



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“EFECTOS ANTITUMORALES DEL CALCITRIOL Y DEL ASTEMIZOL EN
MODELOS DE CARCINOMA MAMARIO”**

TESIS
Que presenta:

JANICE GARCÍA QUIROZ

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE
FARMACOLOGÍA**

Directores de la tesis:

Dra. Lorenza Díaz Nieto
Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo

México, D. F.

FEBRERO, 2014

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cáncer de mama.....	2
1.1.1. Carcinoma ductal	2
1.1.2. Carcinoma lobulillar	4
1.2. Incidencia y mortalidad del cáncer de mama.....	5
1.3. Clasificación molecular del cáncer de mama	6
1.3.1. Cáncer de mama luminal A.....	6
1.3.2. Cáncer de mama luminal B	6
1.3.3. Cáncer de mama luminal HER-2 neu.....	6
1.3.4. Cáncer de mama de tipo basal.....	7
1.4. Tratamiento del cáncer de mama	7
1.4.1. Tratamiento local	7
1.4.2. Tratamiento sistémico	8
1.5. Calcitriol y cáncer de mama	9
1.6. Canal de potasio éter à-go-go 1 (Eag1)	12
1.7. Eag1 y cáncer de mama	12
1.8. Astemizol y Eag1	13
1.9. Calcitriol y Eag1	14
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. HIPÓTESIS	17
4. OBJETIVOS	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1. Reactivos.....	19
5.2. Tejidos humanos	19
5.3. Cultivo celular.....	20
5.4. Inmunocitoquímica (ICQ).....	20
5.5. Inmunohistoquímica (IHQ).....	21

5.6. Western Blot (WB)	21
5.7. Estudios de proliferación	22
5.8. Determinación de las concentraciones inhibitorias (CI) y del índice de combinación (IC)	22
5.9. Estudios de expresión génica	23
5.10. Inducción de tumores y tratamiento a ratones atímicos.....	24
5.11. Determinación de Eag1 en cerebro.....	25
5.12. Cuantificación sérica de calcio	25
5.13. Análisis estadístico	26
6. RESULTADOS	27
6.1. Caracterización de los cultivos primarios y las líneas celulares utilizadas.....	27
6.2. Efectos antiproliferativos del calcitriol y del astemizol.....	30
6.3. Efecto del tratamiento conjunto de calcitriol y astemizol sobre la proliferación celular.....	32
6.4 Cálculo del índice de combinación (IC)	34
6.5. Evaluación de los marcadores moleculares Ki-67 y Eag1 en respuesta al tratamiento	35
6.6. Regulación de la expresión de CYP24A1 por el astemizol	39
6.7 Regulación de la expresión del VDR por el astemizol	41
6.8 La coadministración de calcitriol y astemizol inhibe en mayor medida el crecimiento tumoral <i>in vivo</i> en comparación al efecto de cada compuesto por separado	43
6.9. La coadministración de calcitriol y astemizol inhibe en mayor medida la expresión de Ki-67 <i>in vivo</i> en comparación al efecto de cada compuesto por separado	44
6.10. Efecto del tratamiento sobre la expresión de Eag1 a nivel cerebral	46
6.11. Efecto del tratamiento antineoplásico sobre los niveles de calcio.....	47
7. DISCUSIÓN.....	48
8. CONCLUSIÓN	59
9. PERSPECTIVAS.....	60
10. LISTA DE ABREVIATURAS.....	61
11. REFERENCIAS	62

Dedico esta tesis

A Dios

Gracias Señor porque en cada momento de mi vida has estado presente, gracias por ser mi amigo, por amarme, por darme tantos regalos, porque siempre respondes cuando te llamo, por ayudarme a seguir adelante, por darme uno y mil abrazos cuando mas lo he necesitado, pero sobre todo gracias, por que hace once años me llamaste a trabajar para ti y hace unos meses lo volviste a hacer. Señor yo me encargo de tus cosas y tu encárgate de las mías, quiero seguir trabajando para ti.

A mis padres

Que son el regalo más hermoso que Dios me ha otorgado. Gracias por sus oraciones, consejos y desvelos, por alentarme y orientarme en todo momento, por su apoyo incondicional, por los enormes sacrificios que hacen cada día para que yo alcance mis sueños, pero sobre todo gracias no solo por ser unos padres excelentes, sino por ser un gran ejemplo a seguir. Los amo.

Este trabajo se realizó en el departamento de biología de la reproducción “Dr. Carlos Gual Castro” del hospital de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y en el departamento de farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., bajo dirección de la Dra. Lorenza Díaz Nieto y del Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo, respectivamente, con el número de proyecto de CONACyT 153862.

Gracias a CONACyT por la beca otorgada (número de registro253721).

Agradecimientos

A mis hermanos

A mi hermanito Alfonso que siempre me ha apoyado incondicionalmente, aún en contra de todos los obstáculos que se le han presentado en la vida, porque siempre ha estado disponible para darme un consejo, una palabra de aliento y una demostración de amor, por su entrega incondicional no solo como hermano sino también como padre e hijo. Hermanito gracias por estar siempre a mi lado a pesar de la distancia, te quiero mucho.

A Lucy por ser una excelente hermana, amiga y compañera en todo momento, por demostrarme que no hay tiempo ni edad para alcanzar los sueños y que se puede lograr todo lo que uno se propone, madre, profesionista, hermana y amiga. Gracias por estar a mi lado y por darme unos sobrinos preciosos a quienes amo con todo mí ser.

A mi hermanito Braulio porque fui muy feliz en mi niñez al compartir con él tantas travesuras, juegos y aventuras, porque cuando me caía el me levantaba y si lloraba me consolaba. Ahora que ambos hemos crecido y tomado distintos caminos vienen a mí estos recuerdos, mismos que me ayudan a levantarme y a seguir adelante. Tú ahora ya has formado una familia y estoy muy orgullosa de ti, te quiero mucho, gracias por los buenos momentos que me sigues regalando, como esa sobrina tan hermosa.

A Josafath, que aunque es mi hermanito mas pequeño me ha transmitido siempre su fortaleza, madurez y responsabilidad.

A mi abuelito

Aunque ya no estás conmigo se que te alegras porque he realizado uno mas de mis sueños y que desde el cielo me mandas tus bendiciones y me alientas a seguir adelante, gracias por compartir con migo una etapa mas de mi vida.

A Julián

Señor hace casi seis años en un templo te pedí que mandaras a mí a la persona con la que compartiría mi vida y con la que sería inmensamente feliz, ese mismo día apareció Julián y hoy como todos los días te doy gracias porque mandaste a mi lado no solo al amor de mi vida sino a un amigo, en quien puedo confiar, apoyarme, quien me levanta cuando me caigo, quien me abraza cuando estoy triste, quien me motiva a superarme y conquistar día con día el mundo a su lado. Si bien ha habido problemas entre nosotros, los momentos lindos pesan más que los momentos desagradables y el amor es más grande que cualquier situación adversa, es por ello que después de seis años seguimos juntos. Te amo corazón.

A mis amigas

Maye y Juanita por estar siempre a mi lado compartiendo cada aventura y caminando cada vereda por la que Dios nos ha mandado, gracias por permitirme conocer el amor de Dios a través de ustedes. Gracias por todo el apoyo que he recibido en cada momento de mi vida, gracias por alentarme a buscar mi superación y gracias por compartir esta etapa con migo. Gracias señor porque pusiste a estas personas tan hermosas en mi camino porque me han acompañado en momento en lo que yo sola no hubiese sabido que hacer, gracias por que hemos reído y llorado juntas. Las amo

Al grupo de trabajo del laboratorio de Biología de la reproducción del INCMNZS

Dra. Lorenza Díaz, Rocío García, Dr. David Barrera, Dr. Ali, Dr. Euclides Avila, David Ordaz, Nancy Santos, Mariana Segovia, Nancy Noyola, Isela Martínez, por compartir con migo sus conocimientos, su valioso tiempo, paciencia, experiencia, pero sobre todo su amistad. Estoy orgullosa de pertenecer a este grupo de trabajo, por haber conocido a personas como ustedes tan trabajadoras y entregadas a la ciencia. Cada uno de ustedes a formado parte muy importante en mi vida tanto sentimental como profesional, cada uno de ustedes me apoyo en todo momento, cuando los necesité siempre estaban disponibles aún a pesar de su propio trabajo o problemas, gracias a su apoyo incondicional ha llegado este día, este triunfo no solo es mío sino de todos nosotros.

Al grupo de trabajo del laboratorio 13 del departamento de Farmacología

M. en C. Elizabeth Hernández Gallegos y Bióloga Eunice Vera por su tiempo, observaciones y asistencia técnica.

A Violeta, Lupita, Alma, Ana, Aurora, Alejandra e Isabel por su apoyo brindado durante el desarrollo del proyecto, por compartir con migo su experiencia y sus conocimientos.

A Olinka e Hilda

Secretarias del Departamento de Biología de la Reproducción por su apoyo administrativo.

A Beatriz Alcántara

Secretaria Académica del Departamento de Farmacología, por su apoyo administrativo.

A mi comité tutorial

Dra. Rocío García Becerra, Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega, Dr. José Luis Reyes Sánchez y Dra. Liliana Favari Perozzi por el enorme interés mostrado en el proyecto, gracias por el tiempo que se tomaron para el desarrollo del mismo, por las excelentes observaciones y sus valiosas aportaciones, por brindarme su valioso tiempo y por hacer que este proyecto mejorara. Mil gracias

A mis tutores

A la Dra. Lorenza Díaz Nieto. Tutora mía te agradezco enormemente el que te hayas tomado mas del tiempo necesario para desarrollar este proyecto a mi lado, por compartir tus conocimientos con migo, pero sobre todo por brindarme tu apoyo y confianza. Gracias por transmitirme ese amor y entrega por la ciencia, te quiero mucho.

Al Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo por sus consejos, apoyo y confianza. Gracias por compartir con migo sus conocimientos, por brindarme su cariño y amistad. Gracias por estar disponible en todo momento, por motivarme e impulsarme a superarme y por apoyarme en cada decisión. Muchas gracias por ser un gran amigo.

Pudiera escribir mil hojas agradeciendo todas y cada una de sus acciones, son los mejores tutores que cualquier alumno quisiera tener, gracias por permitirme ser su alumna y por formarme como investigador.

RESUMEN

Los mecanismos por los cuales el calcitriol inhibe la proliferación incluyen la inhibición de la expresión del canal de potasio oncogénico éter-à-go-go- tipo 1 (Eag1), el cual es necesario para la progresión del ciclo celular y la tumorigénesis. Recientemente, se ha descrito que el astemizol ejerce parte de sus efectos antineoplásicos al inhibir la actividad del canal Eag1. En este estudio, se caracterizó la interacción entre el calcitriol y el astemizol, así como su efecto antiproliferativo en las células SUM-229PE, T-47D, los cultivos primarios del cáncer de mama y un modelo murino xenotransplantado con células de cáncer de mama humano. Los estudios *in vitro* mostraron que entre calcitriol y astemizol hubo interacción antiproliferativa sinérgica, con base al análisis del índice de combinación. Los experimentos de PCR en tiempo real (qPCR) demostraron que ambos fármacos por si solos regulan a la baja la expresión de Ki-67 y Eag1 (indicador de proliferación y marcador tumoral, respectivamente) mientras que el tratamiento simultáneo disminuyó aún más esta expresión. El astemizol inhibió la expresión (basal y la inducida por calcitriol) de CYP24A1 (citocromo implicado en la biotransformación del calcitriol) a nivel de RNAm, mientras que incrementó la expresión del receptor de la vitamina D (VDR) en células del cáncer de mama. Por lo tanto, el astemizol sinergizó los efectos antiproliferativos del calcitriol al disminuir la expresión de CYP24A1 e incrementar la de VDR. Para los estudios *in vivo*, ratones desnudos portadores de tumores se trataron con astemizol oral (50 mg / kg / día) y/o calcitriol i.p. (30 µg / kg / dos veces a la semana) durante 3 semanas. El astemizol y el calcitriol inhibieron significativamente el desarrollo tumoral, mientras que la administración conjunta de ambos fármacos redujo aún más dicho crecimiento en comparación con los ratones no tratados. Estos resultados fueron apoyados por estudios de inmunohistoquímica de Ki -67, que revelaron menos inmunotinción en los tumores de los ratones con el cotratamiento en comparación con lo observado en los tumores de los ratones tratados con calcitriol o astemizol solos. De manera similar a lo observado *in vitro*, se determinó que la administración concomitante de astemizol y calcitriol aumentó la expresión tumoral de VDR e inhibió la de Eag1. Nuestros resultados indican que el astemizol puede mejorar la bioactividad del calcitriol al incrementar la expresión del VDR tumoral y sugieren que los tumores VDR-negativos podrían ser sensibilizados a los efectos antineoplásicos del calcitriol por la administración concomitante con

astemizol. Por lo tanto, la coadministración de calcitriol y astemizol aumentó los efectos antineoplásicos de ambos fármacos. Este trabajo proporciona información sobre los mecanismos moleculares implicados en el efecto antineoplásico en conjunto de astemizol-calcitriol, ofreciendo apoyo científico para probar ambos compuestos simultáneamente en posteriores estudios clínicos en pacientes con tumores sólidos o metastásicos que expresen VDR y Eag1.

ABSTRACT

Calcitriol antiproliferative effects include inhibition of the oncogenic ether-à-go-go-1 potassium channel (Eag1) expression, which is necessary for cell cycle progression and tumorigenesis. Astemizole exerts its antineoplastic effects by blocking Eag1 currents. Herein, we characterized the interaction between calcitriol and astemizole as well as their conjoint antiproliferative action in SUM-229PE, T-47D, primary tumor-derived breast cancer cells and in a murine model xenografted with human breast cancer cells. *In vitro*, at clinically achievable drug concentrations, synergistic antiproliferative interaction was observed between calcitriol and astemizole, as calculated by combination index analysis. Real time PCR showed that both drugs alone downregulated, while simultaneous treatment further reduced Eag1 and Ki-67 gene expression. Astemizole inhibited basal and calcitriol-induced CYP24A1 mRNA expression (cytochrome involved in calcitriol degradation) in breast cancer cells, while it upregulated the vitamin D receptor (VDR) expression. Therefore, astemizole synergized calcitriol antiproliferative effects by down regulating CYP24A1 and upregulating VDR. *In vivo*, tumor-bearing nude mice were treated with oral astemizole (50 mg/kg/day) and/or i.p. calcitriol (30 µg/kg/twice a week) during 3 weeks. Astemizole and calcitriol significantly inhibited, while the coadministration of both drugs further reduced, tumor growth compared to untreated controls. These results were supported by immunohistochemistry studies of Ki-67, a proliferation marker, which revealed less staining in tumors from mice with the co-treatment compared to controls and calcitriol or astemizole alone. In a similar manner, as reported *in vitro*, we observed that the concomitant administration of astemizole and calcitriol upregulated VDR and downregulated Eag1 tumor expression. Therefore, the coadministration of calcitriol and astemizole increased the antineoplastic effects of both drugs. This study provides insight into the molecular mechanisms involved in astemizole-calcitriol combined antineoplastic effect, offering scientific support to test both compounds in combination in subsequent clinical studies of solid or metastatic tumors expressing VDR and Eag1. Our results show that the astemizole can improve the calcitriol bioactivity to increase VDR tumoral expression. These results suggest that VDR-negative tumors could be sensitized to calcitriol antineoplastic effects by concomitant administration with astemizole.

1. INTRODUCCIÓN

Las células cancerosas se caracterizan porque se reproducen a pesar de las restricciones normales (ignoran las señales que regulan la proliferación celular, evaden la apoptosis y eluden la senescencia replicativa) e invaden y colonizan tejidos reservados a otras células (pierden la inhibición por contacto). La combinación de estas características es lo que hace que el cáncer sea peligroso, ya que se afecta la función normal de los tejidos invadidos. Una célula anormal que no prolifere más que sus vecinas normales no produce daño significativo, pero si su proliferación está fuera de control, producirá un tumor. Mientras que las células cancerosas permanezcan agrupadas en una masa única, el tumor es benigno, en este estadio generalmente se puede conseguir la curación completa extrayendo la masa quirúrgicamente (en el caso de tumores sólidos). Un tumor se considera maligno si sus células tienen la capacidad de invadir el tejido circundante y producir metástasis. Para que una célula cancerosa pueda producir metástasis debe de liberarse del tumor inicial, invadir el tejido vecino, penetrar en un vaso sanguíneo o en un vaso linfático, atravesar la lámina basal y el revestimiento lineal de las células endoteliales que tapizan el vaso, entrar a la circulación sanguínea, posteriormente salir de ésta en otro lugar, sobrevivir y proliferar en un nuevo ambiente. Además de todos estos requerimientos, para que un tumor pueda crecer ampliamente debe de conseguir su propio riego sanguíneo, a través de la generación de nuevos vasos, proceso denominado angiogénesis. La angiogénesis es una etapa imprescindible para el crecimiento tanto del tumor primario como de la metástasis, ya que la neovasculatura abastece al tumor de nutrientes y de oxígeno, proporcionando también una vía fácil para que las células metastásicas puedan escapar hacia otros lugares (Alberts, 2002).

