/3, que conduce al arresto en la fase G1 acompañada de la regulación positiva de los inhibidores de cinasa dependientes de ciclina que también se observaron en los análisis funcionales *in silico* [34]. Con lo cual, posiblemente la activación de la cascada de señalización del TGF- $\beta$ /Smad/ROS podrían contribuir en las acciones antiproliferativas del tratamiento en combinación.

Entre otros genes modificados, el tratamiento en combinación tuvo un impacto sobresaliente en la expresión de *UBE2D3* y *CT45A2*, los cuales fueron estimulados e inhibidos por el co-tratamiento, respectivamente, un efecto opuesto con respecto al tratamiento individual para cada uno de ellos. *UBE2D3* es una enzima que pertenece a la familia de enzimas conjugadoras de ubiquitina-proteasoma y su desequilibrio se ha correlacionado con procesos neoplásicos de próstata [131]. En este sentido, el efecto de la combinación parece ser positivo, ya que la expresión de la proteína *UBE2D3* está asociada significativamente con la supervivencia global y el aumento de la radiosensibilidad en pacientes con cáncer de esófago [132, 133]. De hecho, su inhibición favorece la proliferación celular y el mantenimiento de la enzima telomerasa [134, 135]. Además, la baja expresión de *UBE2D3* es considerada un factor determinante para la progresión del cáncer de mama



metastásico [136]. Lo anterior, sugiere que la inhibición del crecimiento celular promovida por la combinación del calcitriol con el TGF- $\beta$ 1, también podría estar mediada por la regulación positiva de *UBE2D3*. Sin embargo, es necesario realizar investigaciones al respecto para confirmar esta hipótesis.

Por otra parte, el tratamiento combinado inhibió la expresión génica de varios miembros de la familia CT45 (*CT45A2*, *CT45A3*, *CT45A6*, *CT45A8* y *CT45A9*), los cuales pertenecen a la serie de antígenos de cáncer/testículo (CTA), que son proteínas que normalmente se expresan en células germinales, mientras que en varios tipos de cánceres se expresan de manera aberrante incluido el cáncer de próstata. Su expresión está asociada con la progresión de la enfermedad, la proliferación celular y la metástasis [137, 138]. En particular, la expresión del gen *CT45A2* se ha relacionado con un aumento de la proliferación en la línea celular H1975 de pulmón [139]. En cáncer de próstata, la alta expresión de genes CTAs ha sido propuesta como un biomarcador potencial en el diagnóstico y pronóstico de esta enfermedad. En apoyo a lo anterior, algunos trabajos han demostrado que los genes de CTA pueden influenciar diferentes vías oncogénicas, incluyendo la señalización del TGF- $\beta$ /SMAD [140]. Por lo cual, sugerimos que en estos efectos biológicos hay una retroalimentación mutua entre las acciones del calcitriol y del TGF- $\beta$ .

En resumen, el calcitriol en combinación con TGF- $\beta$ 1 o TGF- $\beta$ 2 inhibe más el crecimiento de las células PC-3 y DU145 en comparación con cada compuesto independiente. Además, el tratamiento en combinación estimuló significativamente la expresión de *IGFBP3*, el cual es un mediador importante del crecimiento celular. Siendo que los resultados apoyan un efecto citostático más que los eventos de muerte celular, como se explica por la inducción de *CDKI* y la inhibición de *CCNA1*. Más aún, como fue observado, hay otros genes regulados que están involucrados en una variedad de funciones celulares que potencialmente pueden dañar el crecimiento celular.

Por otro lado, una de las inquietudes en el área de investigación ha sido la regulación de la señalización de TGF- $\beta$  en células normales y cancerosas. En condiciones fisiológicas, una red compleja de factores regula la señalización de TGF- $\beta$ . Sin embargo, cualquier alteración de estos factores podría modificar las características de ciertas células e inducir la transformación de células normales a tumores malignos. Por ejemplo, las MMP y TIMP desempeñan funciones importantes en múltiples etapas del desarrollo y la supervivencia

celular. Una interrupción en el equilibrio entre MMP y TIMP por parte de TGF- $\beta$ 1 se ha implicado en la progresión del cáncer. Por tanto, la regulación de la señalización de TGF $\beta$  podría ser una de las estrategias clave para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer

En el presente estudio, demostramos que el calcitriol inhibió el efecto estimulador de TGF- $\beta$ 1 sobre la expresión génica de la MMP-2 y la MMP-9 en células PC-3 y DU145. Además de la expresión génica, también se estudió la secreción de MMP-2 y MMP-9 en el sobrenadante de ambas líneas celulares. En acuerdo con Konrad, *et. al.* [26], la secreción de MMP-2 no fue detectable por el kit ELISA utilizado en el presente estudio. Con respecto a MMP-9, de manera similar a la expresión génica, el calcitriol y el TGF- $\beta$ 1 inhibieron y estimularon su secreción, respectivamente. Asimismo, nuestros resultados demostraron que el calcitriol revierte la secreción de MMP-9 estimulada por TGF- $\beta$ 1. Estos efectos coinciden con los resultados obtenidos en cáncer de colon por Chen *et al.*[105], quienes demostraron que el calcitriol atenúa el efecto estimulante del TGF- $\beta$ 1/ $\beta$ 2 sobre la actividad de la MMP-2. Además, se ha demostrado que el colecalciferol inhibe la actividad de estas MMPs en células de cáncer de próstata RWPE2-W99 [106]. En conjunto, nuestros resultados y los de estos autores anteriores [105, 106] respaldan el papel del calcitriol como modulador tanto de la producción como de la actividad de estas proteasas.

Por otro lado, se sabe que la producción de hCG está regulada por múltiples factores a nivel celular y que la subunidad  $\beta$  es común a todas las hormonas glicoproteicas (LH, FSH y TSH) mientras que las cadenas  $\beta$  determinan la actividad biológica [141, 142]. Aunque el papel exacto de esta glicoproteína en el cáncer sigue siendo controvertido, los niveles elevados de hCG $\beta$  en orina, suero o tejido tumoral de pacientes no embarazadas se han asociado con varios tumores malignos y un mal pronóstico [143]. En nuestro estudio, mostramos por primera vez que el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 aumentó la producción de hCG $\beta$  en células PC-3 y DU145. Además, la expresión génica y la secreción de hCG $\beta$  estimulada por TGF- $\beta$  fue inhibida por calcitriol. Estos resultados están en línea con los datos obtenidos en nuestro estudio de microarreglos usando células PC-3, donde la expresión génica de varias subunidades de hCG $\beta$  (denominadas CGB1, 2, 5, 7 y 8) fueron estimuladas por TGF- $\beta$ 1 y parcialmente bloqueado en presencia de calcitriol. Se desconoce el significado biológico de estos efectos; sin embargo, la hCG induce la migración y la invasión de células DU145, al menos en parte, mediante la estimulación de MMP-2 [53, 144]. En este sentido, el calcitriol

podría regular directa e indirectamente las acciones provocadas por el TGF- $\beta$ 1 sobre el proceso migratorio y las acciones tanto de las MMPs como de la hCG $\beta$ . Vale la pena mencionar que la medición de la subunidad  $\beta$  libre en el suero y el fragmento central de la subunidad  $\beta$  de la hCG en la orina es útil como marcador tumoral de pronóstico en tumores no trofoblásticos [52].

Al buscar otros cambios específicos a nivel de genes que podrían afectar la migración por el tratamiento combinado, los datos del microarreglo mostraron que el calcitriol en combinación con TGF- $\beta$ 1 regula a la baja al gen *ITGBL1*, que codifica una proteína relacionada con la integrina beta. En particular, estudios previos informaron que una mayor expresión de ITGBL1 se asocia con tumorigénesis y mal pronóstico en una variedad de cánceres [145-148]. De hecho, el ITGBL1 promueve la EMT, la invasión y la migración mediante la activación de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B en el cáncer de próstata [146]. Aquí, validamos el impacto de esta combinación en la expresión génica de ITGBL1 en las líneas celulares PC-3 y DU145, es decir, observamos que la combinación con calcitriol y TGF- $\beta$ 1 disminuyó la expresión del gen *ITGBL1*. Además, los efectos antes mencionados están de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro ensayo de cierre de herida, donde encontramos que el calcitriol bloqueó el efecto estimulador de TGF- $\beta$ 1 sobre la migración celular en ambas líneas celulares.

Los hallazgos anteriores sugieren que el calcitriol es un regulador importante de los efectos de TGF- $\beta$  en estas líneas celulares de próstata utilizadas en el presente estudio. Además, la combinación de ambos agentes podría tener acciones sinérgicas o antagónicas sobre genes diana implicados en efectos biológicos específicos, como se ha demostrado previamente [110, 111]. Por lo tanto, estas observaciones pueden indicar que los efectos del calcitriol sobre la migración celular podrían implicar la regulación directa e indirecta de las vías de señalización de TGF- $\beta$ 1. Sin embargo, más estudios in vitro e in vivo utilizando modelos animales son adecuados para corroborar estas sugerencias.

Por lo tanto, el estudio actual sugiere que el restablecimiento coordinado de calcitriol y TGF- $\beta$  en pacientes con cáncer de próstata podría regular las acciones contra las células cancerosas, es decir, en pacientes con deficiencia de calcitriol, la suplementación con vitamina D podría ser beneficiosa para regular las acciones de TGF- $\beta$ .

## 9. CONCLUSIONES

1. La combinación del calcitriol (10nM) con el TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 (5 ng/mL) inhiben significativamente el crecimiento celular de las líneas celulares PC-3 y DU 145, en comparación con el control o los compuestos por separado.
2. El calcitriol, el TGF- $\beta$ 1, el TGF- $\beta$ 2 y su combinación no inducen apoptosis de manera significativa con respecto al control en las líneas celulares PC-3 y DU 145.
7. El calcitriol en combinación con el TGF- $\beta$ 1 induce significativamente la expresión de moléculas inhibitoras del ciclo celular como *CDKN2A*, *CDKN1A*, *IGFBP3* en las líneas celulares PC-3 y DU 145.
8. El calcitriol inhibe significativamente la expresión génica y secreción de las MMPs - 2 y -9 inducida por el TGF- $\beta$ 1 en las líneas celulares PC-3 y DU 145.
9. El calcitriol inhibe significativamente la migración de las células PC-3 y DU 145 inducida por el TGF- $\beta$ 1.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO, *Estimated age-standardized incidence and mortality rates (world) in 2020, worldwide, males, all ages*. 2020.
2. WHO. *Estimated number of incident cases, males, Mexico (top 10 cancer sites) in 2020*. 2020; Available from: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multip-bars?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=countries&population=900&populations=484&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=10&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=0&include\\_nmsc\\_other=1&type\\_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type\\_sort=0&type\\_nb\\_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D#collapse-group-0-1](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multip-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=484&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=10&group_cancer=1&include_nmsc=0&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D#collapse-group-0-1).
3. Gomella, L.G., *Effective testosterone suppression for prostate cancer: is there a best castration therapy?* Rev Urol, 2009. **11**(2): p. 52-60.
4. Antonarakis, E.S., *Management of metastatic castration-resistant prostate cancer*. Eur Urol Rev, 2011. **6**(2): p. 90-96.
5. Nishiyama, T., *Serum testosterone levels after medical or surgical androgen deprivation: a comprehensive review of the literature*. Urol Oncol, 2014. **32**(1): p. 38 e17-28.
6. Mansinho, A., et al., *Castration-resistant prostate cancer: Mechanisms, targets and treatment*, in *Molecular & Diagnostic Imaging in Prostate Cancer*. 2018, Springer. p. 117-133.
7. Huang, Y., et al., *Molecular and cellular mechanisms of castration resistant prostate cancer*. 2018. **15**(5): p. 6063-6076.
8. Shih, J.W., et al., *Non-Coding RNAs in Castration-Resistant Prostate Cancer: Regulation of Androgen Receptor Signaling and Cancer Metabolism*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(12): p. 28943-78.
9. Sharifi, N., *Mechanisms of androgen receptor activation in castration-resistant prostate cancer*. Endocrinology, 2013. **154**(11): p. 4010-7.
10. Danielpour, D., *Functions and regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) in the prostate*. Eur J Cancer, 2005. **41**(6): p. 846-57.
11. Xie, H., et al., *Infiltrated pre-adipocytes increase prostate cancer metastasis via modulation of the miR-301a/androgen receptor (AR)/TGF-beta1/Smad/MMP9 signals*. Oncotarget, 2015. **6**(14): p. 12326-39.
12. Lifshitz, V. and D. Frenkel, *TGF-β*, in *Handbook of Biologically Active Peptides*. 2013, Elsevier. p. 1647-1653.
13. Hata, A. and Y.-G.J.C.S.H.p.i.b. Chen, *TGF-β signaling from receptors to Smads*. 2016. **8**(9): p. a022061.
14. Colak, S. and P.J.T.i.c. ten Dijke, *Targeting TGF-β signaling in cancer*. 2017. **3**(1): p. 56-71.
15. Chandrasekar, T., et al., *Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC)*. 2015. **4**(3): p. 365.

16. Mirzaei, S., et al., *Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) in prostate cancer: A dual function mediator?* Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) in prostate cancer: A dual function mediator?, 2022. **206**: p. 435-452.
17. Kim, I.Y., et al., *Loss of expression of transforming growth factor beta type I and type II receptors correlates with tumor grade in human prostate cancer tissues.* 1996. **2**(8): p. 1255-1261.
18. Guo, Y., S.C. Jacobs, and N. Kyprianou, *Down-regulation of protein and mRNA expression for transforming growth factor-beta (TGF-beta1) type I and type II receptors in human prostate cancer.* Int J Cancer, 1997. **71**(4): p. 573-9.
19. Williams, R.H., et al., *Reduced levels of transforming growth factor beta receptor type II in human prostate cancer: an immunohistochemical study.* 1996. **2**(4): p. 635-640.
20. Shariat, S.F., et al., *Tissue expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 and its receptors: correlation with pathologic features and biochemical progression in patients undergoing radical prostatectomy.* 2004. **63**(6): p. 1191-1197.
21. Kim, I.Y., et al., *Loss of expression of transforming growth factor-beta receptors is associated with poor prognosis in prostate cancer patients.* 1998. **4**(7): p. 1625-1630.
22. ILIO, K.Y., J.A. SENSIBAR, and C.J.J.o.a. Lee, *Effect of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\alpha$ , and EGF on cell proliferation and cell death in rat ventral prostatic epithelial cells in culture.* 1995. **16**(6): p. 482-490.
23. Obara, K., et al., *Transforming growth factor- $\beta$ 1 regulates cell growth and causes downregulation of SMemb/non-muscle myosin heavy chain B mRNA in human prostate stromal cells.* 2005. **39**(5): p. 366-371.
24. Millena, A.C., B.T. Vo, and S.A. Khan, *JunD Is Required for Proliferation of Prostate Cancer Cells and Plays a Role in Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta)-induced Inhibition of Cell Proliferation.* J Biol Chem, 2016. **291**(34): p. 17964-76.
25. Murthy, S. and N.L. Weigel, *1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 induced growth inhibition of PC-3 prostate cancer cells requires an active transforming growth factor beta signaling pathway.* Prostate, 2004. **59**(3): p. 282-91.
26. Konrad, L., et al., *TGF-beta1 and TGF-beta2 strongly enhance the secretion of plasminogen activator inhibitor-1 and matrix metalloproteinase-9 of the human prostate cancer cell line PC-3.* Regul Pept, 2009. **155**(1-3): p. 28-32.
27. Shiota, M., et al., *Clusterin Mediates TGF- $\beta$ -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis via Twist1 in Prostate Cancer Cells.* 2012. **72**(20): p. 5261-5272.
28. Zhou, W., et al., *Dual regulation of proliferation and growth arrest in prostatic stromal cells by transforming growth factor- $\beta$ 1.* 2003. **144**(10): p. 4280-4284.
29. Lim, S. and P.J.D. Kaldis, *Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation.* 2013. **140**(15): p. 3079-3093.
30. Duronio, R.J. and Y.J.C.S.H.p.i.b. Xiong, *Signaling pathways that control cell proliferation.* 2013. **5**(3): p. a008904.
31. Heber-Katz, E., et al., *Cell cycle regulation and regeneration*, in *New Perspectives in Regeneration.* 2012, Springer. p. 253-276.
32. Haque, S., J.C.J.H.v. Morris, and immunotherapeutics, *Transforming growth factor- $\beta$ : A therapeutic target for cancer.* 2017. **13**(8): p. 1741-1750.