Por lo tanto, el alcance de una célula cancerosa radica en la manifestación de seis diferentes características: 1) autosuficiencia en las señales de crecimiento, 2) insensibilidad a las señales de anticrecimiento, 3) evasión de la apoptosis, 4) angiogénesis sostenida, 5) replicación ilimitada y 6) invasión de tejido y metástasis (Hanahan and Coussens *et. al.*, 2012), dando pauta así al desarrollo del cáncer.

De los diferentes tipos de cáncer, el cáncer de mama es un problema de salud pública que requiere ser atendido de manera inmediata dado que esta enfermedad es la

neoplasia maligna más común y constituye la primera causa de defunción por enfermedad neoplásica en la población femenina en edad reproductiva tanto en México como en el mundo (Knaul *et. al.*, 2009).

1.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad en la que se desarrollan células malignas en el parénquima de la mama, formando un nódulo mamario (tumorción). La aparición de nódulos mamarios se debe en gran porcentaje a condiciones benignas, siendo los más frecuentes los fibroadenomas, el cistosarcoma filoide, los quistes mamarios, las placas fibrosas, los lipomas y la necrosis grasa; sin embargo, en algunos casos el nódulo palpable de la mama es cáncer (Gallego G, 2005).

De acuerdo a la región de la glándula mamaria que se ve afectada, el cáncer de mama puede ser de tipo ductal o lobulillar.

1.1.1. Carcinoma ductal

El carcinoma ductal comienza en las células epiteliales de los conductos galactóforos que llevan la leche desde los lobulillos hasta el pezón. Del 70 al 85% de los carcinomas ductales se presentan como carcinoma ductal *invasivo* y del 15 al 30% como carcinoma ductal *in situ* (Brandan and Navarro, 2006).

El carcinoma ductal *in situ* es aquel en el que las células malignas permanecen confinadas a los conductos galactóforos, sin evidencia de invasión al estroma subyacente (Pinder *et. al.*, 2002). La glándula mamaria está constituida por los conductos galactóforos que son los que conducen la leche desde los lobulillos hasta el pezón, las células epiteliales que circundan estos conductos pueden adquirir comportamiento canceroso, dando origen al carcinoma ductal, si las células malignas no han salido de dicho conducto y solo reducen la luz del mismo, se dice que el carcinoma es de tipo *in situ* (Figura 1).

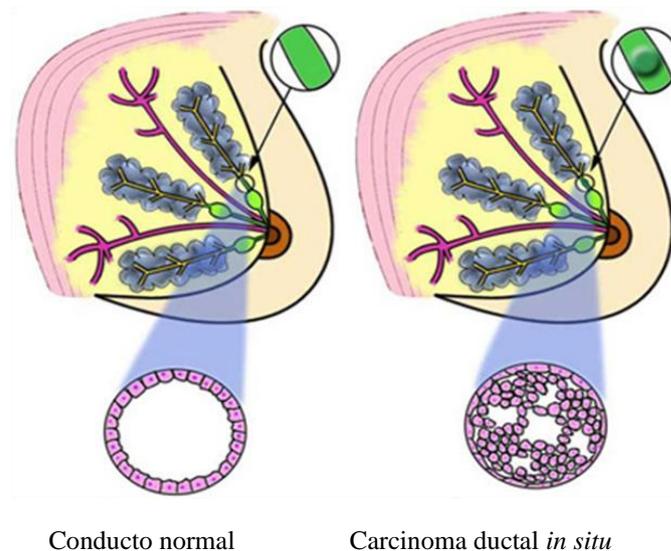


Figura 1. Conducto galactóforo normal y con carcinoma ductal *in situ*.
 Disponible en <http://www.virtualmedicalcentre.com/diseases/pre-invasive-ductal-carcinoma-ductal-carcinoma-in-situ-dcis-breast-cancer/674> [fecha de acceso 12 de Julio de 2013].

Hay tres grados de carcinoma ductal *in situ*, grado I (grado bajo), II (grado moderado) y III (grado alto). En el grado I, las células del carcinoma parecen muy similares a las células normales y la proliferación es lenta, aunque mayor que las células no neoplásicas. En el grado II, las células crecen más rápidamente que las células normales y son menos parecidas a éstas. En el grado III, las células cancerosas son muy diferentes de las células normales, ya que, se multiplican rápidamente y en forma desorganizada. Los pacientes con carcinoma ductal *in situ* de grado III tienen mayor probabilidad de desarrollar carcinoma ductal invasivo (IDC) (Medina *et. al.*, 2012). En el carcinoma ductal invasivo se invaden estructuras aledañas a los conductos galactóforos; es decir, las células neoplásicas escapan de la capa que reviste estos conductos afectando el estroma de la glándula mamaria (Brandan and Navarro, 2006). El carcinoma ductal, constituye la neoplasia más frecuente de la glándula mamaria, aproximadamente el 80 % de los carcinomas son de este tipo y el resto es lobulillar (Brandan and Navarro, 2006).

1.1.2. Carcinoma lobulillar

Los lóbulos de la glándula mamaria se ven afectados cuando las células epiteliales que circundan estas estructuras adquieren un comportamiento canceroso, dando origen al carcinoma lobulillar, que puede ser de tipo *in situ* o invasivo. Si las células cancerosas están confinadas únicamente al lóbulo y solo reducen la luz del mismo, el carcinoma es de tipo *in situ* (Figura 2), pero si invaden el estroma de la glándula mamaria, el carcinoma se considera invasivo (O'Malley *et. al.*, 2010).

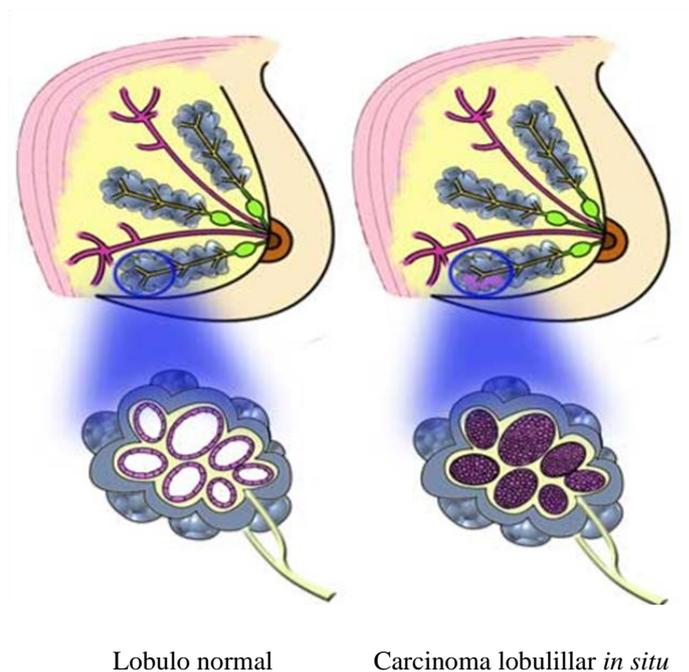


Figura 2. Lóbulo normal y carcinoma lobulillar *in situ*. Disponible en <http://www.virtualmedicalcentre.com/diseases/pre-invasive-lobular-carcinoma-lobular-carcinoma-in-situ-lcis-breast-cancer/6745> [fecha de acceso 12 de Julio de 2013].

Por lo general, el carcinoma lobulillar *in situ* se identifica de manera casual en una biopsia realizada por otros motivos, dado que no logra identificarse ni clínica ni mastográficamente, a diferencia del carcinoma ductal *in situ*. Este tipo de lesiones aparecen predominantemente en mujeres premenopáusicas y la mayoría de los casos son diagnosticados entre los 40 y 50 años de edad (O'Malley *et. al.*, 2010).

1.2. Incidencia y mortalidad del cáncer de mama

En México, el 46% de las mujeres afectadas con cáncer de mama lo presentan antes de los 50 años y el grupo de edad más afectado es el de 40 a 49 años. Esto contrasta con lo observado en Estados Unidos, donde la edad promedio en la que se presenta esta enfermedad es de 63 años y en países europeos, la mayor incidencia es en mujeres postmenopáusicas (Rodríguez-Cuevas *et. al.*, 2001).

De acuerdo a las estadísticas de globocan 2008, a nivel mundial se registraron 1,384,155 nuevos casos con 458,503 defunciones (Figura 3). En lo que respecta a nuestro país, se reportaron 13,939 nuevos casos y 5,217 defunciones (Figura 3), que representa una razón de mortalidad-incidencia del 37.42%. Si bien la incidencia de cáncer de mama es mayor en países desarrollados, el nivel de mortalidad por dicho cáncer es más elevado en países en desarrollo, como México, esto en comparación con Estados Unidos cuya incidencia fue de 182,460 nuevos casos y 40,481 defunciones, con una razón mortalidad-incidencia del 22.18%.

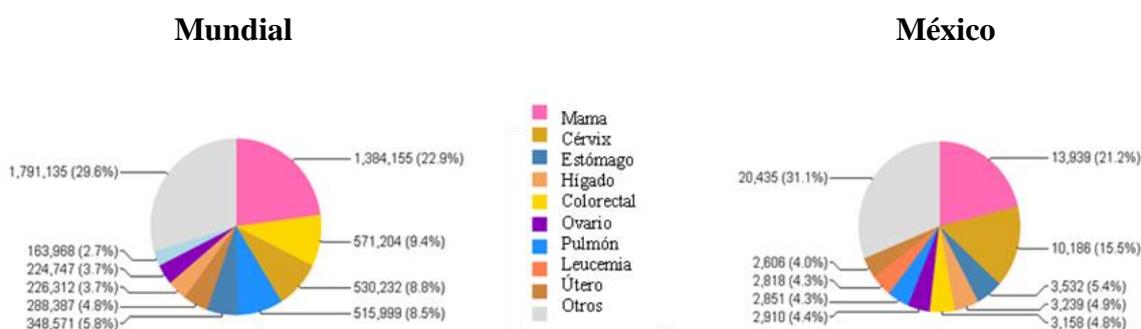


Figura 3. Incidencia de neoplasias en la población femenina. Incidencia de neoplasias en la población femenina en edad reproductiva a nivel mundial (izquierda) y en México (derecha). Los números denotan los nuevos casos de cada neoplasia y entre paréntesis se observa el porcentaje de incidencia, en comparación al total de neoplasias. El color rosa representa el cáncer de mama. Disponible en <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp> [fecha de acceso 12 de Julio de 2013].

En el mundo, tanto la incidencia como la mortalidad por carcinoma mamario han mostrado una tendencia creciente. En México, a partir del año 2006, el riesgo de morir

por cáncer de mama excedió el riesgo de morir por cáncer cervicouterino, constituyendo la primera causa de defunción por enfermedad neoplásica en la población femenina (Knaul *et. al.*, 2008). Por ello, resulta evidente la necesidad de fortalecer en nuestro país la investigación orientada a comprender los procesos implicados en dicha patología con la finalidad de desarrollar nuevos tratamientos, estrategias de prevención y métodos de diagnóstico tempranos.

Actualmente, el diagnóstico del cáncer de mama es cada vez más preciso, lo que permite seleccionar a las pacientes para uno u otro tratamiento basándose en el perfil molecular de cada tumor en particular.

1.3. Clasificación molecular del cáncer de mama

De acuerdo al perfil de expresión de genes se distinguen principalmente cuatro clases moleculares de cáncer de mama, dentro de éstos, los tumores luminales poseen un patrón fenotípico similar al componente epitelial luminal de la glándula mamaria; es decir, expresan altas cantidades de citoqueratinas luminales (Imigo *et. al.*, 2011).

1.3.1. Cáncer de mama luminal A

El cáncer de mama de tipo luminal A es positivo al receptor de estrógenos (RE), negativo para el receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2 neu), las células presentan buena diferenciación y baja expresión de Ki-67, por lo que histológicamente este cáncer se considera de bajo grado (Sotiriou *et. al.*, 2009). El cáncer de mama luminal A es el más frecuente, correspondiendo al 67% de los tumores (Imigo *et. al.*, 2011).

1.3.2. Cáncer de mama luminal B

Este tipo de cáncer es positivo al RE, pero la mayoría expresa bajos niveles de receptores hormonales, son frecuentemente de alto grado debido a la alta expresión de Ki-67y pobre diferenciación (Sotiriou *et. al.*, 2009).

1.3.3. Cáncer de mama luminal HER-2 neu

Los cánceres positivos al receptor HER-2 neu muestran amplificación y alta expresión del gen ERBB2 (gen que da origen al receptor ERBB2 también conocido como HER-2 neu) y pueden ser positivos o no al RE (Sotiriou *et. al.*, 2009). El cáncer

de mama luminal HER-2 neu se caracteriza además por expresar citoqueratinas 9 y 10 (Imigo *et. al.*, 2011).

1.3.4. Cáncer de mama de tipo basal

En esta clasificación, la mayoría de los cánceres corresponden a tumores negativos al RE, receptor de progesterona (RP) y al HER-2 neu, por lo que se denominan tumores triple negativo. El cáncer de mama de tipo basal, posee un patrón fenotípico similar al componente mioepitelial de la glándula mamaria (Imigo *et. al.*, 2011). Otra característica de los tumores de tipo basal es la disfunción de la vía del BRCA1 (Breast Cancer tipo 1) causada por la metilación del promotor del gen, la inactivación transcripcional, o ambos. Interesantemente, casi todos los tipos de cáncer de mama asociados con una mutación del gen BRCA1, esporádico o hereditario, tienen fenotipo triple negativo (Sotiriou *et. al.*, 2009).

Con base en la firma molecular de los tumores, se designa una estrategia terapéutica personalizada que represente mayor probabilidad de éxito con menores efectos secundarios.

1.4. Tratamiento del cáncer de mama

Los procedimientos locales son la cirugía y la radioterapia; mientras que la quimioterapia, la terapia inmunológica y la hormonal constituyen el tratamiento sistémico y se utilizan de forma complementaria a los métodos locales.

1.4.1. Tratamiento local

En los estadios tempranos del cáncer de mama, la cirugía es el tratamiento fundamental y asociado a la radioterapia pueden controlar la enfermedad en la mayoría de los casos (Imigo *et. al.*, 2011). Dependiendo del grado de la enfermedad, la cirugía puede ser de tipo conservadora o mastectomía (extirpación completa de la glándula mamaria). En lo que respecta a la radioterapia, ésta es crucial para pacientes con cáncer de mama a las que se les practicó cirugía conservadora y para aquellas con enfermedad metastásica (Chavarri-Guerra *et. al.*, 2012).

1.4.2. Tratamiento sistémico

En relación con la quimioterapia, los regímenes preferidos para el tratamiento de cáncer de mama son los siguientes:

TAC: incluye docetaxel, doxorrubicina y ciclofosfamida.

AC: tratamiento con doxorrubicina y ciclofosfamida. También se da la terapia AC seguida de docetaxel.

FAC: circunscriben fluorouracilo, doxorrubicina y ciclofosfamida.

EC: incluye epirrubicina y ciclofosfamida.

CMF: incluye ciclofosfamida, metotrexato y fluorouracilo.

El régimen quimioterapéutico lo elige el especialista con base en el riesgo y toxicidad, además se toma en cuenta la edad de la paciente y su estado funcional. Los regímenes con doxorrubicina han demostrado ser más eficaces y se recomiendan en pacientes con alto riesgo, como es el caso de metástasis a ganglios (Medina, 2012).

Con relación a la terapia hormonal, su elección se basa en la presencia del RE (Hergueta-Redondo *et. al.*, 2008) Los tumores RE positivos generalmente responden eficazmente a la terapia antiestrogénica y cursan con mejor pronóstico. Cuando la terapia hormonal es ineficaz o hay tumores con receptores negativos, la quimioterapia es la mejor alternativa. Por otro lado, pacientes cuyos tumores sobre expresan al HER-2 neu responden eficazmente a la terapia con anticuerpos anti HER-2 neu, como lo es el trastuzumab (Chavarri-Guerra *et. al.*, 2012).

La elección del tratamiento cuando hay expresión de receptores hormonales o receptores a factores de crecimiento es clara; sin embargo, existen tumores que no se benefician de una terapia dirigida, ya que no expresan ninguno de estos marcadores, tales como los triple negativo, tumores que suelen ser agresivos y de mal pronóstico, ya que la sobrevida total y libre de enfermedad es baja (Clarck *et. al.*, 1988). En un estudio llevado a cabo con mujeres hispanas, de 2074 pacientes, 57% presentó tumores positivos a receptores hormonales, 20% tuvo tumores positivos a HER-2 neu y 23% mostró tumores triple negativo. La prevalencia mostrada en este estudio de tumores triple negativo fue mayor que la reportada en pacientes caucásicas de 10 a 13% (Hergueta-Redondo *et. al.*, 2008). Con base en lo anterior, se decidió utilizar el diseño de una nueva estrategia terapéutica basada en marcadores moleculares que se expresen,

en el mayor número de tumores y cuya efectividad sea independiente de la presencia del RE o HER-2 neu.

Considerando lo anterior, los estudios se centraron en dos biomarcadores altamente expresados en diferentes tipos de tumores de mama; el VDR y el canal de potasio Eag1, que se sabe se expresan en 90 y 85%, respectivamente e independientemente de la presencia de otros marcadores (Hemmerlein *et. al.*, 2006; Berger *et. al.*, 1991). Cabe mencionar que el ligando natural del VDR es el calcitriol.

1.5. Calcitriol y cáncer de mama

El metabolito más activo de la vitamina D₃ es el 1 α ,25 dihidroxivitamina D₃ (calcitriol), un secoesteroide con potente actividad antineoplásica cuya síntesis en el organismo se inicia en la piel a partir del precursor 7-dehidrocolesterol por acción de las radiaciones ultravioleta (UV 290-315 nm) provenientes de la luz solar. De esta manera, se forma el colecalciferol, el cual, es transportado por su proteína de unión hasta el hígado, donde es hidroxilado por la enzima vitamina D-25-hidroxilasa (25-OHase, CYP27A1) produciendo así la 25-hidroxivitamina D₃ (calcidiol), el compuesto más abundante de la vitamina D en la circulación sanguínea (10-50 ng/ml) (Barrera D, 2013). Posteriormente, el calcidiol se traslada hasta el riñón, donde es hidroxilado por la enzima 25-hidroxivitamina D₃-1 α -hidroxilasa (1 α -hidroxilasa; CYP27B1) mitocondrial, para así obtener su forma hormonalmente activa: el calcitriol, el cual circula en la sangre en concentraciones que oscilan entre 15 a 60 pg/ml (Barrera D, 2013). Aunque la síntesis del calcitriol tiene lugar principalmente en el riñón, la presencia de CYP27B1 ha sido reportada en otros tejidos tales como la piel, la próstata, el intestino, el músculo esquelético, el tejido adiposo, en los islotes pancreáticos, en los nódulos linfáticos, el cerebro, el colon, la placenta y la glándula mamaria, en donde se lleva a cabo la síntesis local del calcitriol. La alta actividad biológica del calcitriol requiere de la regulación fina de sus concentraciones en el organismo, por lo que esta hormona regula su propia síntesis mediante la inducción de la enzima 1 α , 25-dihidroxivitamina D₃-24-hidroxilasa (24OHasa; CYP24A1), encargada de iniciar el catabolismo del calcitriol y de su precursor, para dar origen a compuestos fácilmente excretables (1 α ,24,25-trihidroxivitamina D₃ y 24,25-dihidroxivitamina D₃, respectivamente), como se muestra en la figura 4 (Deeb *et. al.*, 2007).

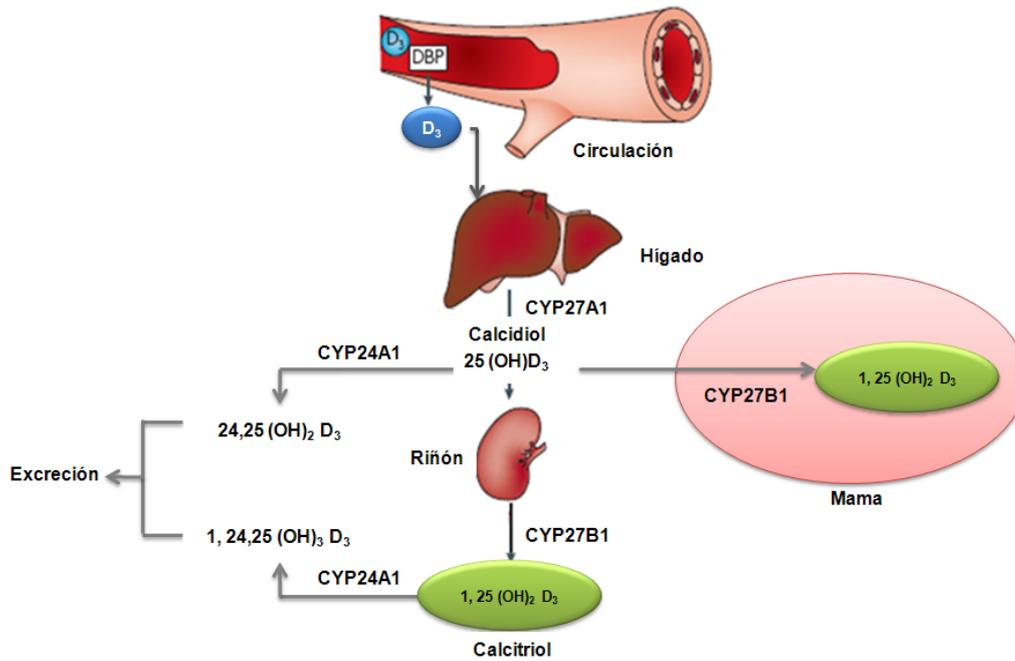


Figura 4. Metabolismo de la vitamina D.

El calcitriol actúa a través del VDR (la isoforma clásica es la de 50 kDa), un factor de transcripción dependiente de ligando (Deeb *et. al.*, 2007) y controla la expresión de genes asociados con la homeostasis del calcio. Además, el calcitriol es un importante agente anticancerígeno endógeno cuyos efectos son mediados por diversos mecanismos como la inhibición de la proliferación, la citodiferenciación y la inducción de la apoptosis a través de la expresión o inhibición de genes blanco. El acoplamiento del calcitriol con su receptor, el receptor de la vitamina D (VDR), permite la dimerización con el receptor a retinoides X (RXR). Dicho heterodímero se transloca al núcleo y se une a elementos de respuesta a la vitamina D (VDRE's) en genes blancos, recluta a coactivadores de la maquinaria de transcripción e induce la expresión génica. Alternativamente, el heterodímero se puede unir al factor de transcripción VDIR (represor que interactúa con el VDR) y subsecuentemente a elementos de respuesta a la vitamina D atípicos negativos (nVDRE's), reclutar correpresores de la transcripción e inhibir la transcripción de genes específicos (Figura 5) (Deeb *et. al.*, 2007, Beer *et. al.*, 2004; Hansen *et. al.*, 1994).

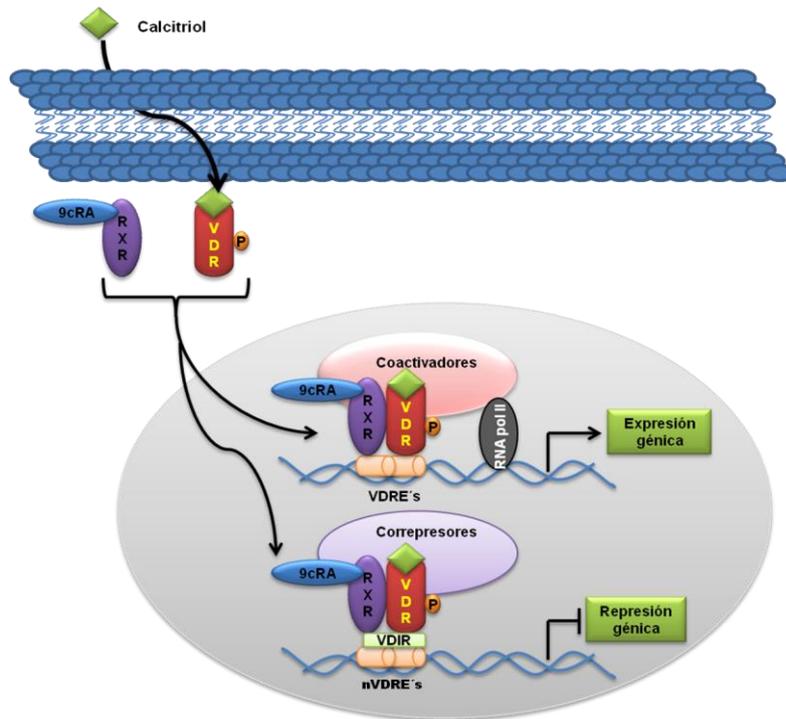


Figura 5. Mecanismo de acción del calcitriol.

Más del 90% de los tumores de cáncer de mama expresan al VDR, lo cual correlaciona con el mayor tiempo libre de la enfermedad en comparación con los pacientes con tumores VDR negativos Berger *et. al.*, 1991). A pesar de la presencia y funcionalidad del VDR, una consideración importante para la señalización y consecuentes efectos antineoplásicos del calcitriol es el nivel de CYP24A1, que cataboliza al calcitriol. En las células normales, la expresión de CYP24A1 es prácticamente imperceptible; sin embargo, en las neoplasias se encuentra sobreexpresada, sugiriendo su participación en la tumorigénesis (Lopes *et. al.*, 2010). Por lo tanto, el uso de los fármacos específicos capaces de suprimir el catabolismo del calcitriol al bloquear la acción de CYP24A1 constituye una estrategia atractiva para potenciar su actividad antitumoral.

Los efectos antineoplásicos del calcitriol se han observado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. El calcitriol *in vivo*, inhibe el crecimiento tumoral de las células de cáncer de mama xenoinjertadas en ratones inmunodeprimidos, sin mostrar efectos secundarios de hipercalcemia con los regímenes de dosificación adecuados (Swami *et. al.*, 2011), mientras que el calcitriol ejerce efectos antineoplásicos, el canal de potasio Eag1 es oncogénico.

1.6. Canal de potasio éter à-go-go 1 (Eag1)

La expresión de Eag1 se encuentra prácticamente confinada al sistema nervioso central; sin embargo, su expresión exacerbada fuera de dicho sitio se asocia con la progresión del cáncer (Hemmerlein *et. al.*, 2006; Camacho, 2006; Pardo and Sthumer, 2008). El canal Eag1 presenta alto potencial oncogénico de acuerdo a lo demostrado por Pardo y colaboradores en 1999, en cuyos experimentos *in vitro* se evidenció que la transfección de Eag1 a las células de mamífero confiere un fenotipo canceroso; es decir, pierden la inhibición por contacto formando cúmulos, así como la dependencia a factores de crecimiento presentando alta síntesis de DNA y actividad metabólica (Pardo *et. al.*, 1999).

La expresión de Eag1 ha sido detectada en varias líneas celulares tumorales incluyendo IGR-1, SHSY-5Y, HeLa y MCF-7; derivadas de melanoma, neuroblastoma, cérvix y mama, respectivamente (Pardo *et. al.*, 1999; Gavrilova-Ruch *et. al.*, 2002); así como en cultivos primarios de cáncer cervical y de mama (Farías *et. al.*, 2004; García-Becerra *et. al.*, 2010). Su expresión también ha sido detectada en los tejidos neoplásicos de mama, cérvix, próstata, hígado, ovario, endometrio, tiroides, colon y pulmón, por lo que Eag1 ha sido identificado como nuevo blanco oncológico presente en diferentes tipos de tumores (Hemmerlein *et. al.*, 2006; Farías *et. al.*, 2004; García-Becerra *et. al.*, 2010), ya que la inhibición de su expresión con oligonucleótidos antisentido en diferentes líneas celulares tumorales, entre ellas de cáncer de mama, causa extensa reducción de la síntesis de DNA (Pardo *et. al.*, 1999). De manera similar, la inhibición de corrientes mediadas a través del canal Eag1, con el uso de anticuerpos monoclonales y diversos fármacos disminuye la proliferación celular (Gómez-Varela *et. al.*, 2007).

1.7. Eag1 y cáncer de mama

En el cáncer de mama, el canal Eag1 es fuertemente regulado durante la progresión del ciclo celular. En células MCF-7 tratadas con el inhibidor del canal de potasio astemizol o siRNA (RNA pequeño de interferencia) disminuyeron la proliferación celular de manera dependiente de la concentración, incrementando el número de células en la fase G1 y disminuyendo el número de células en la fase S (Ouadid-Ahidouch *et. al.*, 2001; Borowiec *et. al.*, 2007). De igual forma, en los cultivos primarios de cáncer de mama, la inhibición de la expresión de Eag1 disminuyó la

proliferación celular de manera dependiente de la concentración (García-Becerra *et. al.*, 2010).

Por lo tanto, el bloqueo específico del canal con un compuesto que no afecte los canales del sistema nervioso central conduciría a la inhibición selectiva de la proliferación de células tumorales.

1.8. Astemizol y Eag1

El astemizol (Figura 6) es un antihistamínico de segunda generación usado en el tratamiento de alergias. Éste no atraviesa la barrera hematoencefálica y por lo tanto, no causa depresión del sistema nervioso central a la dosis establecida. El astemizol compite con la histamina por la unión a los receptores H₁ en el tracto gastrointestinal (GI), el útero, los vasos sanguíneos y el músculo bronquial suprimiendo la formación de edema y prurito resultante de la actividad histamínica. El astemizol es rápidamente absorbido en el tracto GI y la máxima concentración plasmática se alcanza de 1 a 4 horas después de la ingesta, pero el efecto comienza a manifestarse después de 2 a 3 días. El tiempo de vida media del astemizol es de 20 horas, tiene larga duración de acción, siendo suficiente una sola dosis diaria (10 mg) para mantener sus efectos antihistamínicos, los cuales son usualmente máximos de 9 a 12 días después de la administración. El astemizol se une a las proteínas plasmáticas (96.7%) y la concentración plasmática es de 3-5 ng/ml (0.10 µM) (García-Quiroz and Camacho, 2011).

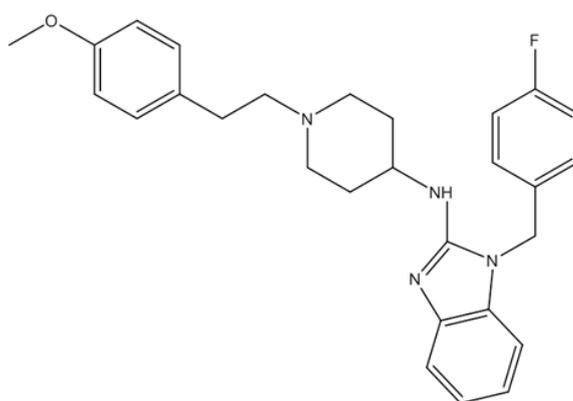


Figura 6. Fórmula estructural del astemizol.

El astemizol también tiene efectos antineoplásicos, los cuales no son precisamente atribuidos a su papel como antihistamínico sino más bien a la inhibición de la actividad

del canal de potasio oncogénico Eag1. El astemizol atraviesa la membrana celular en su forma no cargada y se une al canal Eag1 del lado intracelular en su forma cargada, bloqueando así la actividad del canal (García-Ferreiro *et. al.*, 2004) y con ello la proliferación celular (García-Becerra *et. al.*, 2010; Roy *et. al.*, 2008). En estudios *in vitro*, el astemizol disminuye la proliferación de las células de la leucemia, las líneas celulares y los cultivos primarios del cáncer de mama, así como los queratinocitos transfectados con Eag1 (García-Becerra *et. al.*, 2010; Roy *et. al.*, 2008; Díaz *et. al.*, 2009; Ouadid-Ahidouch *et. al.*, 2004). En lo que respecta a los estudios *in vivo*, el astemizol a la dosis de 50 mg/kg de peso inhibe el crecimiento tumoral en ratones inmunodeprimidos xenotransplantados con células de cáncer de mama (Downie *et. al.*, 2008). La dosis de 50 mg de astemizol por kg de peso es suficiente para inhibir el crecimiento tumoral en ratones sin producir efectos adversos perceptibles (pérdida de peso corporal, diarrea y alteraciones en la actividad física). La dosis letal 50 (DL₅₀) reportada en ratones es de 2052 mg /kg de peso (García-Quiroz and Camacho, 2011).

1.9. Calcitriol y Eag1

Por otra parte, el calcitriol, considerado como potente agente antineoplásico endógeno, inhibe la expresión de Eag1 (García-Becerra *et. al.*, 2010; Avila *et. al.*, 2010). García-Becerra y colaboradores demostraron en el 2010 que otro de los posibles mecanismos antineoplásicos del calcitriol radica en la disminución de la expresión de Eag1 en cultivos primarios de cáncer de mama (García-Becerra *et. al.*, 2010). En dichos experimentos se observó que el calcitriol disminuyó la expresión de Eag1 de manera dependiente de la concentración y que este efecto fue mediado por el VDR, ya que la coincubación del calcitriol con el antagonista del VDR: (23S)-25-dehydro-1 α -hydroxyvitamina-D3-26,23-lactona (TEI-9647), no afectó la expresión del canal (Figura 7). El TEI-9647 además de competir con el calcitriol por la unión con el VDR, induce en el receptor cambios conformacionales distintos a los incitados por el calcitriol, lo que disminuye la interacción del VDR con el RXR y proteínas coactivadoras (Toell *et. al.*, 2001).