33. Robson, C., et al., *Transforming growth factor-beta1 up-regulates p15, p21 and p27 and blocks cell cycling in G1 in human prostate epithelium*. 1999. **160**(2): p. 257-266.
34. Guo, Y., N.J.C.g. Kyprianou, and d.t.m.b.j.o.t.A.A.f.C. Research, *Overexpression of transforming growth factor (TGF) beta1 type II receptor restores TGF-beta1 sensitivity and signaling in human prostate cancer cells*. 1998. **9**(2): p. 185-193.
35. Li, J.-M., et al., *Transforming growth factor  $\beta$  activates the promoter of cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4B through an Sp1 consensus site*. 1995. **270**(45): p. 26750-26753.
36. Cipriano, S.C. and Y.Q.J.O. Chen, *Insensitivity to growth inhibition by TGF- $\beta$ 1 correlates with a lack of inhibition of the CDK2 activity in prostate carcinoma cells*. 1998. **17**(12): p. 1549-1556.
37. Miles, F.L., et al., *Increased TGF- $\beta$ 1-mediated suppression of growth and motility in castrate-resistant prostate cancer cells is consistent with Smad2/3 signaling*. 2012. **72**(12): p. 1339-1350.
38. Gerashchenko, T.S., et al., *Markers of Cancer Cell Invasion: Are They Good Enough?* 2019. **8**(8): p. 1092.
39. Yang, J.R., et al., *Kindlin-2 promotes invasiveness of prostate cancer cells via NF-kappaB-dependent upregulation of matrix metalloproteinases*. *Gene*, 2016. **576**(1 Pt 3): p. 571-6.
40. Sehgal, G., et al., *Requirement for matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) expression in metastasis by murine prostate carcinoma*. *Am J Pathol*, 1998. **152**(2): p. 591-6.
41. Wilson, M.J., et al., *Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and their inhibitors, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2, in primary cultures of human prostatic stromal and epithelial cells*. *J Cell Physiol*, 2002. **191**(2): p. 208-16.
42. Montanari, M., et al., *Epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer: an overview*. 2017. **8**(21): p. 35376.
43. El-Chaer, W.K., C.F. Moraes, and O.T.J.J.o.a.r. Nóbrega, *Diagnosis and prognosis of prostate cancer from circulating matrix metalloproteinases and inhibitors*. 2018. **2018**.
44. Jiang, C., et al., *Membranous type matrix metalloproteinase 16 induces human prostate cancer metastasis*. 2017. **14**(3): p. 3096-3102.
45. Baspinar, S., et al., *Expression of NGF, GDNF and MMP-9 in prostate carcinoma*. 2017. **213**(5): p. 483-489.
46. Pouyanfar, N., et al., *Expression Levels of MMP9 and PIWIL2 in Prostate Cancer: a Case-Control Study*. 2016. **62**(4): p. 651-657.
47. Villar, V., J. Kocic, and J.F. Santibanez, *Skip Regulates TGF- beta 1-Induced Extracellular Matrix Degrading Proteases Expression in Human PC-3 Prostate Cancer Cells*. *Prostate Cancer*, 2013. **2013**: p. 398253.
48. Sehgal, I. and T.C. Thompson, *Novel regulation of type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9 and -2) activities by transforming growth factor-beta1 in human prostate cancer cell lines*. *Mol Biol Cell*, 1999. **10**(2): p. 407-16.
49. Festuccia, C., et al., *Osteoblast-derived TGFbeta-1 modulates matrix degrading protease expression and activity in prostate cancer cells*. *Int J Cancer*, 2000. **86**(6): p. 888.

50. Brown-Clay, J.D., et al., *PBK/TOPK enhances aggressive phenotype in prostate cancer via  $\beta$ -catenin-TCF/LEF-mediated matrix metalloproteinases production and invasion*. 2015. **6**(17): p. 15594.
51. Ahmad, F., et al., *TGF- $\beta$ -induced hCG- $\beta$  regulates redox homeostasis in glioma cells*. *Molecular cellular biochemistry*, 2015. **399**(1): p. 105-112.
52. Cole, L.A., *Biological functions of hCG and hCG-related molecules*. *Reproductive Biology Endocrinology*, 2010. **8**(1): p. 1-14.
53. Li, Z., et al., *Human chorionic gonadotropin  $\beta$  induces migration and invasion via activating ERK1/2 and MMP-2 in human prostate cancer DU145 cells*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e54592.
54. Benedetti, I. and N.J.I. Reyes, *Epithelial-mesenchymal transition in the progression of prostatic adenocarcinoma*. 2015. **28**(4): p. 420-433.
55. Odero-Marrah, V., et al., *Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and prostate cancer*, in *Cell & Molecular Biology of Prostate Cancer*. 2018, Springer. p. 101-110.
56. Liu, Z.-c., et al., *Snail regulated by PKC/GSK-3 $\beta$  pathway is crucial for EGF-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cancer cells*. 2014. **358**(2): p. 491-502.
57. Gan, Y., et al., *Differential roles of ERK and Akt pathways in regulation of EGFR-mediated signaling and motility in prostate cancer cells*. 2010. **29**(35): p. 4947-4958.
58. Graham, T.R., et al., *Insulin-like growth factor-I-dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells*. 2008. **68**(7): p. 2479-2488.
59. Zhang, J., et al., *Notch-4 silencing inhibits prostate cancer growth and EMT via the NF- $\kappa$ B pathway*. 2017. **22**(6): p. 877-884.
60. Amatangelo, M.D., et al., *c-Myc expression and MEK1-induced Erk2 nuclear localization are required for TGF-beta induced epithelial-mesenchymal transition and invasion in prostate cancer*. 2012. **33**(10): p. 1965-1975.
61. Thakur, N., et al., *TGF $\beta$ -induced invasion of prostate cancer cells is promoted by c-Jun-dependent transcriptional activation of Snail1*. 2014. **13**(15): p. 2400-2414.
62. Smith, B.N., V.A.J.C.a. Odero-Marrah, and migration, *The role of Snail in prostate cancer*. 2012. **6**(5): p. 433-441.
63. Chen, X.-H., et al., *TGF- $\beta$  and EGF induced HLA-I downregulation is associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) through upregulation of snail in prostate cancer cells*. 2015. **65**(1): p. 34-42.
64. Slabáková, E., et al., *TGF- $\beta$ 1-induced EMT of non-transformed prostate hyperplasia cells is characterized by early induction of SNAI2/Slug*. 2011. **71**(12): p. 1332-1343.
65. Shiota, M., et al., *Crosstalk between epithelial-mesenchymal transition and castration resistance mediated by Twist1/AR signaling in prostate cancer*. 2015. **22**(6): p. 889-900.
66. Cho, K.H., et al., *STAT3 mediates TGF- $\beta$ 1-induced TWIST1 expression and prostate cancer invasion*. 2013. **336**(1): p. 167-173.
67. Nakazawa, M., N.J.T.J.o.s.b. Kyprianou, and m. biology, *Epithelial-mesenchymal-transition regulators in prostate cancer: Androgens and beyond*. 2017. **166**: p. 84-90.
68. Feldman, D., et al., *The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression*. *Nat Rev Cancer*, 2014. **14**(5): p. 342-57.



69. Hanchette, C.L. and G.G. Schwartz, *Geographic patterns of prostate cancer mortality. Evidence for a protective effect of ultraviolet radiation.* *Cancer*, 1992. **70**(12): p. 2861-9.
70. Ahonen, M.H., et al., *Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (Finland).* *Cancer Causes Control*, 2000. **11**(9): p. 847-52.
71. Y., X., et al., *Positive association between circulating 25-hydroxyvitamin D levels and prostate cancer risk: new findings from an updated meta-analysis.* *Journal of cancer research and clinical oncology* 2014. **140**(9): p. 1465-77.
72. Mondul, A.M., et al., *Vitamin D and Cancer Risk and Mortality: State of the Science, Gaps, and Challenges.* *Epidemiol Rev*, 2017. **39**(1): p. 28-48.
73. Thorne, J.L., et al., *Epigenetic control of a VDR-governed feed-forward loop that regulates p21 (waf1/cip1) expression and function in non-malignant prostate cells.* 2011. **39**(6): p. 2045-2056.
74. Peehl, D.M., et al., *Antiproliferative effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on primary cultures of human prostatic cells.* 1994. **54**(3): p. 805-810.
75. Ben-Eltriki, M., et al., *Calcitriol and 20 (S)-protopanaxadiol synergistically inhibit growth and induce apoptosis in human prostate cancer cells.* 2016. **158**: p. 207-219.
76. Skowronski, R.J., D.M. Peehl, and D.J.E. Feldman, *Vitamin D and prostate cancer: 1, 25 dihydroxyvitamin D3 receptors and actions in human prostate cancer cell lines.* 1993. **132**(5): p. 1952-1960.
77. Huynh, H., M. Pollak, and J.-C.J.I.j.o.o. Zhang, *Regulation of insulin-like growth factor (IGF) II and IGF binding protein 3 autocrine loop in human PC-3 prostate cancer cells by vitamin D metabolite 1, 25 (OH) 2D3 and its analog EB1089.* 1998. **13**(1): p. 137-180.
78. Campbell, M.J., et al., *Inhibition of proliferation of prostate cancer cells by a 19-nor-hexafluoride vitamin D3 analogue involves the induction of p21waf1, p27kip1 and E-cadherin.* *J Mol Endocrinol*, 1997. **19**(1): p. 15-27.
79. Ahn, J., et al., *Vitamin D in Prostate Cancer.* *Vitam Horm*, 2016. **100**: p. 321-55.
80. Stio, M., et al., *The novel vitamin D analog ZK191784 inhibits prostate cancer cell invasion.* *Anticancer Res*, 2011. **31**(12): p. 4091-8.
81. Yang, E.S. and K.L. Burnstein, *Vitamin D inhibits G1 to S progression in LNCaP prostate cancer cells through p27Kip1 stabilization and Cdk2 mislocalization to the cytoplasm.* *J Biol Chem*, 2003. **278**(47): p. 46862-8.
82. Blutt, S.E., et al., *Calcitriol-induced apoptosis in LNCaP cells is blocked by overexpression of Bcl-2.* 2000. **141**(1): p. 10-17.
83. Zhuang, S.-H. and K.L.J.E. Burnstein, *Antiproliferative effect of 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 in human prostate cancer cell line LNCaP involves reduction of cyclin-dependent kinase 2 activity and persistent G1 accumulation.* 1998. **139**(3): p. 1197-1207.
84. Santucci, K.L., et al., *Investigation of the Impact of Cell Cycle Stage on Freeze Response Sensitivity of Androgen-Insensitive Prostate Cancer.* 2016. **15**(4): p. 609-617.
85. Boyle, B.J., et al., *Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates 1 alpha,25-dihydroxyvitamin d(3) growth inhibition in the LNCaP prostate cancer cell line through p21/WAF1.* *J Urol*, 2001. **165**(4): p. 1319-24.

86. Danielpour, D.J.J.o.c.p., *Induction of transforming growth factor- $\beta$  autocrine activity by all-trans-retinoic acid and 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in NRP-152 rat prostatic epithelial cells.* 1996. **166**(1): p. 231-239.
87. Bizzarri, M., et al., *Melatonin and vitamin D<sub>3</sub> increase TGF-beta1 release and induce growth inhibition in breast cancer cell cultures.* J Surg Res, 2003. **110**(2): p. 332-7.
88. Mercier, T., et al., *Calcitriol and lexicalcitol (KH1060) inhibit the growth of human breast adenocarcinoma cells by enhancing transforming growth factor-beta production.* Biochem Pharmacol, 1996. **52**(3): p. 505-10.
89. Koli, K. and J. Keski-Oja, *1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> enhances the expression of transforming growth factor beta 1 and its latent form binding protein in cultured breast carcinoma cells.* Cancer Res, 1995. **55**(7): p. 1540-6.
90. Chen, A., et al., *Transforming growth factor-beta 1 signaling contributes to Caco-2 cell growth inhibition induced by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **283**(4): p. G864-74.
91. Zhuang, S.H., et al., *Vitamin D receptor content and transcriptional activity do not fully predict antiproliferative effects of vitamin D in human prostate cancer cell lines.* Mol Cell Endocrinol, 1997. **126**(1): p. 83-90.
92. Christakos, S., et al., *Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects.* Physiol Rev, 2016. **96**(1): p. 365-408.
93. Norman, A.W., *From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health.* Am J Clin Nutr, 2008. **88**(2): p. 491S-499S.
94. Japelt, R.B. and J. Jakobsen, *Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis.* Front Plant Sci, 2013. **4**: p. 136.
95. Gilbert, R., et al., *Associations of vitamin D pathway genes with circulating 25-hydroxyvitamin-D, 1, 25-dihydroxyvitamin-D, and prostate cancer: a nested case-control study.* 2015. **26**(2): p. 205-218.
96. Tannour-Louet, M., et al., *Increased expression of CYP24A1 correlates with advanced stages of prostate cancer and can cause resistance to vitamin D<sub>3</sub>-based therapies.* 2014. **28**(1): p. 364-372.
97. Holick, M.F., et al., *Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline.* J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(7): p. 1911-30.
98. Bikle, D.D., *Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications.* Chem Biol, 2014. **21**(3): p. 319-29.
99. Nemere, I., et al., *Ribozyme knockdown functionally links a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> membrane binding protein (1,25D<sub>3</sub>-MARRS) and phosphate uptake in intestinal cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(19): p. 7392-7.
100. Huhtakangas, J.A., et al., *The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 alpha,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> in vivo and in vitro.* Mol Endocrinol, 2004. **18**(11): p. 2660-71.
101. Hii, C.S. and A. Ferrante, *The Non-Genomic Actions of Vitamin D.* Nutrients, 2016. **8**(3): p. 135.
102. Bao, B.Y., Yeh, S. D., & Lee, Y. F, *1 $\alpha$ , 25 dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> inhibits prostate cancer cell invasion via modulation of selective proteases.* Carcinogenesis, 2006. **27**: p. 32-42.

103. Bao Bo-Ying, S.-D.Y.a.Y.-F.L., *1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits prostate cancer cell invasion via modulation of selective proteases*. Advance Access publication 2005. **21**(1): p. 32-42.
104. Schwartz, G.G., et al., *1  $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D (calcitriol) inhibits the invasiveness of human prostate cancer cells*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1997. **6**(9): p. 727-32.
105. Chen S, et al., *1,25(OH) $_2$ D $_3$  attenuates TGF- $\beta$ 1/ $\beta$ 2-induced increased migration and invasion via inhibiting epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **468**(1-2): p. 130–135.
106. Tokar, E.J., M.M.J.C. Webber, and e. metastasis, *Cholecalciferol (vitamin D 3) inhibits growth and invasion by up-regulating nuclear receptors and 25-hydroxylase (CYP27A1) in human prostate cancer cells*. 2005. **22**(3): p. 275-284.
107. Sung, V., D.J.M. Feldman, and c. endocrinology, *1, 25-Dihydroxyvitamin D3 decreases human prostate cancer cell adhesion and migration*. 2000. **164**(1-2): p. 133-143.
108. Hsu, J.-W., et al., *Suppression of prostate cancer cell rolling and adhesion to endothelium by 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D $_3$* . 2011. **178**(2): p. 872-880.
109. Solomon, J.D., et al., *VDR activity is differentially affected by Hic-5 in prostate cancer and stromal cells*. Mol Cancer Res, 2014. **12**(8): p. 1166-80.
110. Ricca, C., et al., *Vitamin D inhibits the epithelial-mesenchymal transition by a negative feedback regulation of TGF- $\beta$  activity*. 2019. **187**: p. 97-105.
111. Yanagisawa, J., et al., *Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators*. Science, 1999. **283**(5406): p. 1317-21.
112. Vichai, V. and K. Kirtikara, *Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening*. Nat Protoc, 2006. **1**(3): p. 1112-6.
113. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
114. Carvalho, B.S. and R.A. Irizarry, *A framework for oligonucleotide microarray preprocessing*. Bioinformatics, 2010. **26**(19): p. 2363-2367.
115. Durinck, S., et al., *Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt*. Nature protocols, 2009. **4**(8): p. 1184-1191.
116. Ritchie, M.E., et al., *limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies*. 2015. **43**(7): p. e47-e47.
117. Chen, E.Y., et al., *Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool*. BMC bioinformatics, 2013. **14**(1): p. 1-14.
118. Bradford, H. and C. Richards, *Specific release of endogenous glutamate from piriform cortex stimulated in vitro*. Brain research, 1976. **105**(1): p. 168-172.
119. Grada, A., et al., *Research techniques made simple: analysis of collective cell migration using the wound healing assay*. J Invest Dermatol, 2017. **137**(2): p. e11-e16.
120. Hwa, V., Y. Oh, and R.G. Rosenfeld, *Insulin-like growth factor binding protein-3 and-5 are regulated by transforming growth factor- $\beta$  and retinoic acid in the human prostate adenocarcinoma cell line PC-3*. J Endocrine, 1997. **6**(3): p. 235-242.

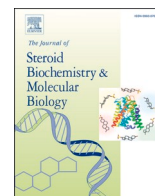
121. Cuzick, J., et al., *Prognostic value of an RNA expression signature derived from cell cycle proliferation genes in patients with prostate cancer: a retrospective study*. The lancet oncology, 2011. **12**(3): p. 245-255.
122. Malhotra, S., et al., *A tri-marker proliferation index predicts biochemical recurrence after surgery for prostate cancer*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20293.
123. Wang, X., et al., *The in vitro effect of vitamin D3 analogue EB-1089 on a human prostate cancer cell line (PC-3)*. Br J Urol, 1997. **80**(2): p. 260-2.
124. Marchiani, S., et al., *The vitamin D analogue BXL-628 inhibits growth factor-stimulated proliferation and invasion of DU145 prostate cancer cells*. J Cancer Res Clin Oncol, 2006. **132**(6): p. 408-416.
125. Blutt, S.E., et al., *A calcitriol analogue, EB1089, inhibits the growth of LNCaP tumors in nude mice*. Cancer research, 2000. **60**(4): p. 779-782.
126. Al-Azayzih, A., et al., *TGFbeta1 induces apoptosis in invasive prostate cancer and bladder cancer cells via Akt-independent, p38 MAPK and JNK/SAPK-mediated activation of caspases*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **427**(1): p. 165-70.
127. Rajah, R., B. Valentinis, and P. Cohen, *Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor- $\beta$ 1 on programmed cell death through a p53-and IGF-independent mechanism*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(18): p. 12181-12188.
128. Igarashi, K., et al., *Molecular evidence of IGFBP-3 dependent and independent VD3 action and its nonlinear response on IGFBP-3 induction in prostate cancer cells*. BMC cancer, 2020. **20**(1): p. 1-13.
129. Wegiel, B., et al., *Multiple cellular mechanisms related to cyclin A1 in prostate cancer invasion and metastasis*. Natl Cancer Inst, 2008. **100**(14): p. 1022-1036.
130. Miftakhova, R., et al., *Cyclin A1 and P450 aromatase promote metastatic homing and growth of stem-like prostate cancer cells in the bone marrow*. Cancer research, 2016. **76**(8): p. 2453-2464.
131. Chen, Z. and W.J.I.j.o.m.s. Lu, *Roles of ubiquitination and SUMOylation on prostate cancer: mechanisms and clinical implications*. 2015. **16**(3): p. 4560-4580.
132. Gao, X., et al., *UBE2D3 gene overexpression increases radiosensitivity of EC109 esophageal cancer cells in vitro and in vivo*. 2016. **7**(22): p. 32543.
133. Guan, G.G., et al., *UBE2D3 is a positive prognostic factor and is negatively correlated with hTERT expression in esophageal cancer*. Oncology letters, 2015. **9**(4): p. 1567-1574.
134. Yang, H., et al., *Downregulation of ubiquitin-conjugating enzyme UBE2D3 promotes telomere maintenance and radioresistance of Eca-109 human esophageal carcinoma cells*. Journal of Cancer, 2016. **7**(9): p. 1152.
135. Hosseini, S.M., et al., *E2 ubiquitin-conjugating enzymes in cancer: Implications for immunotherapeutic interventions*. Clinica Chimica Acta, 2019. **498**: p. 126-134.
136. Mittal, M.K., et al., *SLUG-induced elevation of D1 cyclin in breast cancer cells through the inhibition of its ubiquitination*. J Biol Chem, 2011. **286**(1): p. 469-479.
137. Scanlan, M.J., A. Simpson, and L. Old, *The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary*. Cancer Immun, 2004. **4**(1): p. 1.
138. Suyama, T., et al., *Expression of cancer/testis antigens in prostate cancer is associated with disease progression*. The Prostate, 2010. **70**(16): p. 1778-1787.
139. Yang, K., et al., *Ursolic acid promotes apoptosis and mediates transcriptional suppression of CT45A2 gene expression in non-small-cell lung carcinoma*

- harbouring EGFR T790M mutations*. British journal of pharmacology, 2019. **176**(24): p. 4609-4624.
140. Maxfield, K.E., et al., *Comprehensive functional characterization of cancer–testis antigens defines obligate participation in multiple hallmarks of cancer*. 2015. **6**(1): p. 1-15.
141. Barrera, D., et al., *Calcitriol affects hCG gene transcription in cultured human syncytiotrophoblasts*. Reprod Biol Endocrinol, 2008. **6**(1): p. 1-8.
142. Barrera, D., M. Chirinos, and R. Garcia-Becerra, *Mechanism of regulation of synthesis and secretion of human Chorionic Gonadotropin (hCG) during pregnancy*. Revista de Investigación Clínica, 2008. **60**(2): p. 124-132.
143. Stenman, U.-H., H. Alfthan, and K. Hotakainen, *Human chorionic gonadotropin in cancer*. Clinical biochemistry, 2004. **37**(7): p. 549-561.
144. Wu, W. and A.M. Walker, *Human chorionic gonadotropin  $\beta$  (HCG $\beta$ ) down-regulates E-cadherin and promotes human prostate carcinoma cell migration and invasion*. Cancer 2006. **106**(1): p. 68-78.
145. Huang, W., et al., *ITGBL1 promotes cell migration and invasion through stimulating the TGF- $\beta$  signalling pathway in hepatocellular carcinoma*. Cell proliferation, 2020. **53**(7): p. e12836.
146. Li, W., et al., *ITGBL1 promotes EMT, invasion and migration by activating NF- $\kappa$ B signaling pathway in prostate cancer*. Onco Targets Ther, 2019. **12**: p. 3753.
147. Cortez, A.J., et al., *Evaluation of the Role of ITGBL1 in Ovarian Cancer*. Cancers, 2020. **12**(9): p. 2676.
148. Qi, L., F. Song, and Y. Ding, *Regulatory mechanism of ITGBL1 in the metastasis of colorectal cancer*. Frontiers in Oncology, 2020. **10**: p. 259.
149. Campos Aviles, M.B., *Efecto del calcitriol en combinación con el TGF- $\beta$ 1 sobre la expresión de la gonadotropina coriónica humana y su receptor en la línea celular de cáncer de próstata humano DU-145*. UNAM, 2019(Tesis de Licenciatura )

## **11. ANEXO: ARTÍCULO REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO**

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

## Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jsbmb](http://www.elsevier.com/locate/jsbmb)Regulation of anti-tumorigenic pathways by the combinatory treatment of calcitriol and TGF- $\beta$  in PC-3 and DU145 cells

Mitzi García-Olivares<sup>a</sup>, Sandra Romero-Córdoba<sup>b,c</sup>, Elizabeth Ortiz-Sánchez<sup>d</sup>, Rocío García-Becerra<sup>e</sup>, Mariana Segovia-Mendoza<sup>f</sup>, Claudia Rangel-Escareño<sup>g,h</sup>, Ali Halhali<sup>a</sup>, Fernando Larrea<sup>a</sup>, David Barrera<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biología de la Reproducción "Dr. Carlos Gual Castro", Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Av. Vasco de Quiroga No. 15, Col. Belisario Domínguez, Sección XVI, Ciudad de México, 14080, México

<sup>b</sup> Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Av. Vasco de Quiroga No. 15, Col. Belisario Domínguez, Sección XVI, Ciudad de México, 14080, México

<sup>d</sup> Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud, Ciudad de México, México

<sup>e</sup> Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Ciudad de México, México

<sup>f</sup> Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Ciudad de México, 04510, México

<sup>g</sup> Laboratorio de Genómica Computacional y Biología Integrativa, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur 4809, Ciudad de México, 14610, México

<sup>h</sup> Departamento de Ingeniería y Ciencias, Tecnológico de Monterrey, Epigmenio González 500, Soriana, 76140 Santiago de Querétaro, Qro. México

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Calcitriol  
TGF- $\beta$   
IGFBP3  
CDKN1A  
CCNA1  
CT45A2  
UBE2D3  
Prostate cancer cells  
Microarray

## ABSTRACT

Calcitriol and transforming growth factors beta (TGF- $\beta$ ) are involved in several biological pathways such as cell proliferation, differentiation, migration and invasion. Their cellular effects could be similar or opposite depending on the genetic target, cell type and context. Despite the reported association of calcitriol deficiency and disruption of the TGF- $\beta$  pathway in prostate cancer and the well-known independent effects of calcitriol and TGF- $\beta$ s on cancer cells, there is limited information regarding the cellular effects of calcitriol and TGF- $\beta$  in combination. In this study, we *in vitro* analyze the combinatory effects of calcitriol and TGF- $\beta$  on cell growth and apoptosis using PC-3 and DU145 human prostate cancer cell lines. Using high-throughput microarray profiling of PC-3 cells upon independent and combinatory treatments, we identified distinct transcriptional landscapes of each intervention, with a higher effect established by the combinatorial treatment, following by TGF- $\beta$ 1 and later by calcitriol. A set of genes and enriched pathways converge among the treatments, mainly between the combinatory scheme and TGF- $\beta$ 1, but the majority were treatment-specific. Of note, CYP24A1, IGFBP3, CDKN1A, NOX4 and UBE2D3 were significantly up-regulated upon the combinatorial treatment whereas CCNA1, members of the CT45A and APOBEC3 family were down-regulated. By public RNA signatures, we were able to confirm the regulation by the co-treatment over cell proliferation and cell cycle. We finally investigated the possible clinical impact of genes modulated by the combinatorial treatment using benchmark prostate cancer data. This comprehensive analysis reveals that the combinatory treatment impairs cell growth without affecting apoptosis and their combinatory actions might synergize and improved their individual effects to reprogram prostate cancer signaling.

## 1. Introduction

1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D (calcitriol), is a secosteroid that

participates not only in calcium homeostasis but also in cell proliferation, differentiation, angiogenesis, migration and apoptosis in vitamin D responsive cells [1–7]. In human prostate cancer, several studies have

\* Corresponding author at: Departamento de Biología de la Reproducción, Dr. Carlos Gual Castro, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 14080, Ciudad de México, Mexico.

E-mail address: [barrera1912@gmail.com](mailto:barrera1912@gmail.com) (D. Barrera).

<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.105831>

Received 15 October 2020; Received in revised form 22 January 2021; Accepted 24 January 2021

Available online 11 February 2021

0960-0760/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

shown the anti-proliferative effects of calcitriol as well as those on adhesion, migration and invasiveness [8–11]. Calcitriol effects on cell growth might be in part explained by the activity of growth factors such as transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) and insulin like growth factor binding protein 3 (IGFBP3) [12–14]. The identification in prostate cells of vitamin D-activating enzyme CYP27B1 and the vitamin D receptor (VDR) [5], highlight the potential role of this hormone to regulate specific pathways in these cells. Relevantly, it has been reported that calcitriol analogs with less calcemic effects are attractive therapeutic agents against different types of cancer [15].

Regarding TGF- $\beta$ , it has been demonstrated that this growth factor can act as a tumor suppressor in normal cells and in early stages of cancer, or enhance malignancy in advanced tumors [16,17]. Despite the paradoxical actions of TGF- $\beta$  in prostate cancer, robust evidence pointed out its effect over cell growth by inhibiting the proliferation of castration-resistant prostate cancer cell lines (CRPC) [18–26]. In general, canonical TGF- $\beta$  pathway occurs by its interaction with its membrane receptors, forming a bi-dimeric receptor complex between TGF- $\beta$  type I and II receptors, which subsequently propagates the signal through SMADs proteins [16,27,28].

Notably, it has been described that TGF- $\beta$  signaling can crosstalk with calcitriol pathway, for example, SMAD3 protein can interact with the VDR [29]. As suggested by previous studies [29–31], the combination of both agents could have synergistic or antagonistic actions upon target genes to control specific actions.

Considering that many studies have associated the calcitriol deficiency and/or the imbalance of TGF- $\beta$  in prostate cancer development [5,32], the present work studied the *in vitro* effects of calcitriol, TGF- $\beta$ 1 or TGF- $\beta$ 2 and their combination on cell growth and apoptosis using human prostate cancer cell lines (PC-3 and DU145). Additionally, to investigate the genome-wide impact of the independent treatments and the combinatory one, we analyzed the gene expression profiles of treated PC-3 cells by microarrays. Our results showed that exposed cells to the diverse treatments exhibit common and unique altered genes enriched in different pathways, but in general relevant cell signaling, migration and adhesion pathways were affected. Importantly, by distinguishing treatment-dependent gene expression profiles, we found modulation of active pathways involved in tumorigenesis such as cell metabolism, extracellular matrix organization, among others. Overall, our analysis reveals novel modulated genes and pathways by the combinatory treatment with important implications in cancer programs that may disturb the evolution of prostate cancer.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Culture media, fetal bovine serum (FBS), Trypsin-EDTA, Trizol and all oligonucleotides for real time polymerase chain reaction (PCR) were purchased from Invitrogen (CA, USA). LightCycler® 480 probes master kit, TaqMan Master reaction, TaqMan probes, 96 well PCR microplates and the reverse transcription (RT) system were obtained from Roche (Roche Applied Science, IN, USA), calcitriol (1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol) and its analogue; EB1089 was obtained from sigma chemicals whereas recombinant human TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 were purchased from PeproTech (Rocky Hill, NJ).

### 2.2. Cell lines and culture conditions

Human prostate cancer cell lines PC-3 (ATCC® CRL-1435™) and DU145 (ATCC® HTB-81™) were purchased from American Type Cell Culture Collection (Manassas, VA). Lot numbers of PC-3 and DU145 cell lines used in the present study were 61777391 and 61761869, respectively. The authenticity of these human cell lines was done by STR analysis and the absence of mycoplasma was verified using Hoechst DNA stain (indirect) method and Agar culture (direct) method as

indicated in the ATCC Certificate of Analysis.

Cells were seeded in RPMI-1640 medium supplemented with 5 % fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin G sodium, 100  $\mu$ g/mL streptomycin sulfate and 0.25  $\mu$ g/mL amphotericin B. Cell viability was determined using trypan blue method.

### 2.3. Sulphorhodamine B (SRB) method

Cell growth was determined using the protein-binding dye SRB in microculture assays. Cells (1250 per well) were seeded in 96-wells tissue culture plates (Costar) and incubated at 37 °C for 24 h. Incubations were performed in the presence or absence of calcitriol or its analog (0.1, 1.0, 10 and 100 nM) or TGF- $\beta$ s (0.1, 1.0, 5.0 and 10 ng/mL) for 6 days. Additionally, co-incubations of calcitriol (10 nM) with TGF- $\beta$ 1 or TGF- $\beta$ 2 (5 ng/mL) were tested. After incubation, the cells were fixed and stained by the addition of cold 10 % aqueous trichloroacetic acid and SRB solution, respectively. Absorption at 510 nm was obtained and cell growth determined, as previously described [33].

### 2.4. Apoptosis assay

Cell apoptosis was analyzed by double staining with annexin V and propidium iodide (PI). This was conducted using an Alexa Fluor 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Cells were plated at a density of 40,000 cells in six well plates with 2 mL of supplemented medium per well and 24 h after were treated with 10 nM and 5 ng/mL of calcitriol and TGF- $\beta$ s, respectively, or their combination for 4 days. Next, cells were detached with ethylenediaminetetraacetic acid (0.02 % EDTA), collected and washed with cold phosphate-buffered saline solution (PBS). An Alexa Fluor 488 anti-annexin V antibody (1:25) was used in combination with PI (100  $\mu$ g/mL) to stain apoptotic cells. After 20 min of incubation at room temperature in the dark, cells were fixed with 4 % paraformaldehyde in PBS and stored at 4 °C until read. The stained cells were analyzed using a flow cytometer (FACSCalibur, BD) to determine the apoptotic cell population. Fluorescence emission was measured at 530 and 575 nm using an excitation wavelength of 488 nm.