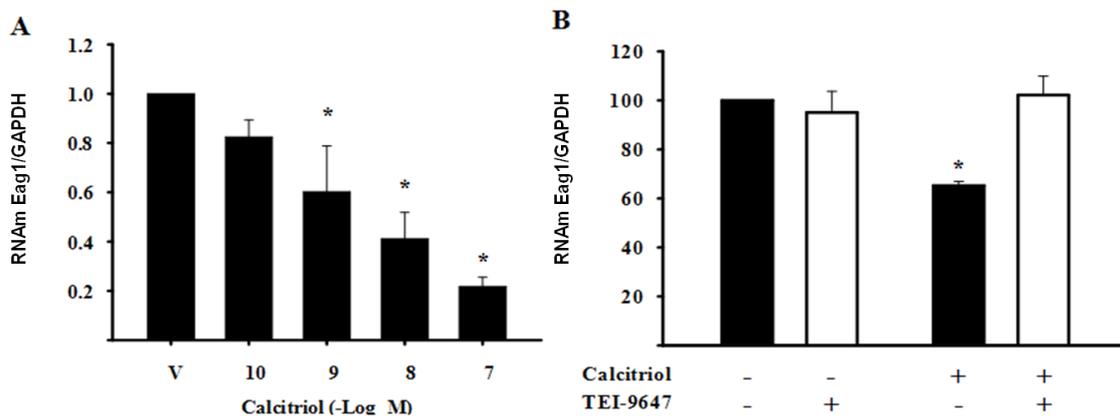


Figura 7. El calcitriol inhibe la expresión génica de Eag1 por un mecanismo mediado por el VDR. (A) Células de cáncer de mama se incubaron en presencia de calcitriol o su vehículo (V). Los resultados son representativos de siete experimentos independientes. Los datos se normalizaron asignando el valor de 1 a las células tratadas con vehículo. (B) Las células se incubaron en presencia o ausencia de calcitriol (1×10^{-9} M), sin (-) o con (+) el antagonista de VDR, TEI-9647 (1×10^{-7}). Los resultados están expresados en porcentaje, dando el valor de 100 a las células tratadas con vehículo. Promedio \pm D.S. * $P < 0.05$ vs vehículo (García-Becerra *et. al.*, 2010).

El efecto inhibitorio del calcitriol sobre la expresión de Eag1 también se reflejó a nivel de proteína, con la consecuente disminución de la proliferación de cultivos primarios de cáncer de mama (García-Becerra *et. al.*, 2010). El promotor del canal Eag1 aún no ha sido descrito; sin embargo, el grupo de trabajo del Dr. Euclides Ávila se encuentra trabajando en ello y al parecer dicho promotor presenta secuencias que podrían codificar para nVDRE's (comunicación personal).

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta relación mortalidad-incidencia en el cáncer de mama, es necesario fortalecer la investigación orientada a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas con el enfoque hacia nuevos blancos, ya que una de las principales limitantes del tratamiento convencional para pacientes con cáncer de mama es que su efectividad depende de la presencia de receptores hormonales o de factores de crecimiento. Considerando que Eag1 y VDR se expresan en gran porcentaje de los tumores de mama, el presente proyecto contempla usar a estas proteínas como blanco terapéutico del calcitriol y del astemizol.

Al inhibir la expresión o la actividad de Eag1 se disminuye la proliferación celular, por lo que se decidió llevar a cabo doble inhibición del canal. Se utilizó el calcitriol para inhibir la expresión de Eag1, mientras que el astemizol se usó para bloquear su actividad.

3. HIPÓTESIS

La administración conjunta del calcitriol y del astemizol inhibirá el crecimiento de células neoplásicas *in vitro* e *in vivo* en mayor medida que la administración separada de cada compuesto.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar los efectos antineoplásicos en conjunto del calcitriol y del astemizol en las células del carcinoma mamario humano *in vitro* e *in vivo*.

Objetivos específicos

- Establecer los cultivos primarios del cáncer de mama.
- Caracterizar los cultivos primarios y las líneas celulares establecidas SUM-229 PE y T-47D.
- Evaluar los efectos *in vitro* del calcitriol y/o astemizol sobre la proliferación celular, así como sobre la expresión de Ki-67 y Eag1.
- Evaluar los efectos *in vivo* del calcitriol y del astemizol solos y en combinación sobre el crecimiento tumoral en ratones atímicos xenoinjertados con las células tumorogénicas del cáncer de mama.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

Los medios de cultivo, suero fetal de bovino (SFB), Trizol® y los oligonucleótidos para la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) fueron adquiridos de Invitrogen (CA, EUA). Las sondas moleculares, capilares, sistema de retrotranscripción (RT) y el estuche para evaluar la proliferación celular fueron de Roche (Roche Applied Science, IN, EUA). El calcitriol y el astemizol (para los estudios *in vitro*) fueron amablemente donados por Hoffmann-La Roche Ltd (Basel, Switzerland) y Liomont (México, D. F.), respectivamente. Para los estudios *in vivo*, se utilizó una suspensión pediátrica de astemizol (Astesen ® Laboratorios Senosiain).

5.2. Tejidos humanos

Las biopsias de cáncer de mama, a partir de las cuales se derivaron los cultivos primarios, fueron obtenidas del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán con autorización del Comité de Ética Institucional (número de protocolo BRE-114-09-13-1) y firma de consentimiento informado por parte de las pacientes. Las biopsias fueron colectadas durante la lumpectomía de pacientes con diagnóstico de IDC, por lo que los cultivos primarios se denominaron de esta manera. Las líneas celulares del carcinoma mamario humano SUM-229PE y T-47D fueron adquiridas de Asterand, San Francisco, CA y ATCC, Manassas, VA, respectivamente.

La selección de las biopsias de los pacientes con cáncer de mama, se basó en los siguientes criterios.

Criterios de inclusión

- Muestras con diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal invasivo o *in situ*, independientemente del fenotipo molecular y del grado de malignidad
- Expresión de VDR y Eag1

Criterios de exclusión

- Antecedentes de quimio o radioterapia

Criterios de eliminación

- Fibroadenomas
- Tejido visiblemente dañado

5.3. Cultivo celular

Los cultivos primarios se derivaron de la siguiente manera: las biopsias se incubaron en cajas de cultivo de 25 cm² en medio DMEM-F12. Alrededor de las biopsias cultivadas creció una mezcla de poblaciones celulares (epitelial y estromal), las cuales se tripsinizaron (tripsina/EDTA 0.25 %/0.2 g/l) para su amplificación y propagación. Las células T-47D y SUM-229PE se cultivaron en el medio RPMI y HAM'S-F12, respectivamente. Todos los medios se suplementaron con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml streptomycin y 5% de SFB inactivado; al medio de SUM-229PE, además, se le adicionaron 5 µg/ml de insulina, 1 µg/ml de hidrocortisona y HEPES (10 mM). Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en medio DMEM-F12 suplementado con 5% de SFB inactivado y tratado con carbón-dextrán. El mantenimiento celular así como los procedimientos experimentales se llevaron a cabo a 37°C bajo atmósfera húmeda, 5% de CO₂ y 95% de aire.

5.4. Inmunocitoquímica (ICQ)

Aproximadamente después de cinco pases, las células se cultivaron en laminillas electrocargadas para cultivo celular (Thermo Scientific Nunc, 177380) y se fijaron en etanol al 96% para su caracterización. La recuperación antigénica se realizó en *EDTA decloaker* (Biocare Medical). Las laminillas se trataron por 5 minutos con bloqueador de peroxidasa *immunodetector* (BioSB). Para Eag1 un bloqueo adicional de 5 minutos se llevó usando *background sniper* (Biocare Medical). Con la finalidad de caracterizar las células, las laminillas se incubaron por 1 hora en presencia de los siguientes anticuerpos: REα (1:250, BioSB), VDR (1:100, Santa Cruz Biotechnology), HER-2 neu (1:100, Dako), RP (1:250, BioSB) y Eag1 (1:300, Novus Biologicals, el cual se incubó por 2 horas). Posteriormente, las laminillas se incubaron con *Immuno Detector Biotin Link* e *Immuno Detector HRP* (BioSB) durante 10 minutos. La diaminobencidina y la hematoxilina se usaron para revelar y contrateñir, respectivamente. Después de la incubación de cada reactivo, las laminillas se lavaron por 2 minutos con TBS. Para analizar el efecto *in vitro* de los fármacos sobre la expresión de Ki-67 a nivel de proteína, las células se cultivaron en presencia de las respectivas concentraciones inhibitorias al 20% (CI₂₀) del calcitriol, del astemizol, ambos fármacos o vehículo, por 48 horas. Después de éste tiempo, las células se fijaron y procesaron como se describió

anteriormente, usando un anticuerpo monoclonal anti-Ki-67 (1:100, BioSB). Para evaluar la expresión de Ki-67, las células no se contratiñeron con hematoxilina. El porcentaje de positividad de Ki-67 se calculó contando el total de núcleos positivos x 100/total de células contadas. Se analizaron tres líneas celulares, las células totales se contaron en al menos 3 campos diferentes por tratamiento y en el análisis participaron tres observadores.

5.5. Inmunohistoquímica (IHQ)

El tejido tumoral se fijó en formaldehído al 10% y se procesó bajo concentraciones crecientes de alcohol para deshidratarlo, posteriormente se embebió en bloques de parafina y se hicieron cortes de aproximadamente 2 μ M que se fijaron en laminillas electrocargadas (Biocare Medical). La recuperación antigénica se indujo con citrato (BioSB) y calor en olla de presión digital (modelo número PC-2000; BSB 7008) por 20 minutos. Posteriormente, las laminillas se trataron por 5 minutos con el bloqueador de peroxidasa *Poly Detector* (BioSB). Para evaluar el efecto del calcitriol, astemizol, o ambos sobre la expresión del marcador de proliferación, las laminillas se incubaron por una hora en presencia del anticuerpo anti- Ki-67 (1:100, BioSB). Al cabo de este tiempo, las laminillas se lavaron y se incubaron con *Poly Detector HRP* (BioSB) durante 45 minutos. Con diaminobencidina se reveló y con hematoxilina se contratiñó. El porcentaje de positividad de Ki-67 se calculó contando el total de núcleos positivos x 100/total de células contadas. Las células totales se contaron en al menos 3 campos diferentes por tratamiento, en tumores provenientes de al menos 3 ratones distintos. En el análisis participaron tres observadores.

5.6. Western blot (WB)

Las células se trataron con vehículo, calcitriol y/o astemizol (CI_{20}) durante 48 horas. Al cabo de este tiempo, se aspiró el medio, las células se tripsinizaron, centrifugaron y el botón celular se lisó con buffer RIPA (fosfato de sodio dibásico 9.1 mM, fosfato de sodio monobásico 1.7 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40, 0.1% SDS, pH 7.4) en presencia de inhibidores de proteasas. El lisado celular total (50 μ g) se separó en geles de poliacrilamida (10% SDS-PAGE) bajo condiciones desnaturizantes y reductoras, se transfirió a membranas de PVDF y se bloqueó con 10% de leche descremada en PBS. Las membranas se incubaron en presencia de anti-VDR (1:200, C-

20, Santa Cruz Biotechnology) durante 24 horas a 4°C y se visualizaron al incubar las membranas con el segundo anticuerpo conjugado a la peroxidasa (1:1000). La detección quimioluminiscente se realizó con el reactivo *ECL+plus* (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia) y se expusieron las membranas a placas de rayos X. Para la normalización de los resultados, las membranas se colocaron en solución de lavado (2% w/v SDS, 62.5 mM Tris-HCL pH 6.8, 100 mM 2-mercapto-etanol) con agitación durante 10 minutos y posteriormente, se incubaron secuencialmente con anti-GAPDH (1:10000, Millipore) y anti-mouse HRP (1:10000, Jackson Immunoresearch Laboratories).

5.7. Estudios de proliferación

Las células se sembraron en placas de 96 pozos a razón de 1000 células por pozo, 24 horas después se adicionó el medio conteniendo el vehículo, el astemizol, el calcitriol o la combinación de ambos por sextuplicado y se incubaron durante 6 días. Al cabo de este tiempo, se evaluó la proliferación celular mediante el ensayo colorimétrico basado en XTT (sodio 3'-(1-(fenilaminocarbonilo)-3,4-tetrazolium)-bis (4-metoxi-6-nitro) hidrato ácido benceno sulfónico), siguiendo las indicaciones del fabricante. La sal de tetrazolium, XTT, se usa para determinar cuantitativamente la proliferación de las células metabólicamente activas. El ensayo se basa en la escisión del anillo de tetrazolium del XTT (de color amarillo) por la deshidrogenasa mitocondrial y el reactivo acoplador de electrones PMS (N-metildibenzopirazina metil sulfato) para formar la sal de formazan (de color naranja), la cual es soluble en solución acuosa y se cuantifica por absorbancia mediante un espectrofotómetro. Para estos experimentos, la absorbancia se determinó en un espectrofotómetro Multiskan (Labsystems Inc., Canada) a 492 nm. Los valores de absorbancia se normalizaron con respecto al vehículo, al cual se le dio arbitrariamente el valor de 100.

5.8. Determinación de las concentraciones inhibitorias (CI) y del índice de combinación (IC)

Las CI se calcularon a partir de las curvas de concentración-respuesta de cada compuesto por el análisis de regresión logística no lineal utilizando el programa Origin (OriginLab Corporation, Northampton, MA). La CI_{50} se consideró como la concentración necesaria de cada compuesto para inhibir el 50 % de la proliferación

celular con respecto al máximo y mínimo efecto, dentro del intervalo de concentraciones probadas (calcitriol: 0.1 nM – 1 µM, astemizol: 0.5 – 4.5 µM). Por otro lado, el IC entre los fármacos se determinó con la fórmula descrita por Chou-Talalay (Fórmula 1), la cual indica que si el valor es < 1, = 1 ó > 1, el efecto al coincubar dos o más fármacos es de tipo sinérgico, aditivo o antagónico, respectivamente (Chou, 2006).

$$IC = \frac{(D)_1}{(Dm)_1 (fa/1-fa)^{1/m1}} + \frac{(D)_2}{(Dm)_2 (fa/1-fa)^{1/m2}}$$

Fórmula 1: Fórmula para determinar el índice de combinación. IC=índice de combinación; (D)₁=concentración utilizada del fármaco 1; (D)₂=concentración utilizada del fármaco 2; (Dm)₁=concentración inhibitoria al 50 % del fármaco 1; (Dm)₂=concentración inhibitoria al 50% del fármaco 2; Fa=fracción afectada de la proliferación celular cuando se coincuban los dos fármacos (Fa=1-(valor de absorbancia normalizado/100)); m₁=pendiente obtenida con la curva de concentración respuesta del fármaco 1; m₂=pendiente obtenida con la curva de concentración respuesta del fármaco 2 (Chou, 2006).

5.9. Estudios de expresión génica

Las células se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de calcitriol y/o astemizol o su vehículo durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, se aspiró el medio y se extrajo el RNA utilizando Trizol®. Tres µg de RNA se utilizaron para la reacción de retrotranscripción. El qPCR se llevó a cabo en el instrumento LightCycler® 2.0 de Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) de acuerdo al siguiente protocolo: activación de la Taq DNA polimerasa a 95 °C x 10 minutos, seguido de 45 ciclos de amplificación de 95 °C x 10 segundos, 60 °C x 30 segundos y 72 °C x 1 segundo. Para los estudios *in vitro*, la expresión relativa del RNAm de Ki-67, Eag1, CYP24A1 y VDR se normalizó *versus* la expresión del gen gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), mientras que para el análisis de expresión génica en tejido tumoral y cerebro se utilizó β-Actina y L32, respectivamente. Las secuencias de los oligonucleótidos así como las sondas utilizadas y las tallas de los amplicones resultantes se describen en la tabla 1. Los valores de vehículo se llevaron arbitrariamente a 1.

Tabla 1: Sondas y oligonucleótidos utilizados.

Gen/número de acceso	Sentido	Antisentido	Amplicon (nt)	No. sonda*
hEag1/AF078741.1	cct gga ggt gat cca aga tg	cca aac acg tct cct ttt cc	60	49
hKi-67/X65550.1	ggt gtg cag aaa atc caa aga	act gtc cct atg act tct ggt tg	77	73
hCYP24A1/NM_00078 2.3	cat cat ggc cat caa aac aa	gca gct cga ctg gag tga c	65	88
hVDR/NM_000376.1	gtg aga cct cac aga aga gca c	cat tgc ctc cat ccc tga	72	68
hGAPDH/AF261085.1	agc cac atc gct gag aca c	gcc caa tac gac caa atc c	66	60
hβ-actina	aag gcc aac cgt gaa aag at	gtg gta cga cca gag gca tac	110	56
mL32	gct gcc atc tgt ttt acg g	tga ctg gtg cct gat gaa ct	98	46
mEag1	acg ctt ttg aga acg tgg at	ccg caca ac ttt cag aga act	62	66

*De la biblioteca universal Roche. mL32 y mEag1 se evaluaron en cerebro de ratón como gen constitutivo y problema, respectivamente.

5.10. Inducción de tumores y tratamiento a ratones atímicos

Los estudios en ratones fueron llevados de acuerdo a la norma oficial mexicana 062-ZOO-1999. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CINVA 31) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. En este estudio, se utilizaron ratones hembra atímicos BABLB/c nu/nu (de aproximadamente 6 semanas de edad). Los ratones se mantuvieron en cajas estériles ventiladas (34 cambios de aire por hora) recibiendo agua y alimento estériles *ad libitum*, con períodos controlados de luz-oscuridad de 12:12 horas. Con la finalidad de detectar cualquier posible dolor o malestar en los ratones sometidos al estudio, cada tercer día se midieron los parámetros conductuales y físicos para determinar el punto final del ratón en el experimento. Los tumores en los ratones se indujeron por inyección subcutánea de células tumorogénicas

IDC2 y T-47D (2.0×10^6 células en 0.2 ml de solución salina estéril) en la parte posterior de las patas de cada ratón. Cuando los tumores alcanzaron un tumor palpable (~3mm), se administró el tratamiento durante 3 semanas. Grupo C: calcitriol i.p. (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso/ dos veces por semana), Grupo A: astemizol p.o. (50 mg/kg de peso/día), Grupo C+A: calcitriol+astemizol, Grupo V: control. El tamaño tumoral (evaluado con vernier) y el peso corporal se midieron tres veces/semana a lo largo del tratamiento. El volumen tumoral (VT) se calculó usando la fórmula $(\text{largo} \times \text{ancho}^2)/2$. El volumen relativo tumoral (VRT) se calculó dividiendo el VT al final del tratamiento/el VT al inicio del tratamiento, lo cual indica el número de veces que creció el tumor con respecto a su tamaño inicial. Al término del tratamiento, se sacrificó al animal por anestesia con éter y punción cardíaca, la sangre se centrifugó a 3000 rpm/10 minutos para obtener el suero y determinar posteriormente la concentración de calcio. Además, se extrajo el tumor, el cual se dividió en dos partes, una parte se almacenó en trizol para evaluar la expresión génica de *Eag1* y *VDR* y la otra parte en formaldehído al 10% para determinar la expresión de *KI-67* por IHQ.