### 2.5. RNA isolation and microarray hybridization

Cells were plated at a density of 150,000 cells in six well plates with supplemented medium and incubated with calcitriol (10 nM), TGF- $\beta$ 1 (5 ng/mL) or their combination during 24 h. Afterward, RNA was extracted for gene expression studies. Total RNA from treated cells was isolated using Trizol reagent [34]. In all cases, the amount RNA was estimated spectrophotometrically at 260/280 nm using a Synergy HT (Biotek, USA).

The quality of the RNA was checked on an Agilent BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA). Samples with RNA integrity number >9.0 were further processed on Clariom D human microarray to assess global gene expression (Affymetrix, Santa Clara, USA). Two arrays with independent experiments per condition were evaluated for a total N = 8. The hybridization, washing and scan procedures were performed according to manufacturer's protocol on INMEGEN core facility.

### 2.6. Gene expression and pathway enrichment analysis

The signal intensities of the Clariom D array were background corrected by RMA and normalized by quantile algorithm with oligo [35] package of Bioconductor. Genes were annotated with biomaRt [36] and duplicate probes for the same gene were collapsed by selecting the probe with the highest interquartile range. Differentially expressed profiles on protein coding genes were computed with the limma [37] package by a moderate *t*-test and adjusted p-value by FDR method. Genes with a log fold change  $\pm$  0.5 and p value < 0.05 were considered statistically



significant. Profiling data is available through Gene Expression Omnibus data repository (GEO) with accession number GSE159116.

Comprehensive pathway enrichment analysis was performed with Enrichr tool [38] using Kegg and biological process gene ontology annotations to map genes to each biological term. Pathways with p-values (Fisher test)  $\leq 0.05$ , combined score  $>10$  and at least 4 annotated gene members were considered significant. Plots were performed on R with ggplot package.

## 2.7. Quantitative PCR

2  $\mu$ g of high quality total cell RNA from each sample was reverse transcribed using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Primers and probes for PCR amplifications, Table 1, were designed with the online software from Universal Probe Library Assay Design Center of Roche ([https://lifescience.roche.com/en\\_mx/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center](https://lifescience.roche.com/en_mx/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center)). Identical PCR conditions were performed for all genes and in all cases, results were normalized against glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) used as housekeeping gene. Real time PCR amplifications were carried on a LightCycler® 480 II (Roche), as previously described [39].

## 2.8. Western blot assay

CDKN1A and CDKN2A protein expression was evaluated by Western blot. Briefly, cells were incubated in absence or presence of calcitriol and TGF- $\beta$  alone or in co-incubation during 48 h. Afterward, cells were lysed in RIPA buffer (8.1 mM dibasic sodium phosphate, 1.5 mM monobasic sodium phosphate, 2.7 mM potassium chloride 137 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, pH 7.4) and proteases inhibitors. Protein content was determined and equal amounts (25  $\mu$ g protein) were separated on 15 % SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blocked overnight in TBST (20 mM Tris-base, 500 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) containing 5 % skim milk. Then, membranes were washed and incubated overnight at room temperature in the presence of anti-CDKN1A (1:100, sc-6246, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-CDKN2A (1:100, sc-166760, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) and anti-GAPDH (1:10000, Sigma, G8795 USA) overnight at 4 °C. Membranes were incubated in the presence of secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (1:2000, sc-2031, Santa Cruz Biotechnology) for 2 h at room temperature. The immunoblots were visualized by chemiluminescence using the ECL Plus (Amersham Pharmacia, UK). Visualization was achieved by Molecular Imagen ChemiDoc XRS System (Bio-Rad, Hercules, California, USA) and the densitometry was performed by ImageJ software.

## 2.9. Prostate cancer patient-derived RNA-seq data from TCGA dataset

Tumoral and normal HT-Seq raw counts from RNAseq and clinical patient information were downloaded from Xena database (<https://xenabrowser.net/datapages/>). Low expressed ( $< 10$  counts) raw counts were filtered, and DESeq2 package on R [40] were computed to

**Table 1**

Oligonucleotides and probes used for real time PCR analysis.

Gen	Upper primer	Lower primer	Amplicon (nt)	<sup>a</sup> Probe	Accession Number
CYP24A1	CATCATGGCCATCAAACAA	GCAGCTCGACTGGAGTGAC	65	88	NM_000782.3
IGFBP3	AACGCTAGTGCCGTCAGC	CGGCTCTCCCTCCGACTCAC	104	1	NM_001013398.1
CCNA1	AAATGGGCAGTACAGGAGGA	CCACAGTCAGGGAGTGCTTT	111	78	NM_003914.3
CDKN1A	TCACTGTCTGTACCCCTGTGC	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA	127	32	BC000312.2
CDKN2A	CTACTGAGGAGCCAGCGTCTA	CTGCCATCATCATGACCT	66	66	BC015960.2
UBE2D3	CCTCACATCGGTCTGTGC	AGGATTGTCTCGTCTCACACC	104	53	NM_003340.6
CT45A2	CACTGCCATTTTGTGAGGTG	CTGTTTTATGGTTCATTGTTTCC	25	64	NM_152582.6
GAPDH	AGCCACATCGCTGAGACAC	GCCCAATACGACCAATCC	66	60	AF261085.1

From the universal probe library (Roche).

normalize and to perform the differential expression profiles on coding genes between tumor vs normal adjacent tissue, tumors with high Gleason score ( $>8$ ) vs low Gleason score (6–7) and tumors with biochemical recurrence vs tumor without it.

## 2.10. Statistical analysis

The results were expressed as the mean  $\pm$  S.D. Statistical differences were determined by one-way ANOVA followed by appropriate post hoc tests (Holm-Sidak method for pairwise comparisons), using a specialized software package (SigmaPlot 11.0, Jandel Scientific). Experiments were performed from at least three separated cell cultures. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Effects of calcitriol, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 and EB1089 treatment on cell growth of PC-3 and DU145 cell lines

Preclinical *in vitro* functional evaluation on PC-3 and DU145 human prostate cancer cell lines seeded under different concentrations of calcitriol, TGF- $\beta$ 1 or TGF- $\beta$ 2 were performed. Both calcitriol and TGF- $\beta$ s significantly inhibited ( $p < 0.05$ ) the growth of PC-3 and DU145 cell lines at the highest concentrations (Fig. 1A-C). To further corroborate the ability of vitamin D to control cell growth, cells were treated with EB1089, a synthetic analogue of vitamin D, which resulted in a higher inhibition of cell than calcitriol, mainly in DU145 cell model (Supplementary Fig. 1A).

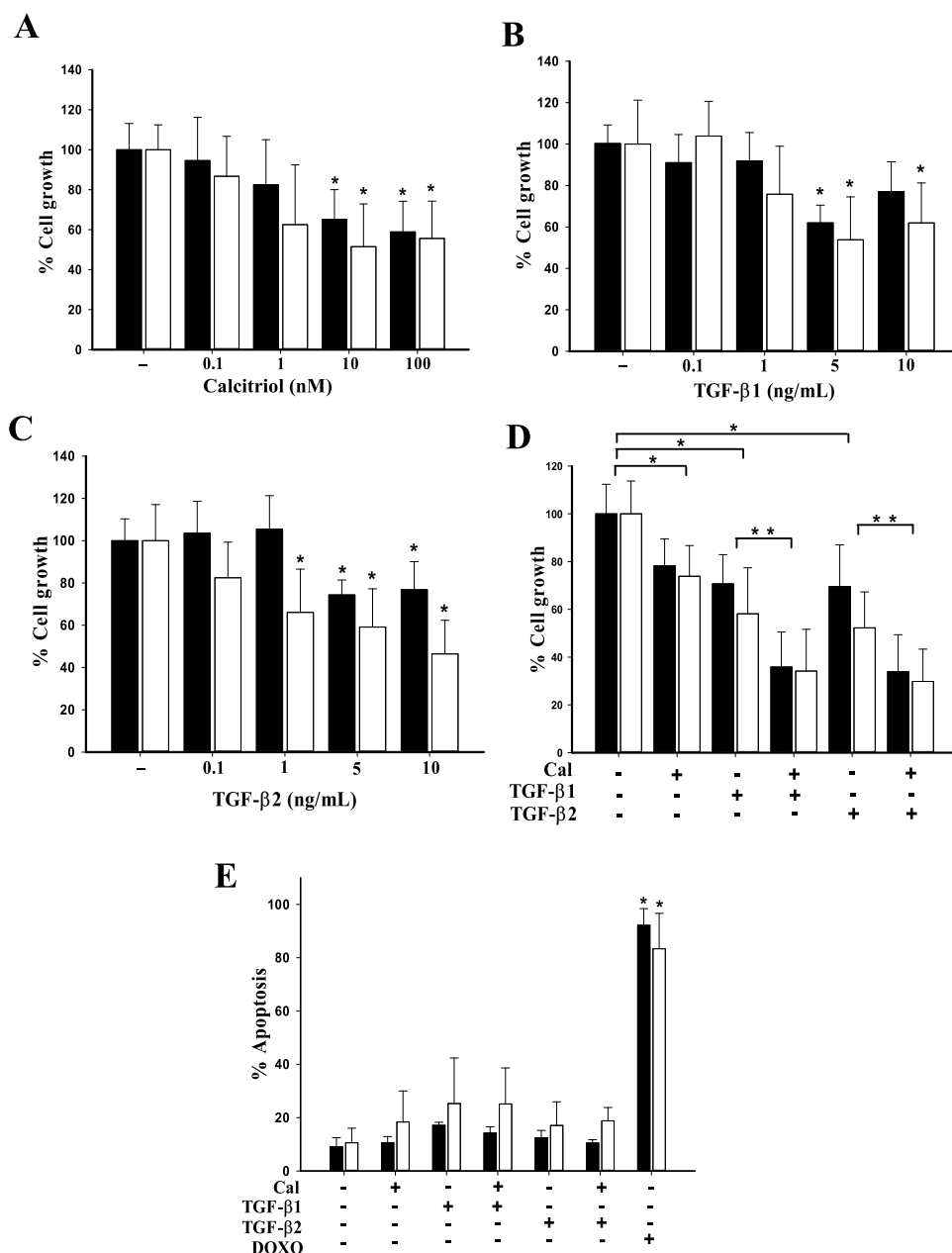
Considering the above results, for further experiments, we used 10 nM of calcitriol and 5 ng/mL of TGF- $\beta$ 1 or TGF- $\beta$ 2, the minimum concentrations in which significant differences were observed in both cell lines. Relevantly, co-incubation of calcitriol with TGF- $\beta$ 1 or TGF- $\beta$ 2 resulted in the most significant inhibition of cell growth in comparison to what observed with each independent treatment ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1D). This result suggests that combinatory treatment is the strongest mean to negative modulate *in vitro* cell growth rates.

### 3.2. Calcitriol and TGF- $\beta$ 1 did not affect cell apoptosis on PC-3 and DU145 cell lines

We then studied if apoptosis might be involved in the cell growth impairment identified under the treatment with the compounds. As shown in Fig. 1E, apoptosis was not significantly increased by the treatments, alone or in combination, compared with control condition in both cell lines. Since similar phenotypic results were identified upon treatment with TGF- $\beta$ 1 or TGF- $\beta$ 2, consecutive experiments were carried out only with TGF- $\beta$ 1 incubation.

### 3.3. Transcriptional landscape induced by calcitriol, TGF- $\beta$ 1 or combinatorial treatment on PC-3 cell line

To get a deeper overview of the molecular mechanism that governs calcitriol and TGF- $\beta$ 1 treatment, alone or in combination, we profiled



**Fig. 1.** Effects on cell growth and apoptosis exerted by calcitriol and TGF-βs treatment in prostate cancer cell lines. PC-3 (■) and DU145 (□) were incubated during 6 days with A) calcitriol, B) TGF-β1, C) TGF-β2 and D) calcitriol (Cal; 10 nM) in combination with TGF-β1 or TGF-β2 (5 ng/mL). Results are the mean ± S.D. of sextuplicate and represented at least three different experiments. E) Apoptotic effect of treatments for 4 days. Percentage of apoptotic cells are shown using Doxycycline (DOXO) as positive control. Data are representative of four independent experiments. Data were normalized to 100 % of the control for each experiment. \**p* < 0.05 vs control, \*\**p* < 0.05 vs each compound alone.

the transcriptional landscape of treated PC-3 prostate cancer cells. Microarray analyses revealed a set of differentially expressed genes (logFC: ± 0.5, *p* value < 0.05) induced by the treatments (Supplementary Table 1). The larger fraction of treatment-regulated genes was identified under the combinatory treatment (N = 1371), following by TGF-β1 incubation (N = 834) and lastly calcitriol conditioning (N = 398) (Fig. 2A). Of note, most of the transcriptional effects of both treatments resulted in the down-modulation of several transcripts (Fig. 2A). Comparing the transcriptomes of each treatment, most of the differentially expressed genes were exclusive to each treatment, although some genes were overlapped by the different conditions (Fig. 2B). In fact, there was a much stronger overlap between the combinatory treatment and TGF-β1 than between calcitriol (Fig. 2B).

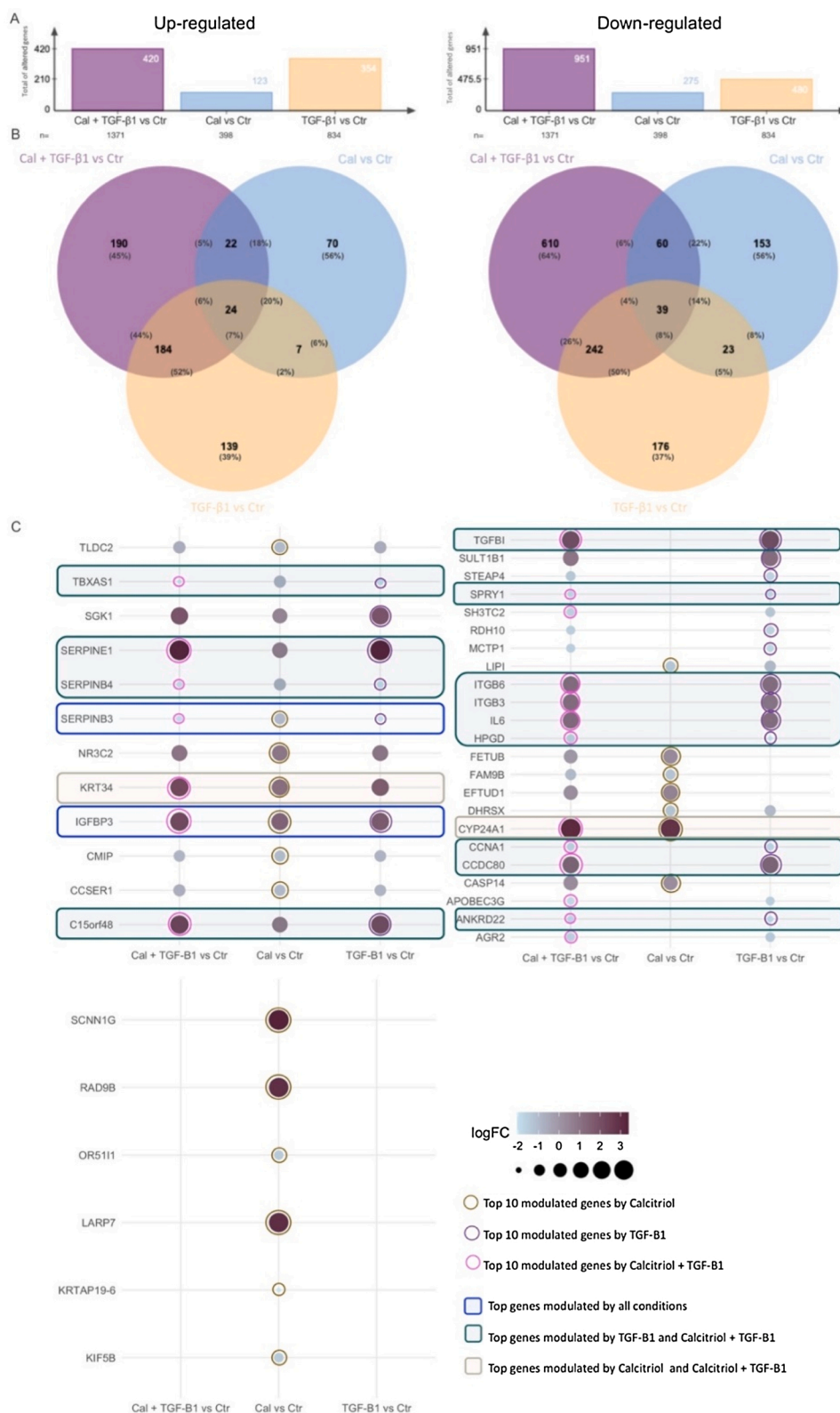
Notably, we found that some of the top 20 up or down regulated genes in the combinatorial treatment were also found in the top 20 of each independent treatment. 12 of the top 20 genes differentially expressed were also modulate in the independent TGF-β1 treatment, while 3 top altered genes were commonly modulated by calcitriol and

the combinatory treatment (Fig. 2C, Supplementary Table 1). Additionally, cells under calcitriol treatment exclusively affect 6 top genes (Fig. 2C, Supplementary Table 1).

Overall, these findings suggest that a relevant portion of the modulated RNA is unique to each treatment and that TGF-β1 is a driver modulator of gene expression programs under the combinatory treatment, and thus it might have a more prominent role in the control of cellular responses.

#### 3.4. Differential gene expression of CYP24A1, IGFBP3, CCNA1 and CDKN1A were validated by qPCR

We next sought to independently validate some of the top 20 altered genes through qPCR (Fig. 3A). As expected; CYP24A1 and IGFBP3 were up-regulated by calcitriol on both evaluated cell lines, similar to the microarray data. Consistently, IGFBP3 was significantly up-modulated by TGF-β1. Likewise, CYP24A1 and IGFBP3 were significantly over-expressed whereas CCNA1 was down-modulated by the combinatorial

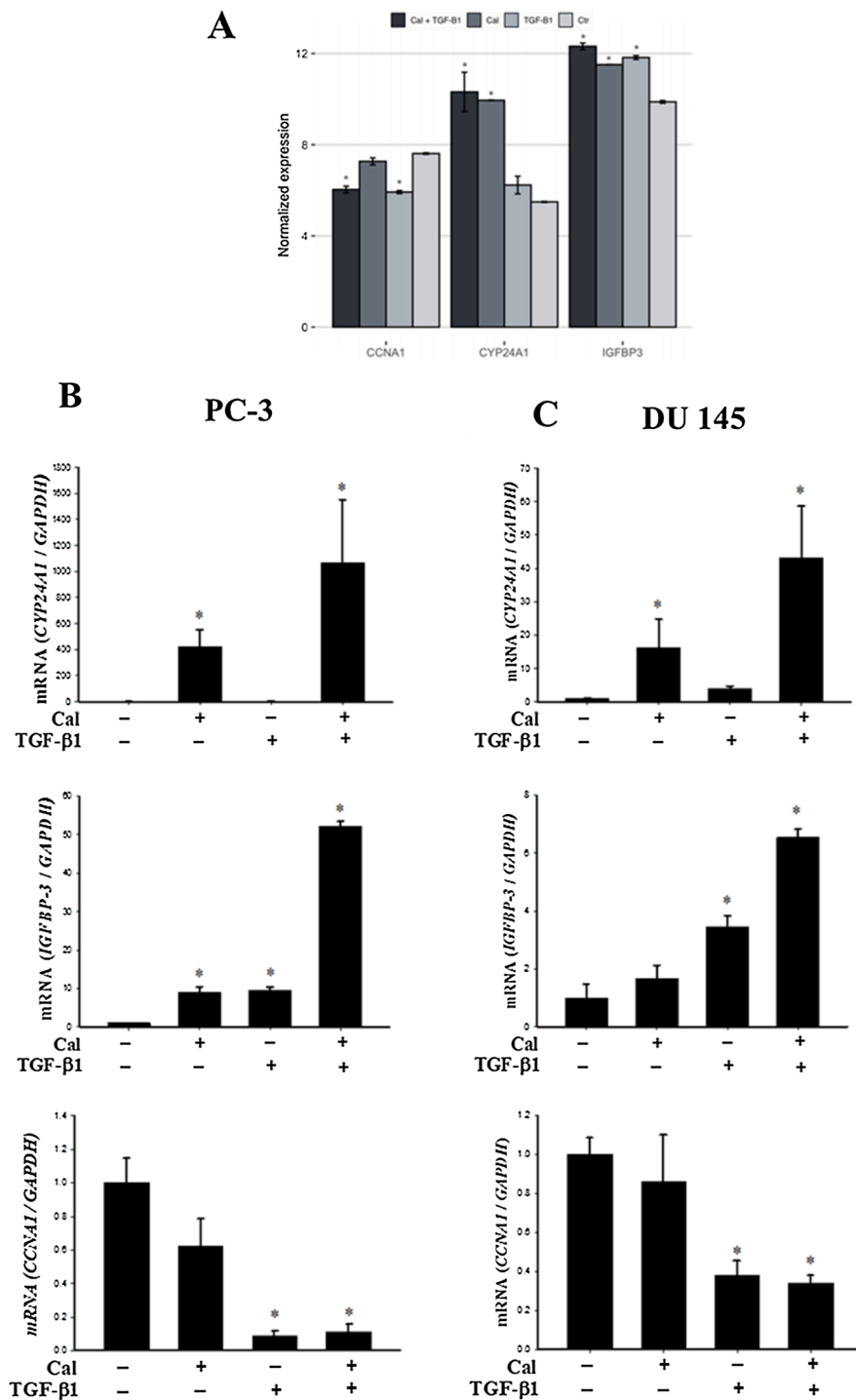


**Fig. 2.** Overview of the transcriptional landscape modulated by calcitriol, TGF-β1 and combinatory treatment. A) Bar plots showing the total number of up-regulated (left) and down-regulated (right) genes (log fold change  $\pm 0.5$ , p-value < 0.05) by treatments vs control (untreated). B) Venn diagrams showing the overlapping differentially expressed genes across treatments. C) Bubble plot showing gene expression patterns and co-occurrence of the top 20 altered genes established by the treatments, ordered as follows: upper right, present in the 3 experimental conditions; top right, present in 2 experimental conditions and bottom, present only under calcitriol treatment. Calcitriol (Cal), combinatory treatment (Cal + TGF-β1) and control (Ctr).

treatment in cells analyzed by microarray data and qPCR evaluation (Fig. 3B). These results are in line with previous works [13,31,41], and overall, they validated our gene expression profiles and supported our results as controls of efficacy of each treatment.

Other interesting gene to be validated was *CDKN1A*, which resulted induced by TGF-β1 and the co-treatment (Fig. 4A) and might provide

clues regarding how TGF-β act over CDK inhibitors. To evaluate the specific regulation of TGF-β1 over *CDKN1A* we also evaluated *CDKN2A*, another cell-cycle related gene, which did not present any significant change over any treatment in the microarray analysis (Fig. 4A). As expected, TGF-β1 induced the upregulation of *CDKN1A* but not of *CDKN2A* (Fig. 4B). This effect upon *CDKN1A* was also observed at protein level



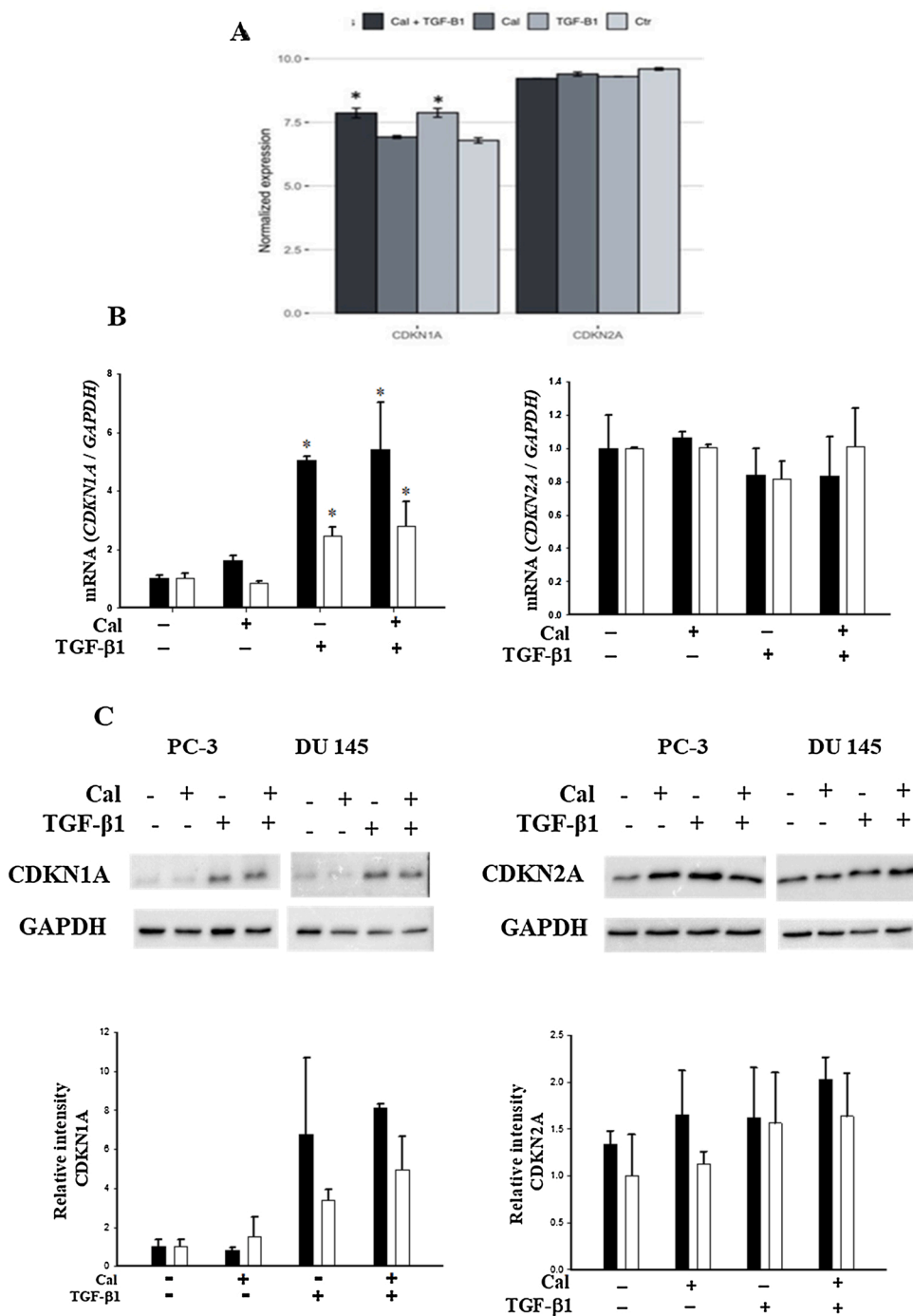
**Fig. 3.** Independent validation of the differently expressed *CYP24A1*, *IGFBP3* and *CCNA1* genes. Gene expression detected by A) microarray analysis on PC-3 cells, B) qPCR independent validation on PC-3 and C) DU145 cells that were incubated in the absence or presence of calcitriol (Cal), TGF-β1 or under the combinatory treatment (Cal + TGF-β1) during 24 h. Each bar represents mean ± S.D. of 3 independent measurements. qPCR data were normalized against *GAPDH* gene expression. Values for the control were set to 1. \**p* < 0.05 vs control.

(Fig. 4C). Notably, contrary to the gene expression profiles, our independent analysis showed that the co-treatment moderately upregulated *CDKN2A* protein level in comparison to the control (Fig. 4C).

### 3.5. Analogous and dissimilar expression of some genes regulated by the diverse treatments

From the total number of differentially expressed genes, 69 % (N = 1324) were altered only under one treatment, while the rest (31 %, N = 606) are co-regulated in at least two *in vitro* treatments. From these coordinated altered genes, 70 % were similarly modulated by TGF-β1 and co-treatment, following by the comparison of calcitriol and co-

treatment with 15 % and finally, 10 % presented convergent modulation by all treatments (Fig. 5A, Supplementary table 2). The expression of most common differentially expressed genes increased or decreased in a similar manner among the different treatments, while around 1% of the transcripts presented a discordant expression across the treatment conditions (Fig. 5A-B). An example of these genes is *UBE2D3*, over-expressed in the co-treatment and silenced under calcitriol, or *CT45A2*, which was expressed in opposite fashion under TGF-β1 (up-regulated) and co-treatment (down-regulated) (Fig. 5B). Similar results were obtained by qPCR (Fig. 5C).



**Fig. 4.** Independent validation of *CDKN1A* and *CDKN2A* expression. Gene expression detected by A) microarray analysis on PC-3 cells and B) qPCR on PC-3 (■) and DU145 cells (□) that were incubated in the absence or presence of calcitriol (Cal), TGF-β1 or under the combinatory treatment (Cal + TGF-β1) during 24 h. C) Protein expression of CDKN1A and CDKN2A were determined by Western blot analysis 48 h after treatment. A representative image from three independent experiments is shown. Each bar represents mean ± S.D. of 3 independent measurements. qPCR data were normalized against *GAPDH* gene expression. Values for the control were set to 1. \**p* < 0.05 vs control.

**3.6. Combinatorial treatment shown a down modulation of cell cycle and proliferation through RNA expression signatures**

Our earlier pre-clinical analysis pointed out that calcitriol, TGF-β1 and co-treatment prevent cell growth, this phenotype is mainly observed in the combinatorial treatment. To address this feature more comprehensively, we applied public RNA signatures on our whole-transcriptomic analysis (Supplementary table 3). Briefly, we computed cell cycle progression (CCP) score a robust prognostic marker in prostate cancer [42] associated to actively growing cells and tumor aggressiveness; cell cycle progression gene sets from the Molecular Signatures Database and a tri-marker proliferation index that predicts biochemical recurrence in prostate cancer [43].

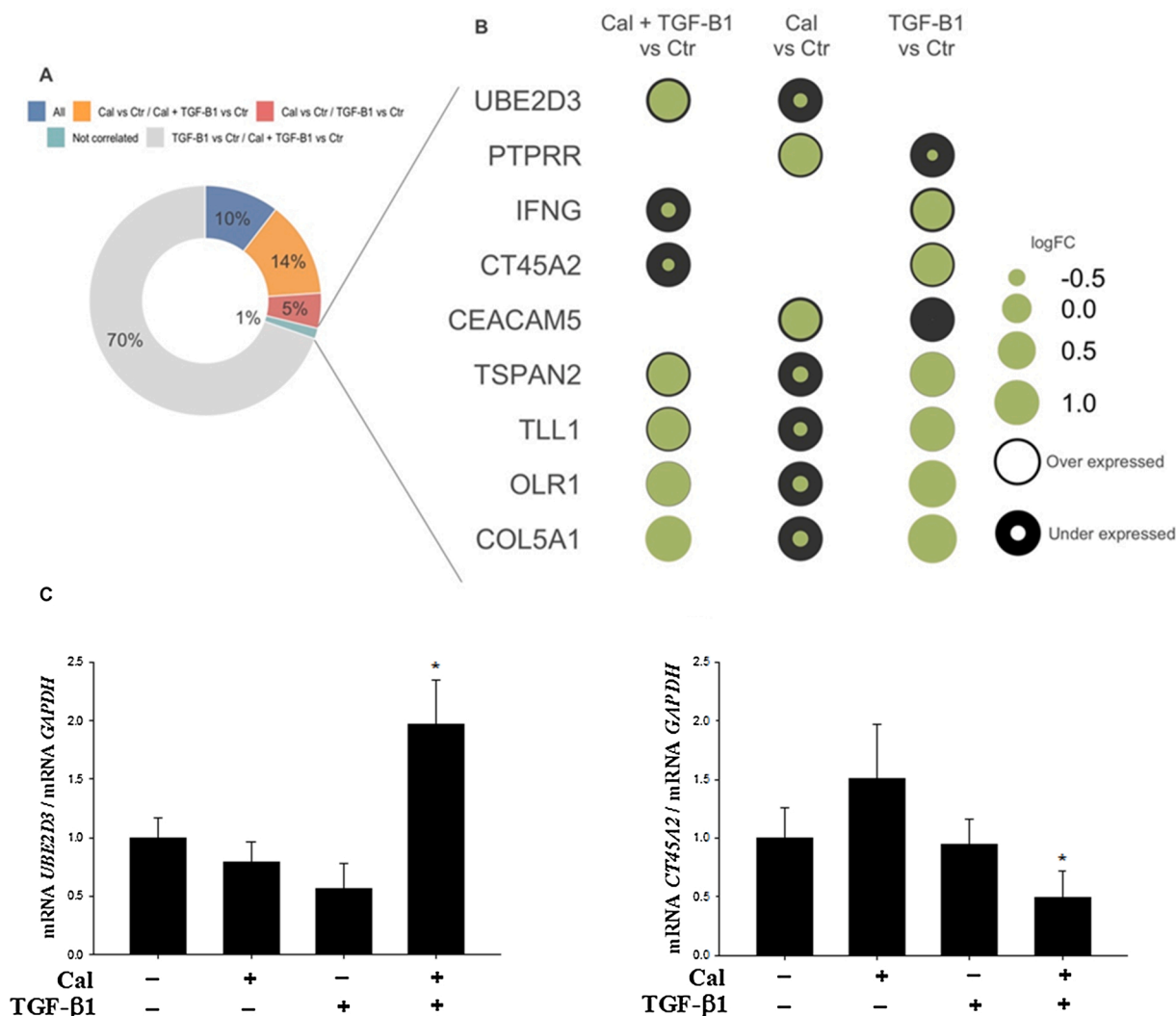
Bioinformatics analyses illustrated the negative impact of the

combinatorial treatment over cell cycle progression and proliferation consistent with our preclinical results (Fig. 6), without affecting other phases of the cell cycle or apoptosis pathway. These last observations further strengthen the effect of the co-treatment in regulating cell growth.