5.11. Determinación de *Eag1* en cerebro

Al final del estudio *in vivo*, los cerebros de los ratones se extrajeron y se almacenaron en trizol para evaluar el efecto del tratamiento sobre la expresión génica de *Eag1*. Para los estudios *in vitro*, cortes de cerebro de ratones (vírgenes a tratamiento) se incubaron con vehículo o calcitriol (0.1-1000 nM) por 24 horas, al cabo de este tiempo, el tejido se almacenó en trizol y se procesó para determinar el efecto del tratamiento sobre la expresión génica de *Eag1* cerebral.

5.12. Cuantificación sérica de calcio

Los niveles de calcio en suero se midieron en el equipo Synchron Clinical System CXS PRO (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA), mediante el método del ión selectivo, el cual determina la concentración de calcio total por potenciómetro indirecto, utilizando un electrodo selectivo al ión calcio en conjunto con un electrodo de referencia para sodio. En principio, el electrodo selectivo al ión calcio mide los iones de calcio libres en solución y el calcio total solo puede ser calculado del calcio libre, cuando la razón molar entre las concentraciones de calcio libre y total es constante.

Cuando el calcio iónico y el total son constantes, el equipo calcula el valor del calcio total al multiplicar el calcio iónico por un factor aproximado de 2.

5.13. Análisis estadístico

La diferencia significativa ($P < 0.05$) se determinó con los datos del promedio \pm desviación estándar (D.S.) mediante ANOVA de una vía seguido de Holm-Sidak utilizando el programa SigmaStat (Jandel Scientific).

6. RESULTADOS

Para la obtención de cultivos primarios, las biopsias de cáncer de mama se sembraron en cajas de 25 cm². Al cabo de unos días comenzaron a derivar a una población heterogénea de células tanto epiteliales como estromales y posteriormente se estableció el cultivo primario (Figura 8).

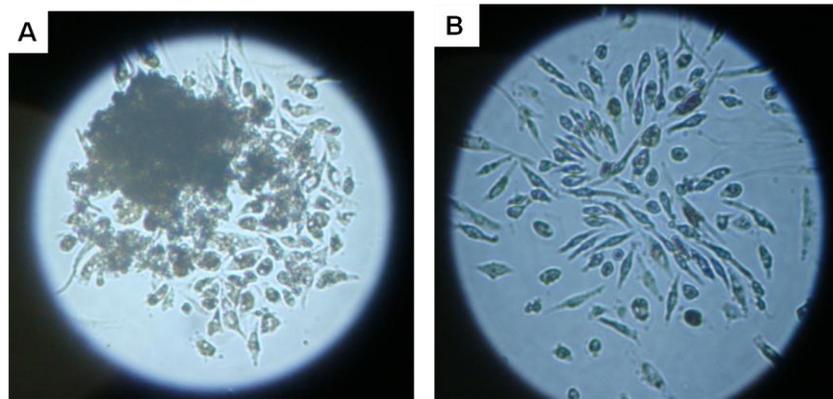


Figura 8: Cultivo primario. (A) Biopsia en cultivo derivando células. (B) Cultivo primario ya establecido.

6.1. Caracterización de los cultivos primarios y las líneas celulares utilizadas

Para este estudio, se utilizaron dos cultivos primarios (IDC1 e IDC2) y dos líneas celulares establecidas de cáncer de mama (SUM-229PE y T-47D), mismas que se caracterizaron por ICQ (Tabla 2, Figura 9). Los cultivos primarios provienen de tumores de pacientes vírgenes a tratamiento con diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal invasivo y no se cuenta con el grado histopronóstico.

De acuerdo al perfil de expresión de RE, RP, HER-2 neu y Ki-67, el cáncer de mama se clasifica molecularmente y se elige el tratamiento de la paciente (Sotiriou *et al.*, 2009; Nishimura *et al.*, 2011). Con base en lo anterior, las células utilizadas en este estudio, SUM-229PE, T-47D, IDC1 e IDC2 podrían representar los subtipos de cáncer de mama, HER-2 neu, luminal B, triple negativo y HER2-neu, respectivamente.

Tabla 2. Caracterización celular.

Línea celular/cultivo primario	RE α	RP	HER-2neu	Eag1	VDR
SUM-229PE	-	-	+	+	+
T-47D	+	+	-	+	+
IDC1	-	-	-	+	+
IDC2	-	-	+	+	+

En la tabla se muestra la expresión (+) o ausencia (-) del RE (receptor de estrógenos), RP (receptor de progesterona), receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2 neu), el canal de potasio éter à-go-go 1 (Eag1) y el receptor de la vitamina D (VDR) en las células utilizadas para este estudio (García-Quiroz *et. al.*, 2012).

Desafortunadamente, una limitante del tratamiento de cáncer de mama es que su efectividad depende de la presencia de receptores hormonales o receptores a factores de crecimiento, como se mencionó anteriormente, una proporción considerable de tumores de mama no expresan dichas proteínas por lo que se estudiaron otros blancos potenciales presentes en los tumores mamarios: VDR y Eag1, los cuales están presentes en las células utilizadas (Tabla 2 y Figura 9), corroborando así la viabilidad de su respuesta al calcitriol y al astemizol. Mediante estudios de RNAm, se determinó que la expresión génica basal de Eag1 en las células SUM-229PE, T-47D e IDC1 fue de $2.1E-4 \pm 3.7 E-5$, $2.07E-5 \pm 1.0E-5$ y $9.91E-4 \pm 1.97E-4$, respectivamente (n = 3). Conjuntamente se caracterizó el banco de líneas celulares de cáncer de mama con las que cuenta nuestro grupo de trabajo y todas mostraron expresión de VDR y Eag1.

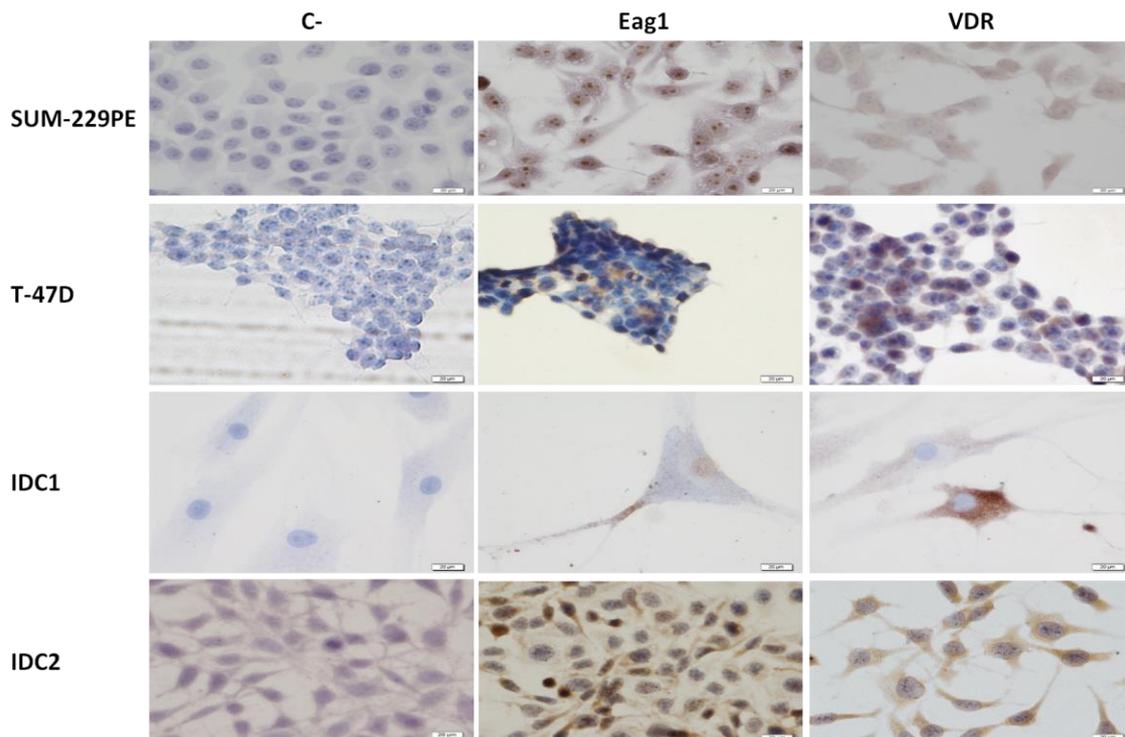


Figura 9: Inmunocitoquímica de Eag1 y VDR. (C-) células incubadas en ausencia del anticuerpo primario. (VDR) células incubadas en presencia del anticuerpo primario anti-VDR. (Eag1) células incubadas en presencia del anticuerpo primario anti-Eag1. El cultivo primario IDC1 es de gran tamaño.

Si bien ambas líneas celulares y cultivos primarios mostraron expresión de VDR, es necesario determinar su funcionalidad, la cual se evalúa directamente sobre la proliferación o mediante el análisis de la expresión génica de CYP24A1, ya que presenta en su promotor dos elementos de respuesta para la vitamina D, por lo que es un gen fuertemente regulado por el calcitriol y el aumento en su expresión indica la presencia funcional del VDR. En las líneas celulares y cultivo primario, el calcitriol (Figura 10, barras negras) incrementó significativamente la expresión de CYP24A1, lo cual indica que el VDR presente en las células es funcional (Figura 10). Para el cultivo primario IDC2 se evaluó directamente la funcionalidad del VDR al determinar el efecto del calcitriol sobre la proliferación celular. El cultivo primario IDC1 no mostró expresión basal de CYP24A1 y ésta solo incrementó bajo el tratamiento con calcitriol (Figura 10, IDC1).

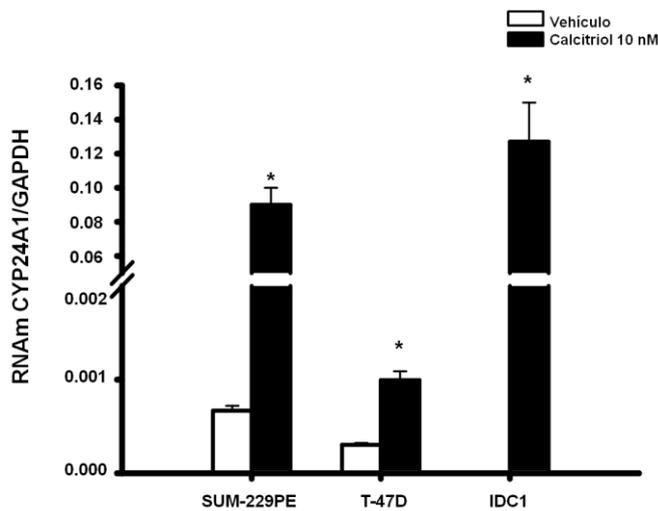


Figura 10. Determinación de la funcionalidad de VDR mediante la expresión de CYP24A1, en ambas líneas celulares (SUM-229PE y T-47D) y cultivo primario (IDC1). Los resultados se muestran como el promedio \pm D. S. de triplicados y representan al menos 3 diferentes experimentos. * $P < 0.05$ vs control.

Una vez determinada tanto la presencia de Eag1 y VDR, así como la funcionalidad de éste último, se evaluaron los efectos del calcitriol y/o del astemizol sobre la proliferación de los cultivos primarios y las líneas celulares utilizadas.

6.2. Efectos antiproliferativos del calcitriol y del astemizol

Los efectos antiproliferativos del calcitriol y del astemizol se determinaron en las células ya descritas, con la finalidad de caracterizar su capacidad para inhibir el crecimiento y definir las concentraciones inhibitorias (CI). Para ambos fármacos, se observó un efecto antiproliferativo significativo y dependiente de la concentración, en todas las líneas celulares. Los cultivos primarios resultaron altamente sensibles al calcitriol, mientras que T-47D mostró resistencia y solo respondió a concentraciones elevadas del mismo (0.1 nM – 10 μ M), razón por lo que se omitió de la gráfica. (Figura 11).

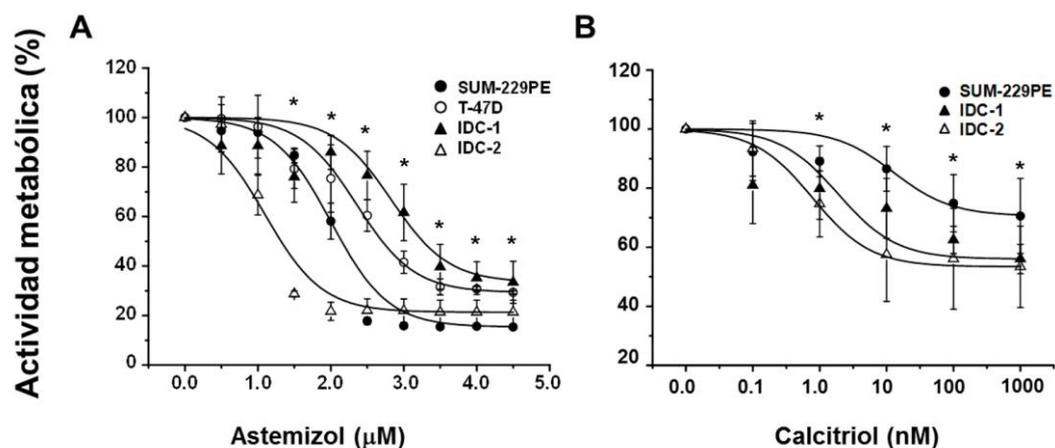


Figura 11. Efectos antiproliferativos del calcitriol y del astemizol en células de carcinoma mamario humano. Las células se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de astemizol (A) o calcitriol (B) durante 6 días. Los resultados se muestran como el promedio \pm D.S. de sextuplicados y representan al menos 3 diferentes experimentos. * indica diferencias significativas ($P < 0.001$) vs el control a partir de 1.5 μM para astemizol (a excepción del cultivo primario IDC2, en la cual hubo diferencia significativa a partir de 1 μM) y 1 nM para calcitriol, tanto en los cultivos primarios como en las líneas celulares (García-Quiroz *et. al.*, 2012).

Con base en los estudios de concentración-respuesta se calcularon los valores de CI_{20} y CI_{50} , mismos que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones inhibitorias (CI) del astemizol y del calcitriol en las líneas celulares y cultivos primarios.

Línea celular/cultivo primario	Astemizol (μM)		Calcitriol (nM)	
	CI ₂₀	CI ₅₀	CI ₂₀	CI ₅₀
SUM-229 PE	1.76	2.02	4.60	31.00
T-47D	1.30	2.70	858.0	2630.00
IDC1	2.60	3.01	0.57	8.00
IDC2	0.83	1.08	0.28	0.96
Media \pm D.S.	1.62 \pm 0.75	2.20 \pm 0.85	1.82 \pm 2.41 ^a	13.32 \pm 15.71 ^a

En la tabla se muestran los valores de CI₂₀ y CI₅₀ del calcitriol y del astemizol. Los valores promedio de calcitriol y astemizol se calcularon considerando todas las líneas celulares. ^a En el caso de calcitriol, los valores promedio se calcularon sin considerar a T-47D (García-Quiroz *et. al.*, 2012).

En los estudios de la combinación de fármacos es recomendable probar las concentraciones menores a la CI₅₀, para visualizar mejor el efecto, razón por la que se utilizó la CI₂₀ para evaluar el efecto de la combinación de ambos fármacos sobre la proliferación celular (Chou, 2006).

6.3. Efecto del tratamiento conjunto de calcitriol y astemizol sobre la proliferación celular

Los efectos en conjunto se expresaron como el porcentaje de la inhibición del crecimiento celular, con la finalidad de poder comparar fácilmente las diferencias. En la tabla 4 se muestran los efectos ejercidos por las CI₂₀ de ambos fármacos solos o en combinación en SUM-229PE, T-47D e IDC1. Como se observa, el porcentaje de inhibición de la proliferación cuando se coincubaban ambos fármacos fue mayor al 50% y significativamente diferente al efecto de cada fármaco por separado.

Tabla 4. Efectos inhibitorios del crecimiento celular (%) ejercidos por el astemizol y el calcitriol individualmente y en combinación (A + C), utilizando los valores de CI₂₀.

Línea celular	Astemizol (A)	Calcitriol (C)	A + C
SUM-229PE	13.55 ± 0.964	4.67 ± 4.34	53.27 ± 4.34*
T-47D	9.97 ± 2.15	7.67 ± 0.07	51.26 ± 8.52*
IDC1	41.9 ± 6.99	20.91 ± 2.77	65.63 ± 5.15*

Los resultados se muestran como el promedio ± D.S. de sextuplicados del porcentaje de inhibición de la proliferación y se llevaron acabo al menos 3 diferentes experimentos.