**3.7. Impact of genes modulated by calcitriol, TGF-β1 and combinatorial treatment on pathway enrichment analysis**

To examine other potential functions of calcitriol, TGF-β1 and their co-treatment in PC-3 prostate cell line we performed a pathway enrichment analysis to show the most relevant biological processes associated with the expression profile established by each scheme of treatment.





**Fig. 5.** Similar and discordant altered genes by calcitriol, TGF- $\beta$ 1 and co-treatment. A) Donut plot showing the frequency of common altered genes among the different treatments. B) Bubble plot showing the expression pattern of discordant genes among treatments. C) Expression of *UBE2D3* and *CT45A2* genes upon calcitriol, TGF- $\beta$ 1 and co-treatment in PC-3 cells. Each bar represents mean  $\pm$  S.D. to  $n = 3$ . The results were normalized against *GAPDH* gene expression. Control's values were set to 1. \* $p < 0.05$  vs control.

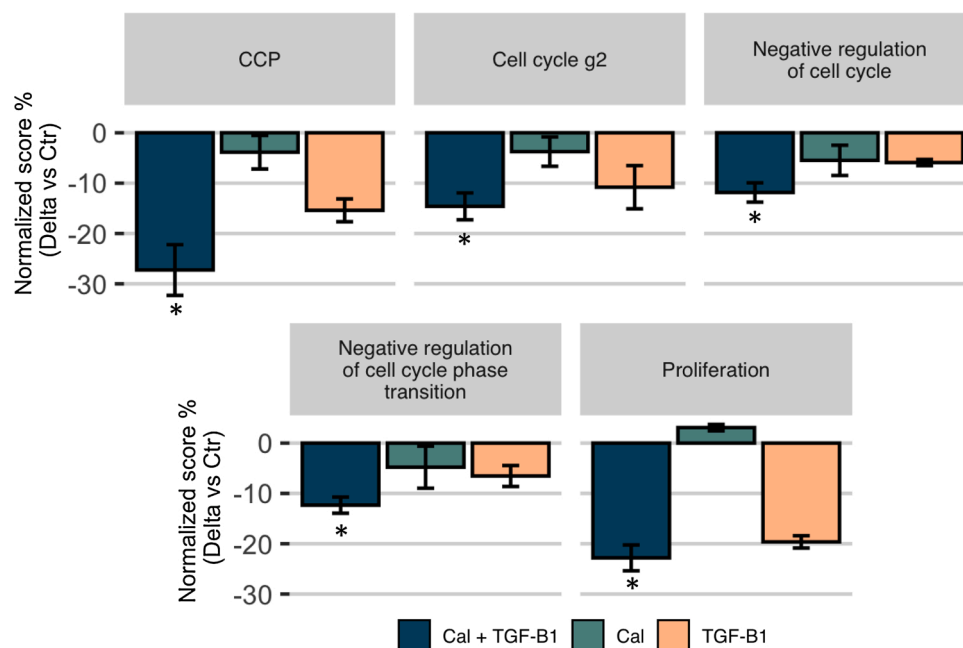
Pathway enrichment analysis identified the modulation of calcitriol treatment over genes related to response to vitamin, protein auto processing, replicative senescence as well as the regulation of growth hormone secretion, negative regulation of cell adhesion mediated by integrin and cAMP catabolic process (Fig. 7A). In relation to TGF- $\beta$ 1 treatment, up-modulated genes were enriched in response to metal ions pathway, wound healing, spreading of epidermal cells and extracellular matrix organization, whereas down-modulated genes were involved in cytidine to uridine editing, cyclic nucleotide catabolic process and response to heparin signaling, among others (Fig. 7B). With respect to the combinatory treatment, the analyses revealed that several up regulated genes are involved in the negative regulation of SMAD protein phosphorylation, TNF signaling pathway and regulation of cell migration. Whereas down-regulated genes take part in cytidine to uridine editing, ncRNA 3' end processing, negative regulation of cell adhesion mediated by integrin and regulation of transposition, among others (Fig. 7C).

Of note, the combinatory treatment modulated genes considered as biomarkers and/or with an oncogenic role related with cell growth. Relevantly, members of the cancer/testis antigens were down regulated (*CT45A2*, *CT45A3*, *CT45A6*, *CT45A8* and *CT45A9*), as well as *EXOSC4*, *TOE1* and genes belonging to the enzymatic DNA cytosine deaminase

family (*APOBEC3B*, *APOBEC3C*, *APOBEC3D*, *APOBEC3E* and *APOBEC3G*) (Fig. 7C). Overall, enrichment pathway patterns are heterogeneous across evaluated treatments, but in general relevant cancer-related signaling pathways are regulated, such as cell signaling, migration and adhesion. We also noticed that several genes were associated with multiple pathways, in line with an interconnected topography of the cellular networks.

### 3.8. Pathway enrichment landscape of treatment-specific altered genes

To examine differentially expressed genes regulated in a treatment-specific manner, we identified pathways that were enriched by genes regulated only by one treatment. Pathway enrichment analysis identified a significant decrease of carbohydrate and energy metabolism upon combinatory treatment, confirming the relevance of these pathways in tightly linked cellular processes such as cell growth (Fig. 8A). Furthermore, the co-treatment also negatively impact relevant components of the extracellular matrix (ECM) recognized as activate molecules involved in tumorigenesis and metastasis including integrins. In addition, protein processing was the most positive affected pathway upon calcitriol treatment (Fig. 8B). Interestingly, an opposite, but redundant, effect on ion transport between calcitriol (downregulated) and TGF- $\beta$ 1



**Fig. 6.** Effect of co-treatment in cell growth and cell cycle evaluated by gene expression signatures. Bar plot showing the change (Delta %) of gene expression scores of the computed RNA signatures based on microarray data against control. Control condition was considered as 100 % to contrast the rest of experimental condition. \*  $p$  value  $<0.05$ .

(upregulated) treatment was observed (Fig. 8B-C). Finally, other upregulated cellular functions by TGF- $\beta$ 1 incubation were immune responses and tight junctions (Fig. 8C).

This data allowed us to identify treatment-independent effects rewiring transcriptional patterns in a cancer cell-line model and corroborates the observation that independent and combinatory treatments establish different transcriptional landscape, although some target genes and pathways are commonly altered.

### 3.9. Calcitriol, TGF- $\beta$ 1 and combinatorial treatment regulated genes are altered in prostate cancer patients

To gain insight into the potential clinical relevance of our findings, particularly of the combinatory treatment, we examined TCGA patient-derived data. We focused our analysis on the more robust alerted genes by the combinatory treatment (logFC: 1 and adj  $p$  value  $<0.05$ ) and contrasted them to differentially expressed genes between normal and tumoral prostate tissue; and tumors with diverse aggressiveness measured by Gleason score and biochemical recurrence. We identified a set of genes ( $N = 24$ ) that resulted altered in tumoral tissues vs normal adjacent samples that were significantly restored by the combinatory treatment (Fig. 9A). *CDKN1A* an important gene in maintaining cycle cell regulation, lost in tumor samples, was re-expressed after the co-treatment. Contrary, well-known oncogenes such as *SLC7A11* and *GRPR* that are highly expressed in most prostate cancers, were abolished by the co-treatment (Fig. 9A).

Although, fewer genes were identified between aggressive and non-aggressive tumors, we identified that the co-treatment restore some relevant markers already associated with stage and prostate cancer patient's overall survival such as the down-modulation of *SHISA3* or the up-modulation of *VGLL3* and *JUNB*, which resulted altered in patients with high Gleason score ( $>8$ ) or with biochemical recurrence, respectively (Fig. 9B-C). Overall, these data suggest the possible clinical impact of the co-treatment in controls cellular responses of tumorigenesis.

## 4. Discussion

Dysregulation of calcitriol and TGF- $\beta$  pathways are features of

prostate cancer. Yet, the contribution of the combinatory treatment of calcitriol and TGF- $\beta$  in reprogramming prostate cancer biology is still under investigation. In the present study, we observed the inhibition of the cell growth by calcitriol, its analogous EB1089 and TGF- $\beta$ s in PC-3 and DU 145 prostate cell lines. Detected effects of calcitriol and its analogue are in accordance with their well-known anti-proliferative activity in different cancer cell lines, primary cultures and *in vivo* models [10,44–46]. Likewise, the inhibition of cell growth by TGF- $\beta$ 1 observed in our work confirmed previously published data [21–26]. Interestingly, the results of our study showed for the first time that cell lines exposed to co-treatment with calcitriol and TGF- $\beta$ s highly inhibited cell growth as compared with cells treated with each compound alone. In accordance, our *in-silico* analysis also revealed the impairment of cell cycle and cell proliferation under the combinatory treatment. These results suggest that calcitriol and TGF- $\beta$  coordinately operate to control cell growth, at least in the evaluated cell lines in the present study.

Cell apoptosis has been considered as one of the mechanisms by which cell growth can be affected. In this regard, it has been reported that both calcitriol and TGF- $\beta$  stimulate apoptotic pathways in human prostate cancer cell lines [26,47]. Likewise, it has been proposed that IGFBP3, a common up-modulated gene by all treatments, could regulate cell growth affecting the rate at which cells die [48]. Interestingly, the results obtained in our study using flow cytometry assay showed non-significant increase of cell apoptosis, this was also confirmed by applying dedicated RNA signatures to our gene-profiling. These results are in line with the work of Igarashi et al. [14], who has demonstrated that calcitriol did not induced apoptosis in LnCap cells.

Looking for other specific changes at gene level that could drive the anti-proliferative effect governed by the combinatory treatment we focused on some relevant altered genes. In addition to above mentioned roles, it has also been demonstrated that IGFBP3 induced by calcitriol and TGF- $\beta$  is involved in growth inhibition of PC-3 and LnCap cells [12–14]. Moreover, previous studies have highlighted that IGFBP-3 stimulated by calcitriol is a necessary component to induce *CDKN1A*, a potent cyclin-dependent kinase inhibitor [13]. In the present study, we demonstrated for the first time that the co-incubation with calcitriol and TGF- $\beta$ 1 induces a higher up-modulation of both, *IGFBP-3* and *CDKN1A*, than each treatment alone. Additionally *CCNA1*, another important

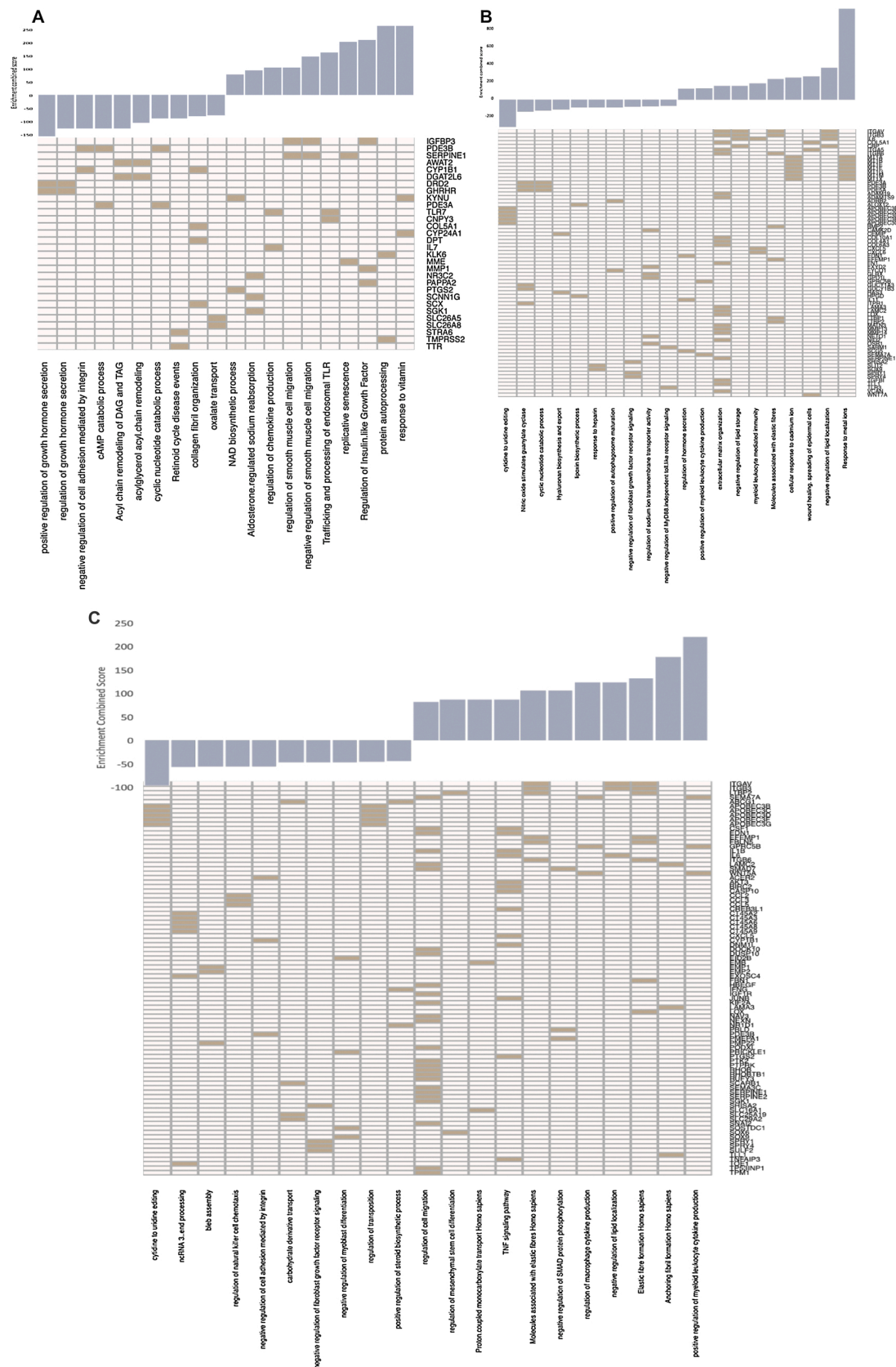
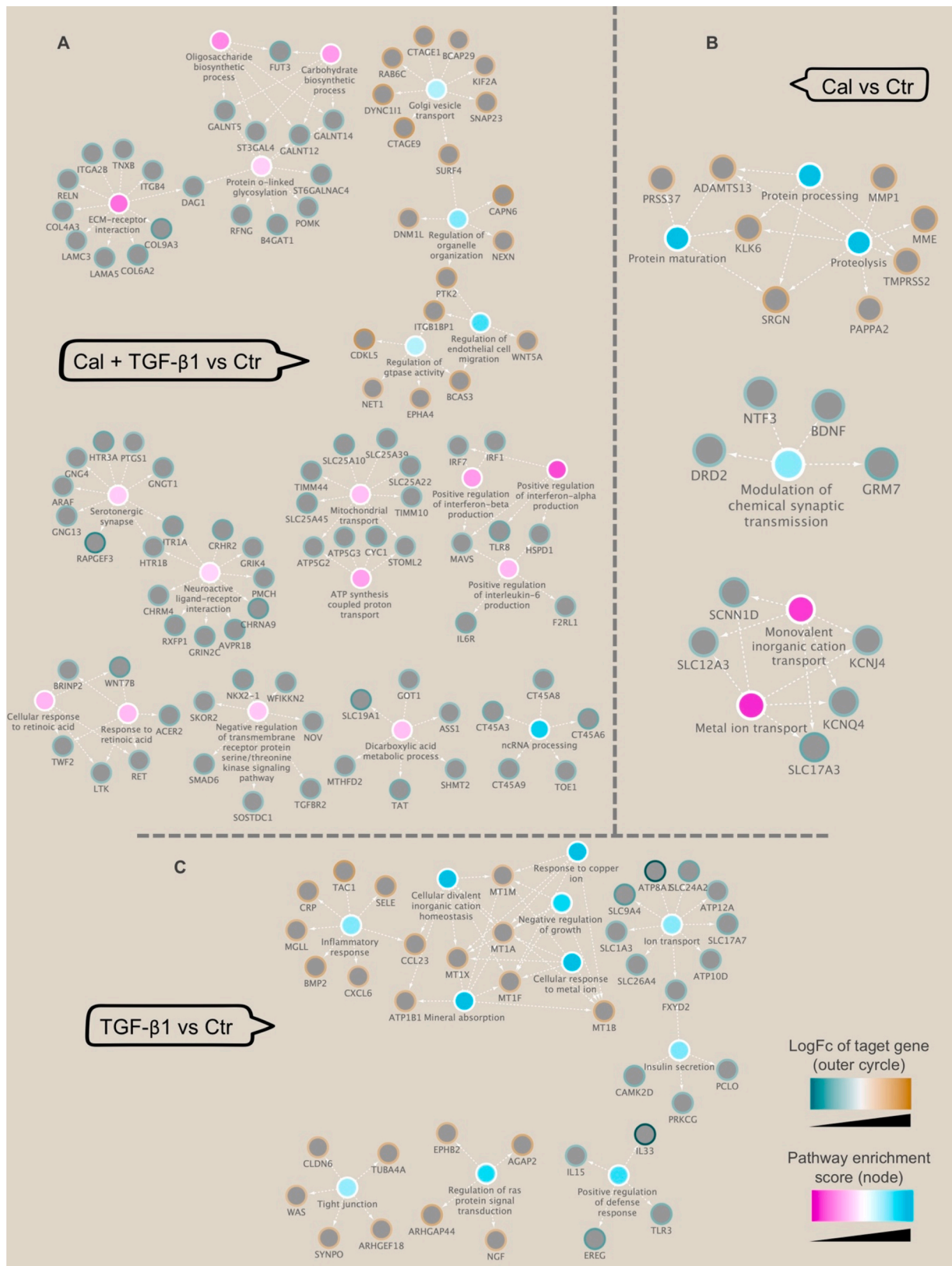


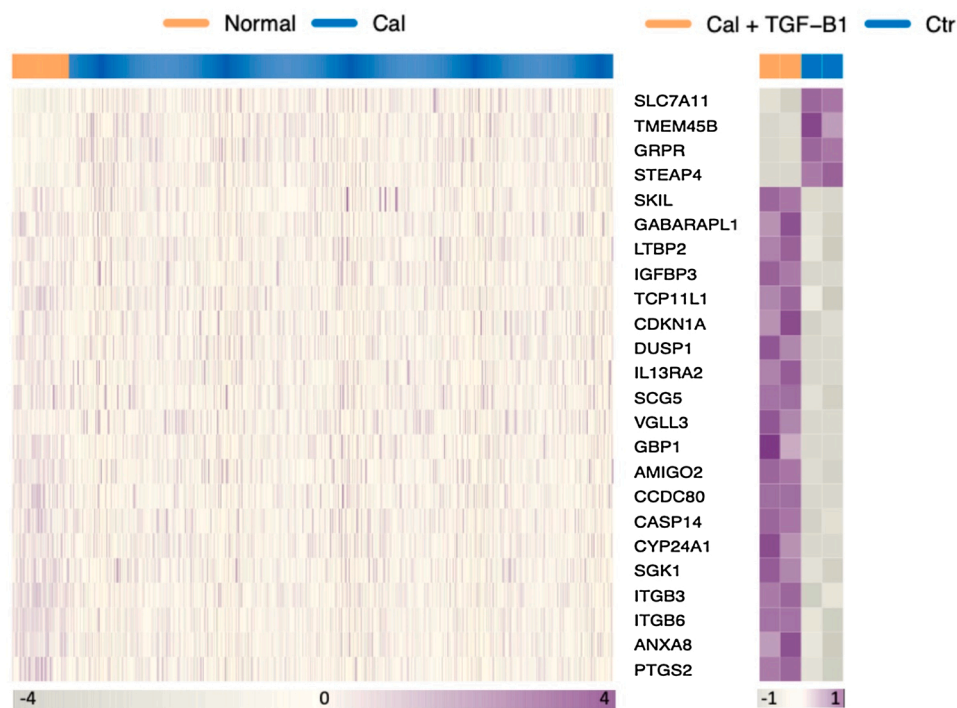
Fig. 7. Enrichment pathway analysis (Top20) of genes differentially expressed by treatment of A) Calcitriol, B) TGF-β1 and C) co-treatment. Genes were plotted in a heatmap (bottom) indicating in which signaling pathways are annotated and barplots (upper) indicate enrichment score of each pathway computed by Enrichr tool. Both upregulated and downregulated genes are shown.



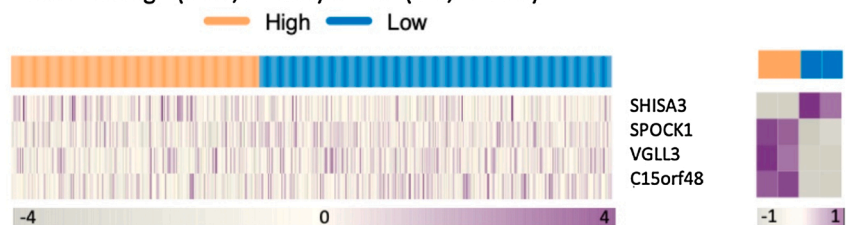


**Fig. 8.** Pathways associated to treatment-specific modulation. Enrichment map shows pathways significantly enriched by genes altered by only one treatment in A) Co-treatment (Cal + TGF-β1), B) Calcitriol and C) TGF-β1. Nodes in the network represent enriched pathways. Nodes are colored (inner circle) by pathway enrichment score computed by Enrichr and target genes (outer circle) are colored by the logFC level resulted from the contrast treatment vs control (Ctr).

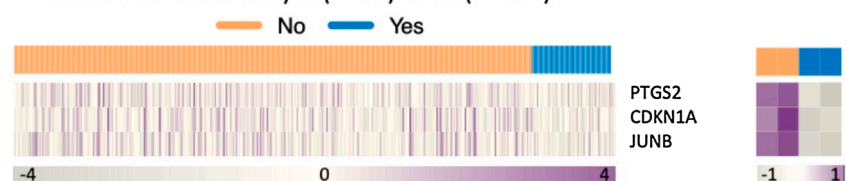
**A Tumor (N=499) vs normal adjacent (N=52)**



**B Gleason high (8-10, N=206) vs low (6-7, N=293)**



**C Biochemical recurrence yes (N=59) vs no (N=371)**



**Fig. 9.** Expression pattern of genes robustly modulated by the combinatory treatment, which are opposite altered in prostate cancer tissues. Heatmaps of the differentially expressed genes modulated restored to its original expression portraits and altered in A) tumor vs normal adjacent prostate tissues B) tumor samples from patients with high Gleason score (>8) vs low (6-7) or C) tumor samples from patients with biochemical resistance vs without. Purple represents over expression while gray represents down-expression.

cell-cycle regulator usually elevated in prostate cancer [49,50], was inhibited by TGF-β1 and co-treatment, this could support cell cycle arrest. In accordance, RNA based signatures applied to our gene expression profile of PC-3 exposed cells to combinatory treatment illustrated moderate alteration in cell cycle progression.

Among the treatment-specific up-regulated genes, *NOX4* was the highest expressed gene resulted altered only through the combinatorial treatment. *NOX4* is an NADPH oxidase representing one of the major sources of basal ROS. Therefore, we suggested that combinatorial response of calcitriol and TGF-β1, increased *NOX4* expression and in consequent ROS production, facilitating the SMAD 2/3 pathway, that leads to G1 arrest accompanied by the up-regulation of cyclin-dependent kinase inhibitors [51] as observed in our functional and in-silico analysis. Thus, activation of TGF-β/Smad/ROS signaling cascade accompanies the antiproliferative actions of the combinatory treatment.

Microarray data also revealed some dissimilar effects on the gene expression under the different treatments, for instance the combinatory treatment had an outstanding impact on *UBE2D3* and *CT45A2*

expression opposite to its individual treatment counterpart. Thus, *UBE2D3* was up-regulated by the combined treatment, this enzyme belongs to the family of ubiquitin-proteasome conjugating enzymes and its deregulation has been recently correlated with sustained prostate neoplastic processes [52]. In this sense, the effects of the combinatory regimen appear to be positive since *UBE2D3* protein expression was significantly associated with overall survival and increase radiosensitivity in esophageal cancer patients [53,54]. In addition, its down-regulation favors cell proliferation and telomerase maintenance [55,56]. This gene has also been associated with breast cancer cell proliferation; specifically, low levels of *UBE2D3* expression let to be a determinant factor for the progression of metastatic breast cancer [57]. Regarding prostate cancer, it is increased in some prostate cancer samples [58]. The above notions could suggest that the inhibition of prostate cancer cell proliferation promoted by the combination of calcitriol with TGF-β1 might be also mediated through up-regulation of *UBE2D3*. However, future research should be carried out to confirm this notion.

On the other hand, the combined treatment down-regulated the

expression of several CT45 family members such as *CT45A2*, *CT45A3*, *CT45A6*, *CT45A8* and *CT45A9*. In particular, these genes belong to the cancer/testis antigens (CTAs), which are proteins normally expressed in germ cells but aberrantly expressed in several types of cancers including prostate cancer, and their expression is also associated with disease progression, cell proliferation and metastatic profile [59,60]. Particularly, *CT45A2* expression was previously related to increase proliferation in H1975 cells [61]. In addition, high expression of CTA genes has recently been proposed as potential biomarkers for diagnosis and prognosis in prostate cancer. In line with this concept, some works have been demonstrated that CTAs genes can drive different oncogenic pathways including TGF- $\beta$ /SMAD signaling [62]. Therefore, we suggest that these biological effects could have mutual feedback between calcitriol and TGF- $\beta$  actions.

Taking advantage of a large collection of prostate cancer samples from TCGA consortium, we systematically investigated the mRNA expression of relevant cancer-related genes restored by the combinatory treatment. Among the most compelling reestablished genes to its physiological expression pattern are well-known oncogenes such as *SLC7A11* and *GRPR*, *CYP24A1*, *SHISA3*, *VGLL3* and *JUNB*.

The data emerging from our work suggest a different transcriptional strategy established by each treatment. For instance, calcitriol in combination with TGF- $\beta$ 1 or TGF- $\beta$ 2 inhibits more robustly cell growth as compared with each independent compound in PC-3 and DU145 cells. Our results also show that the combinatory treatment increases in a more powerful way the expression of *IGFBP3*, which has been implicated in the inhibition of cell growth by calcitriol and TGF- $\beta$ . Our results support a cytostatic effect more than cell death events, as explain by the induction of CDKs and the inhibition of *CCNA1*. Moreover, there are other up- or down regulated genes involved in a variety of cellular functions that potentially hamper cell growth.

In this study, we reported for the first time that the *in vitro* combinatory treatment of calcitriol and TGF- $\beta$  regulates an extensive panel of genes implicated in cell proliferation in prostate cancer cells. Although we demonstrated using high-throughput methodologies and robust bioinformatics analyses that the combined treatment significantly affects prostate cancer cell proliferation and cell-growth dynamics, there are certainly some limitations that might be addressed in future studies. Complementary studies including anchorage-independent growth, spheroid formation, and approaches to measure cell invasive properties would enrich and improve the comprehensive of the mechanisms of action. Moreover, *in vivo* models treated with the molecules in combination may also be studied, with special interest on cancer progression and immune microenvironment modulation.

Furthermore, the anticancer assays presented here could be expanded by using other analogs and vitamin D derivatives in combination with TGF- $\beta$ . In this sense, Slominski et al. [63] demonstrated a novel pathway of vitamin D metabolism that operates *in vivo*, initiated and regulated by *CYP11A1*, which in turn generates biologically active products. In fact, *CYP11A1*-derived vitamin D metabolites such as 20(OH)D3 and 20,23(OH)2D3 act as natural products/endogenous bioregulators similar compelling as calcitriol, mainly in their anti-proliferative, pro-differentiation, antifibrotic and antineoplastic effects [63,64]. Interestingly, these metabolites are non-calcemic and act as partial agonists on the VDR pathway, as reverse agonists on the retinoic orphan acid receptors (ROR)  $\alpha$  and  $\gamma$ , and/or on the aryl hydrocarbon receptor [63–67]. Therefore, they act as hormones *in vivo* and their effects would depend on their local and systemic production, which could prevent, diminish or retard the adverse effects occurring in this pathology.

Hence, current study suggests that coordinate reestablishment of calcitriol and TGF- $\beta$  in patients with prostate cancer could regulate actions against cancer cells, *i.e.*, in patients with calcitriol deficiency, vitamin D supplementation could be beneficial to regulate TGF- $\beta$  actions.

## Funding

This work was supported by CONACyT, México [grant number 282770].

## CRediT authorship contribution statement

**Mitzi García-Olivares:** Methodology, Validation, Visualization, Formal analysis. **Sandra Romero-Córdoba:** Resources, Formal analysis, Data curation, Visualization, Software, Writing - review & editing. **Elizabeth Ortiz-Sánchez:** Methodology, Investigation. **Rocío García-Becerra:** Methodology. **Mariana Segovia-Mendoza:** Methodology, Writing - review & editing. **Claudia Rangel-Escareño:** Methodology, Software. **Ali Halhali:** Writing - review & editing. **Fernando Larrea:** Supervision, Writing - review & editing. **David Barrera:** Conceptualization, Methodology, Resources, Visualization, Writing - original draft, Investigation, Funding acquisition.

## Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

## Acknowledgments

This article is part of doctoral thesis of M.G.O. who is a Ph.D. student from Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM, México), under a fellowship number 587887, from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.105831>.

## References

- [1] M. Segovia-Mendoza, L. Diaz, M.E. Gonzalez-Gonzalez, I. Martinez-Reza, J. Garcia-Quiroz, H. Prado-Garcia, M.J. Ibarra-Sanchez, J. Esparza-Lopez, F. Larrea, R. Garcia-Becerra, Calcitriol and its analogues enhance the antiproliferative activity of gefitinib in breast cancer cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 148 (2015) 122–131.
- [2] J. Garcia-Quiroz, R. Garcia-Becerra, D. Barrera, N. Santos, E. Avila, D. Ordaz-Rosado, M. Rivas-Suarez, A. Halhali, P. Rodriguez, A. Gamboa-Dominguez, et al., Astemizole synergizes calcitriol antiproliferative activity by inhibiting CYP24A1 and upregulating VDR: a novel approach for breast cancer therapy, *PLoS One* 7 (9) (2012), e45063.
- [3] B.Y. Bao, J. Yao, Y.F. Lee, 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 suppresses interleukin-8-mediated prostate cancer cell angiogenesis, *Carcinogenesis* 27 (9) (2006) 1883–1893.
- [4] B.Y. Bao, S.D. Yeh, Y.F. Lee, 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits prostate cancer cell invasion via modulation of selective proteases, *Carcinogenesis* 27 (1) (2006) 32–42.
- [5] J. Ahn, S. Park, B. Zuniga, A. Bera, C.S. Song, B. Chatterjee, Vitamin d in prostate cancer, *Vitam. Horm.* 100 (2016) 321–355.
- [6] M. Scaranti, C. Junior Gde, A.O. Hoff, Vitamin D and cancer: does it really matter? *Curr. Opin. Oncol.* 28 (3) (2016), 2205–2019.
- [7] A.S. Dusso, A.J. Brown, E. Slatopolsky, Vitamin D, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 289 (1) (2005) F8–28.
- [8] G.G. Schwartz, M.H. Wang, M. Zang, R.K. Singh, G.P. Siegal, 1  $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D (calcitriol) inhibits the invasiveness of human prostate cancer cells, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 6 (9) (1997) 727–732.
- [9] V. Sung, D. Feldman, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 decreases human prostate cancer cell adhesion and migration, *Mol. Cell. Endocrinol.* 164 (1–2) (2000) 133–143.
- [10] D. Feldman, A.V. Krishnan, S. Swami, E. Giovannucci, B.J. Feldman, The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression, *Nat. Rev. Cancer* 14 (5) (2014), 2342–2057.
- [11] G.J. Miller, G.E. Stapleton, T.E. Hedlund, Moffat KA, Vitamin D receptor expression, 24-hydroxylase activity, and inhibition of growth by 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 in seven human prostatic carcinoma cell lines, *Clin. Cancer Res.* 1 (9) (1995) 997–1003.
- [12] S. Murthy, N.L. Weigel, 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 induced growth inhibition of PC-3 prostate cancer cells requires an active transforming growth factor beta signaling pathway, *Prostate* 59 (3) (2004) 282–291.