* $P < 0.05$ vs cada fármaco por separado (García-Quiroz *et. al.*, 2012).

Con la finalidad de explorar si el astemizol era capaz de potenciar al calcitriol utilizando este último aún en concentraciones menores de su CI₂₀, se decidió probarlo en combinación con una concentración fija de astemizol. Para probar este esquema, se eligieron las células SUM-229PE e IDC2 (Tabla 5).

Tabla 5. Efectos inhibitorios del crecimiento celular (%) ejercidos por el astemizol y el calcitriol individualmente y en combinación (A + C), utilizando valores inferiores a la CI₂₀.

Línea celular/Cultivo primario	Astemizol (A)	Calcitriol(C)	A + C
SUM-229PE	3.26 ± 0.273	1.94 ± 6.31	34.87 ± 4.43*
IDC2	49.60 ± 6.98	10.17 ± 0.396	59.09 ± 5.27*

Los resultados se muestran como el promedio ± D.S. de sextuplicados del porcentaje de inhibición de la proliferación y se llevaron acabo al menos 3 diferentes experimentos.* $P < 0.05$ vs cada fármaco por separado. Las concentraciones utilizadas fueron: Astemizol: 1 μM; Calcitriol: 0.1 nM y 0.01 nM para SUM-229PE e IDC2, respectivamente (García-Quiroz *et. al.*, 2012).

Como se observa en la tabla 5, el calcitriol o el astemizol por si solos disminuyeron ligeramente la proliferación de SUM-229PE cuando se usaron concentraciones inferiores a la CI_{20} , pero cuando se utilizaron concomitantemente se inhibió significativamente el crecimiento celular. Un efecto similar se obtuvo con IDC2 utilizando una concentración mucho menor de calcitriol (0.01 nM). Los resultados anteriores muestran que el efecto en conjunto de calcitriol y el astemizol para inhibir el crecimiento celular es mayor con respecto al efecto por separado de cada compuesto. Sin embargo, el definir matemáticamente el tipo de interacción farmacológica mediante el cálculo del IC, era necesario.

6.4. Cálculo del índice de combinación (IC)

El IC se calculó mediante el algoritmo de Chou-Talalay. Los valores del IC se calcularon con las CI_{20} de calcitriol y astemizol para cada línea celular y cultivo primario. Al aplicar el algoritmo, los resultados mostraron que el IC fue < 1 en todos los casos, lo cual indica que la interacción entre ambos fármacos fue de tipo sinérgica (Tabla 6).

Tabla 6. Valores del índice de combinación (IC).

Línea celular/Cultivo primario	IC	Efecto
SUM-229PE	0.676	Sinérgico
T-47D	0.784	Sinérgico
IDC1	0.693	Sinérgico
IDC2	0.964	Sinérgico

En la tabla se muestran los valores del índice de combinación (García-Quiroz *et. al.*, 2012)

Además de utilizar la inhibición de la proliferación como indicador de la actividad antineoplásica del tratamiento, también se decidió evaluar dos marcadores moleculares que pudieran ser usados en la clínica como factor pronóstico. Para ello, se estudiaron Ki-67 y Eag1, indicadores de proliferación y marcador tumoral, respectivamente.

6.5. Evaluación de los marcadores moleculares Ki-67 y Eag1 en respuesta al tratamiento

Para estos estudios se usaron IDC1 y SUM-229PE. El calcitriol y el astemizol inhibieron significativamente la expresión de Ki-67 y fue de manera dependiente de la concentración (Figura 12A–12D), lo cual correlaciona con los resultados obtenidos en la proliferación celular. El calcitriol inhibió la expresión de Eag1 en el cultivo primario y en SUM-229PE (Figura 12A y 12B). Una tendencia semejante fue observada con el astemizol sobre la expresión de Eag1 en IDC1, pero la significancia estadística se alcanzó solo a la concentración más alta (Figura 12C) y no tuvo efecto en SUM-229PE (datos no mostrados).

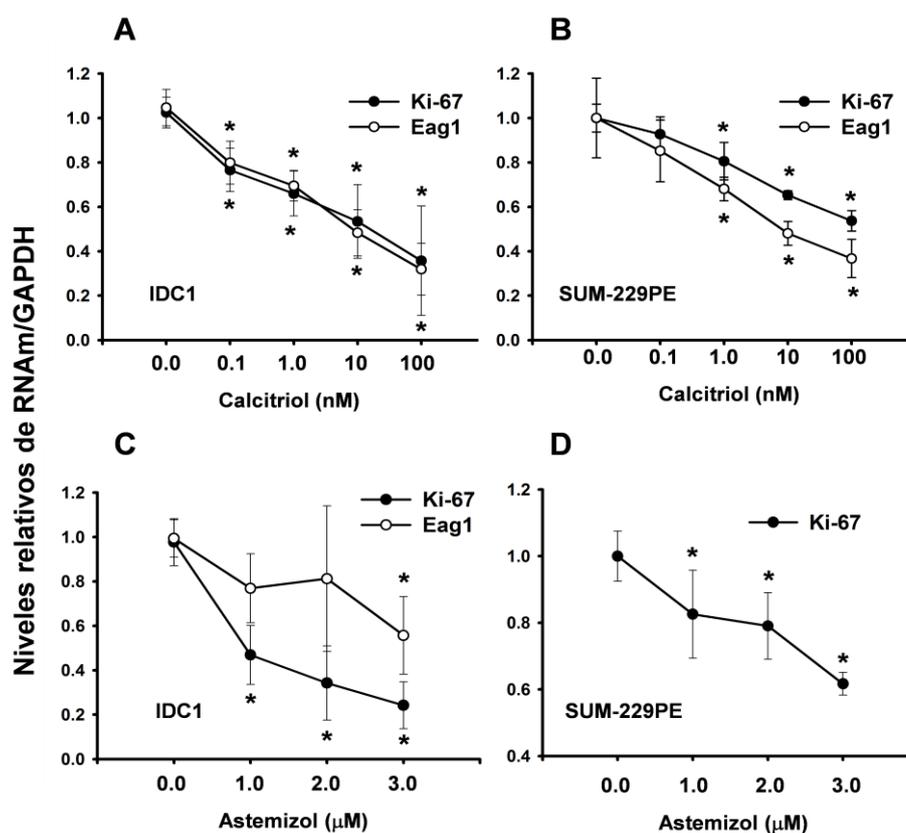


Figura 12. Ki-67 y Eag1 son inhibidos por el calcitriol y el astemizol en las células de carcinoma mamario humano. La expresión génica de Ki-67 (círculos negros) y de Eag1 (círculos blancos) fue inhibida por el calcitriol (A-B) y el astemizol (C-D) en IDC1 (A, C) y SUM-229PE (B, D). Los resultados se muestran como el promedio \pm D.S. de triplicados y representan al menos 3 diferentes experimentos. $*P < 0.05$ vs control (García-Quiroz *et. al.*, 2012).

Considerando los efectos sinérgicos de los compuestos a bajas concentraciones sobre la proliferación celular, se decidió investigar si este fenómeno se reflejaba también a nivel de los marcadores moleculares Eag1 y Ki-67. Para ello, se probaron dos concentraciones de calcitriol menores a su CI_{20} (0.1 y 1.0 nM para IDC1 y SUM-229PE, respectivamente) en combinación con la CI_{50} del astemizol. El calcitriol y el astemizol disminuyeron ligeramente la expresión de Ki-67 y Eag1, pero su coincubación redujo significativamente y en mayor medida la expresión del RNAm de ambos genes en IDC1 (Figura 13A y 13B). Resultados similares se obtuvieron para Ki-67 en SUM-229PE (Figura 13C). No se observó regulación de Eag1 por el astemizol solo o en combinación en la línea SUM-229PE.

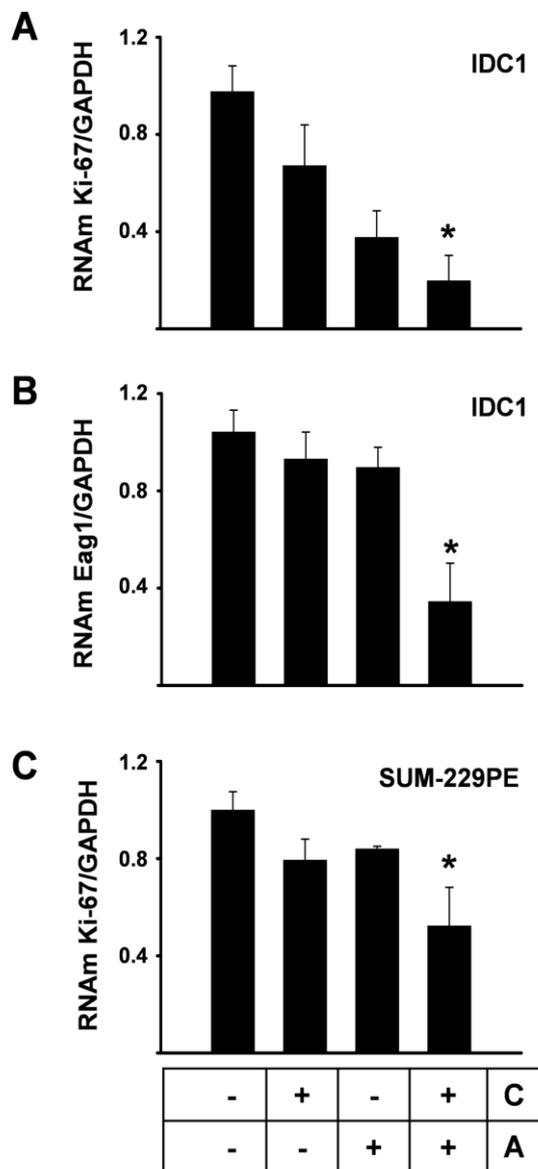


Figura 13. Disminución sinérgica de la expresión del RNAm de Ki-67 y Eag1 por la coincubación de bajas concentraciones del calcitriol en conjunto con el astemizol. Dos diferentes concentraciones de calcitriol (C, en el recuadro, 0.1 nM y 1.0 nM para IDC1 y SUM-229PE, respectivamente) se usaron en conjunto con la correspondiente CI_{50} del astemizol (A, en el recuadro). Los resultados para Ki-67 y Eag1 en IDC1 se muestran en los paneles A y B, respectivamente. Ki-67 en SUM-229PE se muestra en el panel C. Los resultados se muestran como el promedio \pm D. S. de triplicados y representan al menos 3 diferentes experimentos. * $P < 0.05$ vs control y vs cada compuesto por separado (García-Quiroz *et. al.*, 2012).

Con la finalidad de corroborar los resultados de los tratamientos a nivel de RNAm sobre Ki-67, se estudió también su expresión a nivel de proteína mediante ICQ. Lo anterior, considerando que este marcador se utiliza ampliamente en la clínica tanto para diagnóstico histopatológico como para evaluar la respuesta a un tratamiento. Los resultados mostraron que la abundancia de Ki-67 en las células disminuyó ligeramente con el calcitriol y el astemizol, mientras que al coincubar ambos fármacos, el porcentaje de positividad disminuyó en mayor medida (marca nuclear marrón en las fotografías mostradas en la Figura 14). Interesantemente, el astemizol también disminuyó el tamaño celular, lo cual es un indicador de apoptosis (Bortner *et. al.*, 1997; Bortner and Cidlowski, 1999) y abona a las propiedades antineoplásicas de este antihistamínico. Resultados similares se obtuvieron en IDC2 y T-47D (microfotografías no mostradas). Los resultados obtenidos en IDC2, SUM-229PE y T-47D se muestran en las gráficas. En todos los casos, cuando las células se coincubaron con el calcitriol y el astemizol, el porcentaje de células negativas a Ki-67 fue mayor comparado con las células positivas (Gráficas mostradas en la Figura 14).

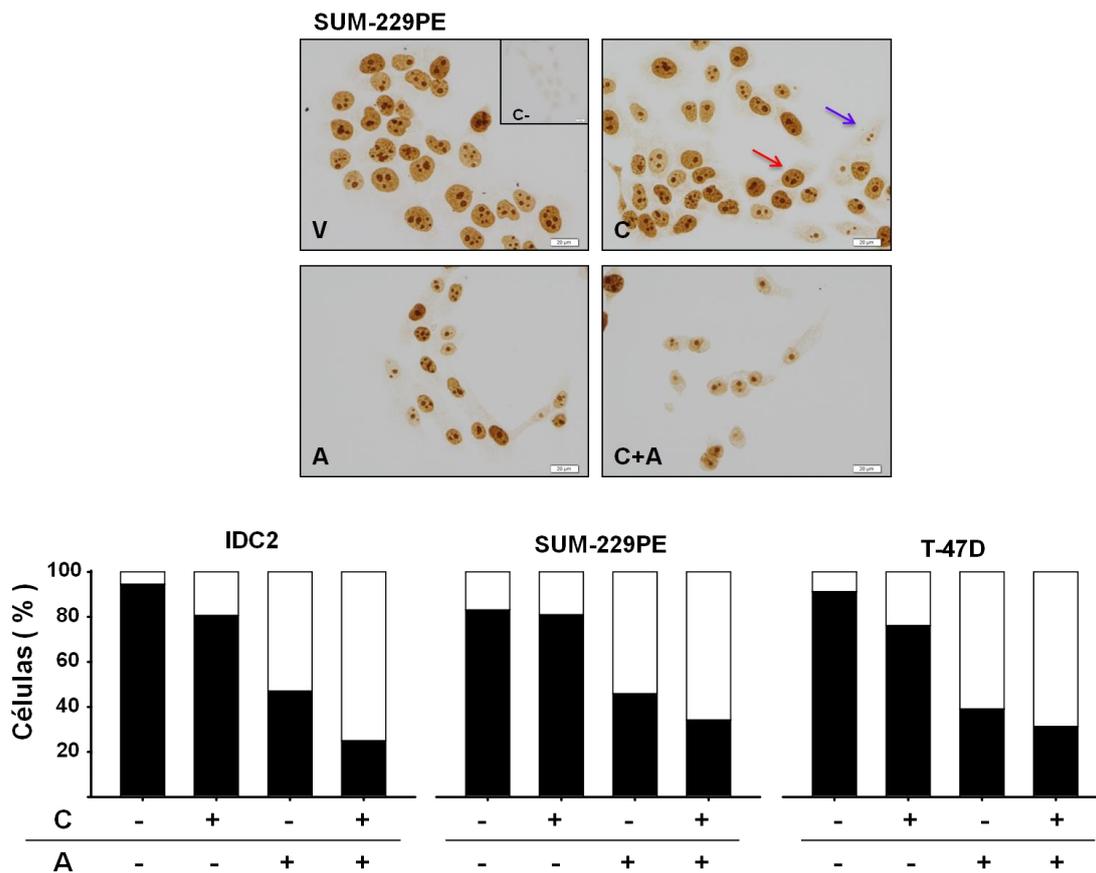


Figura 14. Inmunocitoquímica de Ki-67 en células de cáncer de mama. Las células SUM-229PE se incubaron en presencia de los compuestos (CI₂₀) por 48 horas. (C-) células incubadas en ausencia del anticuerpo primario. (V) células tratadas con vehículo, (A) astemizol, (C) calcitriol, o (C + A) ambos compuestos. Las flechas morada y roja indican células negativas y positivas para Ki-67, respectivamente. En las gráficas, células positivas a Ki-67 (fracción negra) y células negativas a Ki-67 (fracción blanca). En el recuadro, C=calcitriol, A=astemizol. No se realizó contratincción con hematoxilina (García-Quiroz *et. al.*, 2012).

Como se mencionó anteriormente, el astemizol synergizó los efectos antiproliferativos del calcitriol, pero no se conocen los mecanismos moleculares implicados en este synergismo, es por ello que se decidió evaluar el efecto del astemizol sobre la expresión de CYP24A1, basados en el antecedente de que el astemizol inhibe la expresión de la enzima que lo degrada, la CYP3A4.

6.6. Regulación de la expresión de CYP24A1 por el astemizol.

Para evaluar la regulación de la expresión de CYP24A1 por el astemizol, se eligió la línea celular SUM-229PE, debido a su alta expresión basal del citocromo (Figura 10). El astemizol disminuyó significativamente la expresión de CYP24A1 a nivel de RNAm (Figura 15A). De acuerdo a lo esperado, el calcitriol incrementó el CYP24A1 en todos los cultivos primarios y las líneas celulares, ya que el calcitriol regula su propia biodisponibilidad (datos no mostrados); sin embargo, y de manera muy interesante, el astemizol redujo significativamente la inducción de CYP24A1 dependiente de calcitriol en SUM-229PE (Figura 15B). De manera similar, en IDC1 el astemizol también redujo la inducción de CYP24A1 dependiente del calcitriol, pero este efecto se evidenció a concentraciones mayores del fármaco (1 y 10 nM, Figura 15C). Considerando que el CYP24A1 es el citocromo encargado de degradar al calcitriol, estos resultados sugieren que el astemizol puede impactar directamente sobre la biodisponibilidad del calcitriol permitiendo que éste se encuentre más tiempo en el medio para seguir ejerciendo sus efectos antineoplásicos.