- [13] B.J. Boyle, X.Y. Zhao, P. Cohen, D. Feldman, Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates 1 alpha,25-dihydroxyvitamin d(3) growth inhibition in the LNCaP prostate cancer cell line through p21/WAF1, *J. Urol.* 165 (4) (2001) 1319–1324.
- [14] K. Igarashi, Y. Yui, K. Watanabe, J. Kumai, Y. Nishizawa, C. Miyaura, M. Inada, S. Sasagawa, Molecular evidence of IGFBP-3 dependent and independent VD3 action and its nonlinear response on IGFBP-3 induction in prostate cancer cells, *BMC Cancer* 20 (1) (2020) 802.
- [15] M.J. Duffy, A. Murray, N.C. Synnott, N. O'Donovan, J. Crown, Vitamin D analogues: potential use in cancer treatment, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 112 (2017) 2190–2197.
- [16] J. Seoane, R.R. Gomis, TGF-beta family signaling in tumor suppression and cancer progression, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2017) doi: 101101/cshperspecta022277.
- [17] C. Heberden, I. Denis, A. Pointillart, T. Mercier, TGF-beta and calcitriol, *Gen. Pharmacol.* 30 (2) (1998) 145–151.
- [18] D. Danielpour, Functions and regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) in the prostate, *Eur. J. Cancer* 41 (6) (2005) 846–857.
- [19] N. Torrealba, G. Rodriguez-Berriguete, B. Fraile, G. Olmedilla, P. Martinez-Onsurbe, M. Guil-Cid, R. Paniagua, M. Royuela, Expression of several cytokines in prostate cancer: correlation with clinical variables of patients. Relationship with biochemical progression of the malignance, *Cytokine* 89 (2017) 2105–2115.
- [20] S.T. Reis, J. Pontes-Junior, A.A. Antunes, J.M. Sousa-Canavez, D.K. Abe, J.A. Cruz, M.F. Dall'oglio, A. Crippa, C.C. Passerotti, L.A. Ribeiro-Filho, et al., Tgf-beta1 expression as a biomarker of poor prognosis in prostate cancer, *Clinics (Sao Paulo)* 66 (7) (2011) 1143–2017.
- [21] L. Konrad, J.A. Scheiber, L. Schwarz, A.J. Schrader, R. Hofmann, TGF-beta1 and TGF-beta2 strongly enhance the secretion of plasminogen activator inhibitor-1 and matrix metalloproteinase-9 of the human prostate cancer cell line PC-3, *Regul. Pept.* 155 (1–3) (2009) 28–32.
- [22] F.L. Miles, N.S. Tung, A.A. Aguiar, S. Kurtoglu, R.A. Sikes, Increased TGF-beta1-mediated suppression of growth and motility in castrate-resistant prostate cancer cells is consistent with Smad2/3 signaling, *Prostate* 72 (12) (2015) 1339–1350.
- [23] S. Desruisseau, E. Ghazarossian-Ragni, O. Chinot, P.M. Martin, Divergent effect of TGFbeta1 on growth and proteolytic modulation of human prostatic-cancer cell lines, *Int. J. Cancer* 66 (6) (1996) 796–801.
- [24] Vo B.T., Cody B., Cao Y., Khan SA: Differential role of Sloan-Kettering Institute (Ski) protein in Nodal and transforming growth factor-beta (TGF-beta)-induced Smad signaling in prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 33(11):2054-2064.
- [25] A.C. Millena, B.T. Vo, S.A. Khan, JunD is required for proliferation of prostate cancer cells and plays a role in transforming growth factor-beta (TGF-beta)-induced inhibition of cell proliferation, *J. Biol. Chem.* 291 (34) (2016) 17964–17976.
- [26] A. Al-Azayzih, F. Gao, A. Goc, P.R. Somanath, TGFbeta1 induces apoptosis in invasive prostate cancer and bladder cancer cells via Akt-independent, p38 MAPK and JNK/SAPK-mediated activation of caspases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427 (1) (2012) 165–170.
- [27] L. Attisano, J.L. Wrana, Smads as transcriptional co-modulators, *Curr. Opin. Cell Biol.* 12 (2) (2000) 235–243.
- [28] G. Cantelli, E. Crosas-Molist, M. Georgouli, V. Sanz-Moreno, TGFbeta-induced transcription in cancer, *Semin. Cancer Biol.* 42 (2017) 2060–2069.
- [29] J. Yanagisawa, Y. Yanagi, Y. Masuhiro, M. Suzawa, M. Watanabe, K. Kashiwagi, T. Toriyabe, M. Kawabata, K. Miyazono, S. Kato, Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators, *Science* 283 (5406) (1999) 1317–1321.
- [30] R. Nanduri, S. Mahajan, E. Bhagyaraj, K. Sethi, R. Kalra, V. Chandra, P. Gupta, The active form of vitamin d transcriptionally represses Smad7 signaling and activates extracellular signal-regulated kinase (ERK) to inhibit the differentiation of a inflammatory t helper cell subset and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Biol. Chem.* 290 (19) (2015) 12222–12236.
- [31] C. Ricca, A. Aillon, M. Viano, L. Bergandi, E. Aldieri, F. Silvagno, Vitamin D inhibits the epithelial-mesenchymal transition by a negative feedback regulation of TGF-beta activity, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 187 (2019) 97–105.
- [32] J. Ahel, N. Hudorovic, V. Vivic-Hudorovic, H. Nikles, Tgf-beta in the natural history of prostate cancer, *Acta Clin. Croat.* 58 (1) (2019) 128–138.
- [33] V. Vichai, K. Kirtikara, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, *Nat. Protoc.* 1 (3) (2006) 1112–1116.
- [34] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162 (1) (1987) 156–159.
- [35] B.S. Carvalho, R.A. Irizarry, A framework for oligonucleotide microarray preprocessing, *Bioinformatics* 26 (19) (2010) 2363–2367.
- [36] S. Durinck, P.T. Spellman, E. Birney, W. Huber, Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt, *Nat. Protoc.* 4 (8) (2009) 1184–1191.
- [37] M.E. Ritchie, B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C.W. Law, W. Shi, G.K. Smyth, Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies, *Nucleic Acids Res.* 43 (7) (2015) e47.
- [38] E.Y. Chen, C.M. Tan, Y. Kou, Q. Duan, Z. Wang, G.V. Meirelles, N.R. Clark, Ma'ayan A: enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool, *BMC Bioinformatics* 14 (2013) 128.
- [39] S. Lira-Albarran, M. Durand, M.F. Larrea-Schiavon, L. Gonzalez, D. Barrera, C. Vega, A. Gamboa-Dominguez, C. Rangel, F. Larrea, Ulipristal acetate administration at mid-cycle changes gene expression profiling of endometrial biopsies taken during the receptive period of the human menstrual cycle, *Mol. Cell. Endocrinol.* 447 (2017) 1–11.
- [40] M.I. Love, W. Huber, S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, *Genome Biol.* 15 (12) (2014) 550.
- [41] V. Hwa, Y. Oh, R.G. Rosenfeld, Insulin-like growth factor binding protein-3 and -5 are regulated by transforming growth factor-beta and retinoic acid in the human prostate adenocarcinoma cell line PC-3, *Endocrine* 6 (3) (1997) 235–242.
- [42] J. Czuzick, G.P. Swanson, G. Fisher, A.R. Brothman, D.M. Berney, J.E. Reid, D. Mesher, V.O. Speights, E. Stankiewicz, C.S. Foster, et al., Prognostic value of an RNA expression signature derived from cell cycle proliferation genes in patients with prostate cancer: a retrospective study, *Lancet Oncol.* 12 (3) (2011) 245–255.
- [43] S. Malhotra, J. Lapointe, K. Salari, J.P. Higgins, M. Ferrari, K. Montgomery, M. van de Rijn, J.D. Brooks, J.R. Pollack, A tri-marker proliferation index predicts biochemical recurrence after surgery for prostate cancer, *PLoS One* 6 (5) (2011), e20293.
- [44] X. Wang, X. Chen, J. Akhter, D.L. Morris, The in vitro effect of vitamin D3 analogue EB-1089 on a human prostate cancer cell line (PC-3), *Br. J. Urol.* 80 (2) (1997) 260–262.
- [45] S. Marchiani, L. Bonaccorsi, P. Ferruzzi, C. Crescioli, M. Muratori, L. Adorini, G. Forti, M. Maggi, E. Baldi, The vitamin D analogue BXL-628 inhibits growth factor-stimulated proliferation and invasion of DU145 prostate cancer cells, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 132 (6) (2006) 408–416.
- [46] S.E. Blutt, T.C. Polek, L.V. Stewart, M.W. Kattan, N.L. Weigel, A calcitriol analogue, EB1089, inhibits the growth of LNCaP tumors in nude mice, *Cancer Res.* 60 (4) (2000) 779–782.
- [47] M. Ben-Eltriki, S. Deb, E.S. Guns, Calcitriol in combination therapy for prostate cancer: pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions, *J. Cancer* 7 (4) (2016) 391–407.
- [48] R. Rajah, B. Valentini, P. Cohen, Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor-beta1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism, *J. Biol. Chem.* 272 (18) (1997) 12181–12188.
- [49] B. Wegiel, A. Bjartell, J. Tuomela, N. Dizeyi, M. Tinzl, L. Helczynski, E. Nilsson, L. E. Otterbein, P. Harkonen, J.L. Persson, Multiple cellular mechanisms related to cyclin A1 in prostate cancer invasion and metastasis, *J. Natl. Cancer Inst.* 100 (14) (2008) 1022–1036.
- [50] R. Miftakhova, A. Hedblom, J. Semenas, B. Robinson, A. Simoulis, J. Malm, A. Rizvanov, D.M. Heery, N.P. Mongan, N.J. Maitland, et al., Cyclin A1 and P450 aromatase promote metastatic homing and growth of stem-like prostate cancer cells in the bone marrow, *Cancer Res.* 76 (8) (2016) 2453–2464.
- [51] Y. Guo, N. Kyprianou, Overexpression of transforming growth factor (TGF) beta1 type II receptor restores TGF-beta1 sensitivity and signaling in human prostate cancer cells, *Cell Growth Differ.* 9 (2) (1998) 185–193.
- [52] Z. Chen, W. Lu, Roles of ubiquitination and SUMOylation on prostate cancer: mechanisms and clinical implications, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (3) (2015) 4560–4580.
- [53] X. Gao, W. Wang, H. Yang, L. Wu, Z. He, S. Zhou, H. Zhao, Z. Fu, F. Zhou, Y. Zhou, UBE2D3 gene overexpression increases radiosensitivity of EC109 esophageal cancer cells in vitro and in vivo, *Oncotarget* 7 (22) (2016) 32543–32553.
- [54] G.G. Guan, W.B. Wang, B.X. Lei, Q.L. Wang, L. Wu, Z.M. Fu, F.X. Zhou, Y.F. Zhou, UBE2D3 is a positive prognostic factor and is negatively correlated with hTERT expression in esophageal cancer, *Oncol. Lett.* 9 (4) (2015) 1567–1574.
- [55] H. Yang, L. Wu, S. Ke, W. Wang, L. Yang, X. Gao, H. Fang, H. Yu, Y. Zhong, C. Xie, et al., Downregulation of ubiquitin-conjugating enzyme UBE2D3 promotes telomere maintenance and radioresistance of Eca-109 human esophageal carcinoma cells, *J. Cancer* 7 (9) (2016) 1152–1162.
- [56] S.M. Hosseini, I. Okoye, M.G. Chaleshtari, B. Hazhirkarzar, J. Mohamadnejad, G. Azizi, M. Hojjat-Farsangi, H. Mohammadi, S.S. Shotorbani, F. Jadidi-Niaragh, E2 ubiquitin-conjugating enzymes in cancer: implications for immunotherapeutic interventions, *Clin. Chim. Acta* 498 (2019) 126–134.
- [57] M.K. Mittal, K. Singh, S. Misra, G. Chaudhuri, SLUG-induced elevation of D1 cyclin in breast cancer cells through the inhibition of its ubiquitination, *J. Biol. Chem.* 286 (1) (2011) 469–479.
- [58] Q.Y. Ning, J.Z. Wu, N. Zang, J. Liang, Y.L. Hu, Z.N. Mo, Key pathways involved in prostate cancer based on gene set enrichment analysis and meta analysis, *Genet. Mol. Res.* 10 (4) (2011) 3856–3887.
- [59] M.J. Scanlan, A.J. Simpson, L.J. Old, The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary, *Cancer Immun.* 4 (2004) 1.
- [60] T. Suyama, T. Shiraiishi, Y. Zeng, W. Yu, N. Parekh, R.L. Vessella, J. Luo, R. H. Getzenberg, P. Kulkarni, Expression of cancer/testis antigens in prostate cancer is associated with disease progression, *Prostate* 70 (16) (2010) 1778–1787.
- [61] K. Yang, Y. Chen, J. Zhou, L. Ma, Y. Shan, X. Cheng, Y. Wang, Z. Zhang, X. Ji, L. Chen, et al., Ursolic acid promotes apoptosis and mediates transcriptional suppression of CT45A2 gene expression in non-small-cell lung carcinoma harbouring EGFR T790M mutations, *Br. J. Pharmacol.* 176 (24) (2019) 4609–4624.
- [62] K.E. Maxfield, P.J. Taus, K. Corcoran, J. Wooten, J. Macion, Y. Zhou, M. Borromeo, R.K. Kollipara, J. Yan, Y. Xie, et al., Comprehensive functional characterization of cancer-testis antigens defines obligate participation in multiple hallmarks of cancer, *Nat. Commun.* 6 (2015) 8840.
- [63] A.T. Slominski, T.K. Kim, H.Z. Shehadi, I. Semak, E.K. Tang, M.N. Nguyen, H. A. Benson, E. Korik, Z. Janjetovic, J. Chen, et al., In vivo evidence for a novel pathway of vitamin D(3) metabolism initiated by P450sec and modified by CYP27B1, *FASEB J.* 26 (9) (2012) 3901–3915.
- [64] A.T. Slominski, T.K. Kim, Z. Janjetovic, A.A. Brozyna, M.A. Zmijewski, H. Xu, T. R. Sutter, R.C. Tuckey, A.M. Jetten, D.K. Crossman, Differential and overlapping effects of 20,23(OH)(2)D3 and 1,25(OH)(2)D3 on gene expression in human epidermal keratinocytes: identification of AhR as an alternative receptor for 20,23(OH)(2)D3, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (10) (2018).

- [65] A.T. Slominski, A. Chaiprasongsuk, Z. Janjetovic, T.K. Kim, J. Stefan, R. M. Slominski, V.S. Hanumanthu, C. Raman, S. Qayyum, Y. Song, et al., Photoprotective properties of vitamin d and lumisterol hydroxyderivatives, *Cell Biochem. Biophys.* 78 (2) (2020) 165–180.
- [66] A.T. Slominski, T.K. Kim, W. Li, A. Postlethwaite, E.W. Tieu, E.K.Y. Tang, R. C. Tuckey, Detection of novel CYP11A1-derived secosteroids in the human epidermis and serum and pig adrenal gland, *Sci. Rep.* 5 (2015) 14875.
- [67] A.T. Slominski, T.K. Kim, Y. Takeda, Z. Janjetovic, A.A. Brozyna, C. Skobowiat, J. Wang, A. Postlethwaite, W. Li, R.C. Tuckey, et al., RORalpha and ROR gamma are expressed in human skin and serve as receptors for endogenously produced noncalcemic 20-hydroxy- and 20,23-dihydroxyvitamin D, *FASEB J.* 28 (7) (2014) 2775–2789.