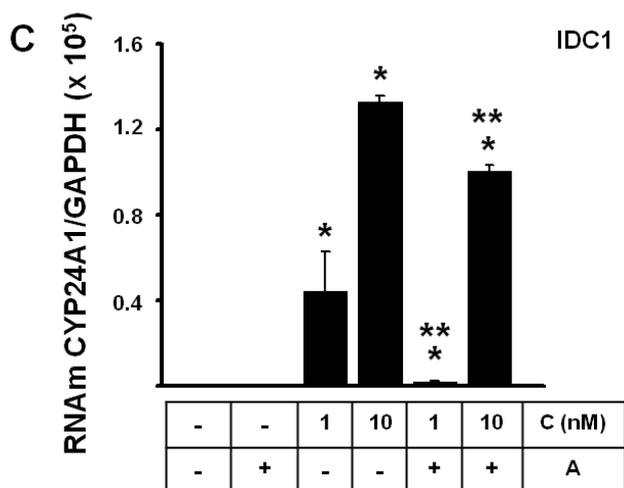
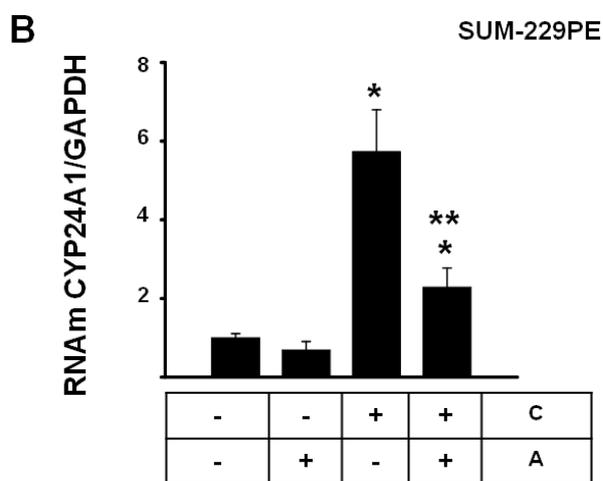
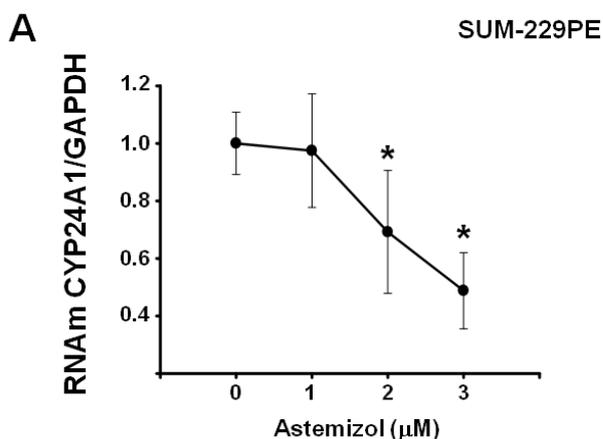


Figura 15. El astemizol regula la expresión de CYP24A1 en células de carcinoma mamario humano.

Las células fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones de astemizol (A) o con ambos fármacos solos o en combinación (B, C). En B y C el astemizol se usó a su correspondiente CI_{50} para cada línea celular. En B el calcitriol se usó a la concentración de 0.1 nM. Los resultados se normalizaron vs la expresión de GAPDH. Los vehículos se llevaron arbitrariamente a 1. Los resultados se muestran como el promedio \pm D. S. de experimentos realizados en triplicado y representan al menos 3 diferentes experimentos. * $P < 0.05$ vs control, ** $P < 0.05$ vs cada compuesto por separado. En el recuadro bajo las gráficas: C = calcitriol, A = astemizol (García-Quiroz *et. al.*, 2012).

6.7. Regulación de la expresión de VDR por el astemizol

Con la finalidad de dilucidar si el astemizol también modifica la bioactividad del calcitriol, se estudió su efecto sobre la expresión del VDR. Los resultados mostraron que el astemizol por si solo estimuló la expresión génica del VDR en las dos líneas celulares estudiadas (1.92 ± 0.32 y 2.28 ± 1.08 veces sobre el control para SUM-229PE e IDC1, respectivamente, $n = 3$ y 5 , respectivamente, $P < 0.05$). Estos resultados fueron corroborados a nivel de proteína con experimentos de Western Blot (Figura 16A y 16C). En SUM-229PE, se detectó una proteína inmunoreactiva de ~ 75 KDa en las células tratadas con vehículo, mientras que el tratamiento con astemizol o calcitriol incrementó su expresión. Interesantemente, la coincubación de las células con ambos fármacos incrementó en mayor medida la expresión de dicho receptor (Fig. 16A y 16B), como se observó después de la normalización *versus* la densidad óptica (D. O.) de GAPDH. Resultados similares se obtuvieron en T-47D, a diferencia de que el calcitriol *per se* no indujo la expresión del VDR en esta línea celular (Figura 16C y 16D). Sin embargo, el tratamiento con astemizol solo o en combinación con calcitriol indujo considerablemente la expresión del VDR (~ 75 KDa y ~ 50 KDa, Figura 16C y 16D).

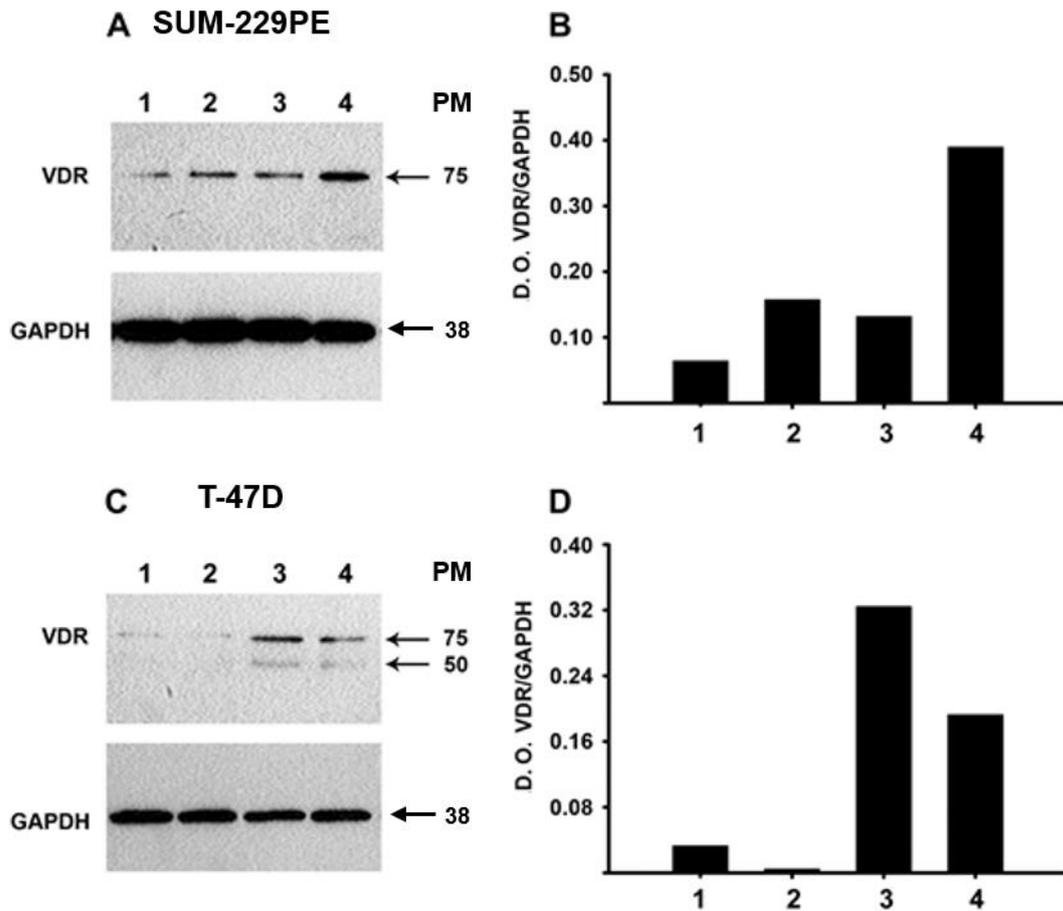


Figura 16. El VDR es regulado por el astemizol a nivel de proteína. Análisis del VDR por WB en la línea SUM-229PE (A y B) y T-47D (C y D). En el panel A las células fueron incubadas en presencia de vehículo (1), calcitriol (2, CI_{20}), astemizol (3, CI_{20}) o la combinación de calcitriol + astemizol (4) durante 48 h (García-Quiroz *et. al.*, 2012).

Además de la alta expresión de CYP24A1 en T-47D, la baja expresión del VDR y el no observar efecto del calcitriol sobre la propia expresión de su receptor puede explicar la resistencia de esta línea celular al calcitriol. Interesantemente, al coincubar el calcitriol y el astemizol, el efecto sobre la proliferación se sinergiza, lo cual podría explicarse por el aumento en la expresión del VDR y con el consecuente incremento en la bioactividad del calcitriol. De esta manera, las células con baja expresión de VDR (como T-47D) pueden ser sensibilizadas al calcitriol al coincubarlas con el astemizol.

A manera de resumen, se puede decir que el astemizol incrementó los efectos antineoplásicos del calcitriol. La explicación mecanística de lo observado incluye la

inhibición de la expresión de Eag1 a nivel del RNAm y proteína por parte del calcitriol, lo cual conlleva a la inhibición de la proliferación. Por otra parte, el astemizol bloquea la actividad de Eag1 a la vez que sinergiza la actividad antiproliferativa del calcitriol mediante la inhibición de CYP24A1 y la estimulación del VDR, evitando así su degradación e incrementando su bioactividad.

Con base en los resultados *in vitro*, se decidió evaluar los efectos del calcitriol y del astemizol *in vivo* sobre el crecimiento tumoral en ratones xenoinjertados con IDC2 y T-47D, ya que son células altamente tumorogénicas.

6.8. La coadministración de calcitriol y astemizol inhibe en mayor medida el crecimiento tumoral *in vivo* en comparación al efecto de cada compuesto por separado

El astemizol y el calcitriol por si solos inhibieron significativamente el crecimiento tumoral de IDC2 y T-47D en comparación al vehículo; no obstante, al coadministrar ambos fármacos el efecto fue mayor (Figura 17).

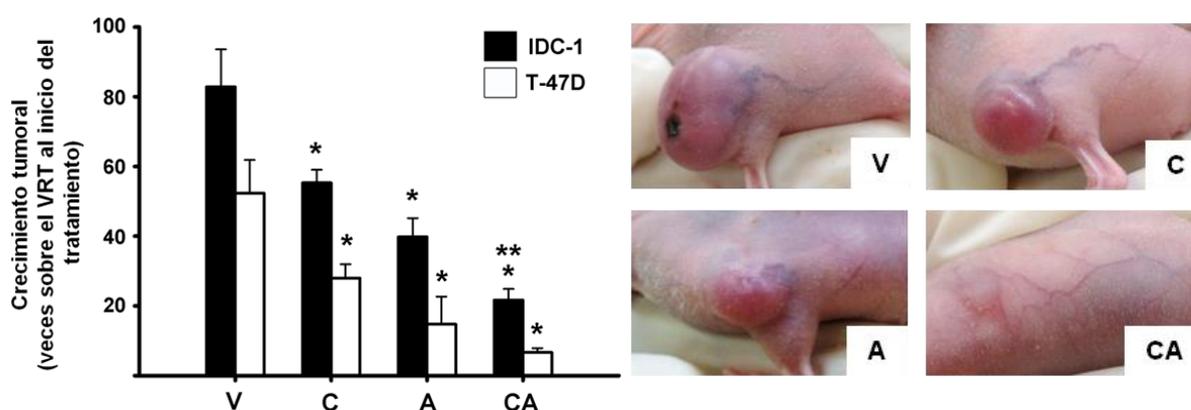


Figura 17. Inhibición del crecimiento tumoral mediado por la coadministración del calcitriol y del astemizol comparado con la inhibición inducida por cada compuesto por separado. En la gráfica se muestra el efecto de vehículo (V), calcitriol (C) astemizol (A) y calcitriol-astemizol (CA) sobre el volumen relativo tumoral (VRT) de IDC2 (barras negras) y T-47D (barras blancas). Los resultados se expresan como el promedio \pm E.S (n=15 por cada tratamiento en T-47D; n=15 para V, C y A en IDC2 y n=23 para CA en IDC2). * $P < 0.05$ vs control, ** $P < 0.05$ vs cada compuesto por separado. La estadística se realizó para cada tumor. Las fotografías son representativas del volumen tumoral de IDC2 en los ratones al final de cada tratamiento.

6.9. La coadministración del calcitriol y del astemizol inhibe en mayor medida la expresión de Ki-67 *in vivo* en comparación con el efecto de cada compuesto por separado

Se determinó la expresión del marcador de proliferación Ki-67 para evaluar la respuesta del tumor al tratamiento. Los resultados mostraron que la abundancia de Ki-67 disminuyó con el calcitriol y el astemizol, mientras que en el tumor de los ratones tratados con ambos fármacos, el porcentaje de positividad disminuyó en mayor medida (Figura 18).

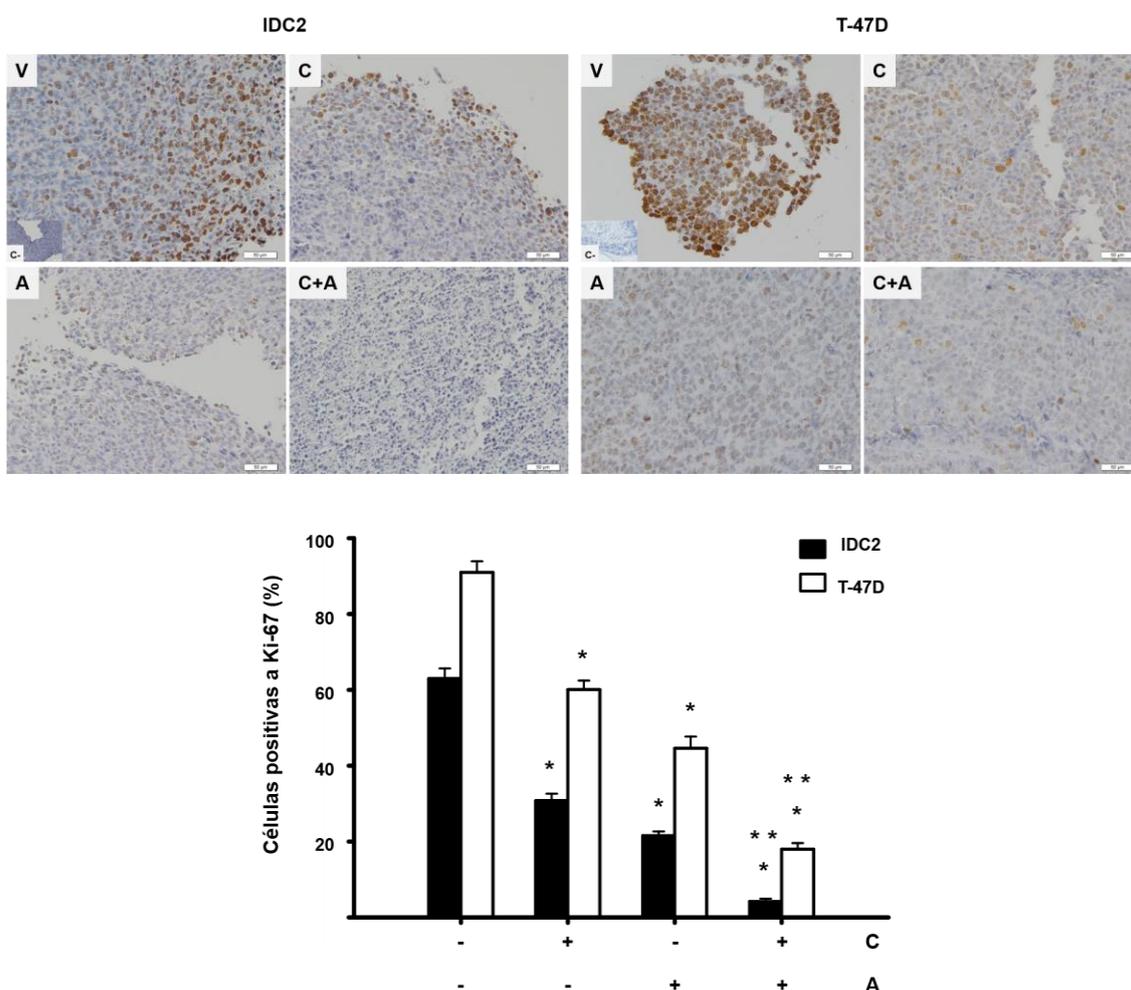


Figura 18. Efectos de calcitriol y/o astemizol en la expresión de Ki-67 tumoral. Microfotografías representativas de Ki-67 (marca café) en tumores de IDC2 y T-47D de ratones tratados con vehículo (V), calcitriol (C), astemizol (A) o ambos compuestos (C+A). El control negativo (C-) se incubó en ausencia del primer anticuerpo. En la gráfica se muestra el porcentaje \pm D. S. de células positivas a KI-67 en ambos tumores. * $P < 0.05$ vs control, ** $P < 0.05$ vs cada compuesto por separado (n=3).

Interesantemente, al monitorizar el peso corporal de los ratones durante el tratamiento, no se observaron cambios en este parámetro (datos no mostrados), lo cual sugiere baja toxicidad del tratamiento.

Con la finalidad de corroborar lo observado *in vitro*, en el tejido tumoral se analizó la expresión de Eag1 y VDR. En IDC2, el calcitriol por si solo inhibió la expresión de Eag1 con diferencia significativa en comparación al vehículo, lo cual no se observó en T-47D. Al coadministrar ambos compuestos, la inhibición de la expresión de Eag1 fue mayor y significativamente diferente (Figura 19A). Al igual que *in vitro*, el calcitriol por si solo estimuló la expresión de VDR y al coadministrar ambos compuestos, la expresión de esta proteína en ambos tejidos tumorales (IDC2 y T-47D) fue mayor y significativamente diferente con respecto a cada tratamiento por separado (Figura 19B).

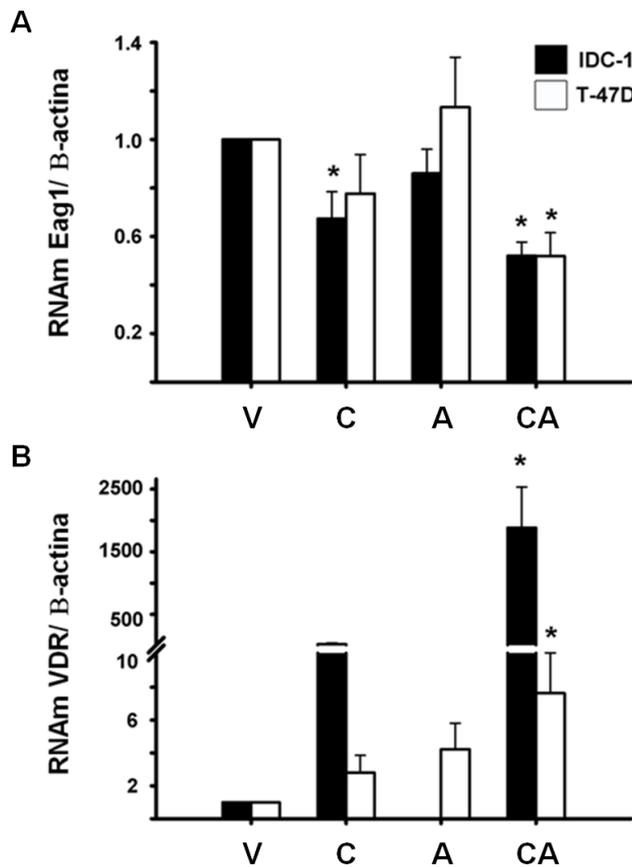


Figura 19. El cotratamiento con calcitriol y astemizol inhibe la expresión de Eag1 e incrementa el VDR tumoral. (Panel A) Efecto del calcitriol (C), astemizol (A) o ambos compuestos sobre la expresión de Eag1 tumoral en IDC2 (barras negras) ó T-47D (barras blancas). Promedio \pm E.S ($n \geq 15$). **(Panel B)** Efecto de calcitriol (C), astemizol (A) o ambos compuestos sobre la expresión de VDR tumoral en IDC2 (barras negras) ó T-47D (barras blancas). Promedio \pm E.S ($n \geq 7$). * $P < 0.05$ vs control, ** $P < 0.05$ vs cada compuesto por separado. La estadística se realizó con respecto a cada tumor.

El calcitriol *per se* disminuyó la expresión de Eag1 tumoral en IDC2 mas no en T-47D, lo cual correlaciona con lo observado *in vitro*. Al coadministrar calcitriol y

astemizol, el estímulo sobre la expresión de VDR tumoral fue mayor y significativamente diferente en comparación al efecto de cada compuesto por separado.

6.10. Efecto del tratamiento sobre la expresión de Eag1 a nivel cerebral

Debido al efecto que pudiera tener el calcitriol solo o en conjunto con el astemizol para el tratamiento del cáncer de mama, sobre la expresión de Eag1 en el cerebro, se decidió investigar si al igual que en el tejido tumoral, el calcitriol también disminuye la expresión del canal a nivel neurológico. Si bien el astemizol no atraviesa la barrera hematoencefálica, éste sinergiza los efectos antineoplásicos del calcitriol, por lo que fue de suma importancia evaluar su efecto sobre la expresión de Eag1 cerebral. La disminución en la expresión de Eag1 cerebral se relaciona con desórdenes neurológicos como esquizofrenia y depresión en humanos, mientras que el ratón mutante nulo de Eag1 únicamente mostró hiperactividad (Ufartes *et. al.*, 2013). A la dosis utilizada del calcitriol solo o en combinación con el astemizol no se observó efecto sobre la expresión de Eag1 en el cerebro (Figura 20A), lo cual indica la seguridad del fármaco a nivel de este tejido, ya que es donde se expresa mayormente el canal. Además, se evaluó *in vitro* el efecto del calcitriol sobre la expresión de Eag1 en los cortes del cerebro y se observó una disminución significativa solo a la concentración de 1000 nM de calcitriol (Figura 20B).

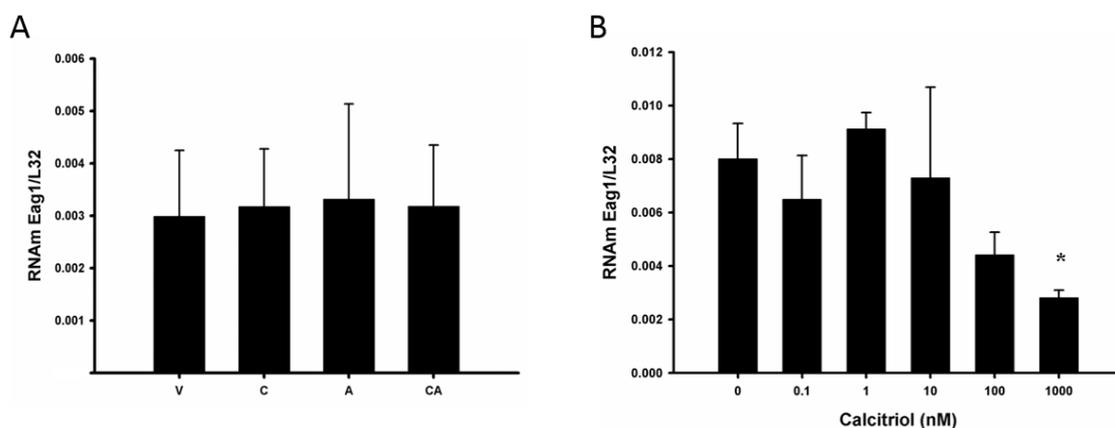


Figura 20: Efecto del tratamiento antineoplásico sobre la expresión de Eag1 a nivel de cerebro. A. Efecto *in vivo* del calcitriol solo o en conjunto con el astemizol sobre la expresión de Eag1 cerebral. Los resultados se muestran como el promedio \pm E. S. (n = 5). V = vehículo, C = calcitriol, CA = calcitriol + astemizol. B. Efecto *in vitro* del calcitriol sobre la expresión de Eag1 en cortes de cerebro. Los resultados se muestran como el promedio \pm D. S. (n = 3). * $P < 0.05$.

6.11. Efecto del tratamiento antineoplásico sobre los niveles de calcio

Dentro de los efectos secundarios del calcitriol se encuentra la hipercalcemia, misma que es eliminada con esquemas de dosificación intermitente (Beer *et. al.*, 2001). En este estudio se evaluaron los niveles del calcio total (libre y unido a proteínas) en el suero de los ratones tratados con vehículo, calcitriol, astemizol o ambos fármacos. No se observaron cambios significativos en los niveles de calcio en suero con los distintos tratamientos (Tabla 7). Los niveles reportados de calcio en suero de ratones atímicos sin tratamiento es de aproximadamente 9.5 mg/dl (Swami *et. al.*, 2011).

Tabla 7: Niveles de calcio en suero de ratones tratados.

Tratamiento	Valores de calcio total en suero (mg/dl)
Vehículo	9.8±0.2
Calcitriol	9.4±0.7
Astemizol	10.0 ±0.2
Calcitriol + Astemizol	10.7 ±0.6

En la tabla se muestra el promedio ± D.S (n=3).

7. DISCUSIÓN

A la fecha, hay fuerte evidencia preclínica y clínica para usar al VDR como blanco para la terapia del cáncer, ya que el calcitriol ha mostrado efectos antineoplásicos tanto *in vitro* como *in vivo* (Deeb *et. al.*, 2007; Muindi *et. al.*, 2002; Ma *et. al.*, 2010). El inconveniente inicial se relacionaba con la limitación en el incremento de la dosis debido a la hipercalcemia secundaria; sin embargo, Beer y colaboradores en el 2002, mostraron que la dosificación intermitente del calcitriol permite substancialmente escalar la dosis sin toxicidad limitante; es decir, sin efectos secundarios de hipercalcemia (Beer *et. al.*, 2001; Muindi *et. al.*, 2002). Además, la combinación del calcitriol con agentes citotóxicos, radiación, tamoxifeno, glucocorticoides y ketoconazol, potencia sus efectos antineoplásicos permitiendo disminuir la dosis y con ello, los posibles efectos adversos (Deeb *et. al.*, 2007; Yu *et. al.*, 2010; Ma *et. al.*, 2010; Ma *et. al.*, 2010). La terapia de calcitriol parece ser prometedora para el cáncer de mama ya que estos tumores expresan al VDR (Berger *et. al.*, 1999; García-Becerra *et. al.*, 2010). Adicionalmente, uno de los posibles mecanismos antineoplásicos del calcitriol radica en la disminución del canal oncogénico Eag1 (García-Becerra *et. al.*, 2010; Avila *et. al.*, 2010). García-Becerra y colaboradores demostraron en el 2010 que el calcitriol disminuyó la expresión de Eag1 y que este efecto fue mediado por el VDR, ya que la coincubación del calcitriol con el TEI-9647 (antagonista del VDR), no afectó la expresión del canal. Eag1 se encuentra altamente expresado en las células del cáncer de mama y tejido canceroso (García-Becerra *et. al.*, 2010), por lo que la inhibición de su expresión o actividad proporciona una excelente terapia dirigida para los pacientes con cáncer. A este respecto, el calcitriol inhibe la expresión de Eag1 (García-Becerra *et. al.*, 2010; Avila *et. al.*, 2010), mientras que el astemizol bloquea su actividad (García-Ferreiro *et. al.*, 2004). Por lo tanto, los tumores que expresen VDR y Eag1 podrían responder al calcitriol y al astemizol en una manera similar a lo observado en este estudio.

En el presente trabajo, tanto las líneas celulares establecidas como los cultivos primarios mostraron expresión de VDR y Eag1 independiente del estatus de receptores hormonales o receptores a factores de crecimiento (Tabla 2). Tanto el calcitriol como el astemizol por si solos inhibieron la proliferación celular, siendo la sensibilidad a estos fármacos diferente en cada una de las líneas celulares utilizadas (Figura 11).

En particular, la línea celular T-47D mostró cierta resistencia al efecto antiproliferativo del calcitriol (Tabla 3, CI_{20} y CI_{50} de calcitriol), que pudo deberse a la baja expresión del VDR (Figura 16 C y D, número 2) y a la alta expresión basal de CYP24A1 (Figura 10), lo que disminuye tanto la bioactividad como la biodisponibilidad del calcitriol y con ello sus efectos antineoplásicos. Si bien, la línea celular SUM-229PE, muestra mayor expresión basal de CYP24A1 con respecto a T-47D (Figura 10), la expresión de VDR en SUM-229PE es elevada (Figura 16 A y B, número 2), por lo que probablemente es más sensible al calcitriol (Tabla 3, CI_{20} y CI_{50} de calcitriol). Los valores promedio de CI_{20} y CI_{50} de astemizol y calcitriol (sin considerar T-47D) fueron menores a las concentraciones tóxicas en suero reportadas para cada compuesto (Shulz *et. al.*, 2003). Los niveles fisiológicos del calcitriol se encuentran dentro del intervalo de 0.05 a 0.16 nM; no obstante, datos preclínicos indican que la inhibición significativa del crecimiento requiere concentraciones mayores de 1 nM de calcitriol, como se muestra en la Tabla 8 (García-Becerra *et. al.*, 2010). Por otra parte, los estudios clínicos han demostrado que bajo un esquema de dosificación semanal, el calcitriol puede alcanzar niveles sanguíneos de 3 a 16 nM con ligera toxicidad (Beer *et. al.*, 2001; Beer *et. al.*, 2003; Fakih *et. al.*, 2007). En este estudio, el efecto sinérgico entre el calcitriol y el astemizol se observó a concentraciones clínicamente alcanzables del calcitriol, de aproximadamente 1.82 nM (0.75 ng/ml) que es considerablemente menor a 16 nM (6.68 ng/ml), concentración alcanzada en el suero de pacientes tratados con calcitriol intravenoso para el tratamiento del cáncer (Fakih *et. al.*, 2007). Interesantemente, el efecto sinérgico entre el calcitriol y el astemizol, también se observó a concentraciones de calcitriol menores a su CI_{20} (0.1 y 0.01 nM). Tanto 0.1 como 0.01 nM se encuentran dentro del intervalo fisiológico del calcitriol (Tabla 8), lo que indica que el astemizol podría ser usado concomitantemente con suplemento de vitamina D (como precursor del calcitriol endógeno).

Tabla 8. Concentraciones fisiológicas y farmacológicas de calcitriol.

Concentraciones de calcitriol	nM	Efecto
Fisiológicas	0.05-0.16	Mantiene la homeostasis del calcio y del fósforo. Promueve la salud del sistema inmunológico y previene el cáncer
Farmacológicas	➤ 1.0	Efectos antineoplásicos <i>in vitro</i>
Alcanzadas en el suero de los pacientes con cáncer tratados con calcitriol intravenoso	3-16	Actividad antitumoral <i>in vivo</i>
CI₂₀ promedio en este estudio	~1.82	Inhibición de la proliferación del 4 al 20% dependiendo de la línea celular
CI₂₀ en combinación con la CI₂₀ de astemizol	~1.82	Inhibición de la proliferación del 51 al 65% dependiendo de la línea celular
Concentraciones fisiológicas en combinación con astemizol (1 μM)	0.1 y 0.001	Inhibición de la proliferación del 34 al 59%

Los datos anteriores son muy relevantes ya que sugieren que la eficiencia de la combinación del calcitriol y del astemizol para inhibir el crecimiento celular permitiría utilizarlos en concentraciones muy bajas en pacientes, sin sacrificar el efecto terapéutico y disminuir la probabilidad de efectos secundarios, lo cual es deseable en el ámbito clínico. En el caso de astemizol, la dosis terapéutica como antihistamínico es de 10 mg/día, con la que se alcanzan niveles máximos en suero de 0.10 μM (0.05 μg/ml)

(García-Quiroz and Camacho, 2011). Los niveles tóxicos en suero reportados para el astemizol son de 14 $\mu\text{g/ml}$ (30.5 μM) (Shulz *et. al.*, 2003); empero, las concentraciones de astemizol como agente antineoplásico usadas en este estudio son menores a las concentraciones tóxicas (Tabla 9).

Tabla 9. Concentraciones terapéuticas y tóxicas de astemizol.

Concentraciones de Astemizol	μM
Terapéuticas como antihistamínico (10 mg/día)	Se alcanzan niveles máximos en suero de 0.10 μM (0.05 $\mu\text{g/ml}$)
Tóxicas en suero	30.5 μM (14 $\mu\text{g/ml}$)
CI₂₀ promedio en este estudio	1.62 μM (0.8 $\mu\text{g/ml}$), con esta concentración se inhibe el crecimiento celular de 10-42%

La concentración necesaria de astemizol para inhibir significativamente la proliferación celular (1.62 μM) está por debajo de las concentraciones tóxicas en suero (30.5 μM). La dosis necesaria de astemizol para alcanzar 1.62 μM en suero es de 162 mg, considerando que con 10 mg se alcanzan niveles máximos en suero de 0.10 μM , mientras que la dosis tóxica es de 200 mg.

El tratamiento concomitante del calcitriol y del astemizol, disminuyó sinérgicamente la proliferación celular (Tabla 6) independientemente de su firma molecular (Tabla 2). Este efecto también se observó en T-47D. Nuestros resultados indican que el astemizol fue capaz de sinergizar los efectos antiproliferativos del calcitriol al inhibir la expresión de CYP24A1. Esta observación es de relevancia clínica, ya que la coadministración de calcitriol y compuestos que inactiven la CYP24A1 puede resultar en el incremento significativo de las concentraciones plasmáticas de calcitriol

(Muindi *et. al.*, 2010), con consecuentes beneficios terapéuticos en los pacientes con cáncer, como ha sido previamente descrito con ketoconazol (Peehl *et. al.*, 2001).

El astemizol también impactó sobre la bioactividad del calcitriol al incrementar la expresión del VDR. En la línea celular SUM-229PE, la incubación en presencia de calcitriol o astemizol estimuló la expresión de VDR, mientras que la coadministración de ambos fármacos indujo la expresión en mayor medida (Figura 16). La regulación de la abundancia del VDR es importante para modular la respuesta del calcitriol en las células blanco, pero el mecanismo por el cual los niveles de VDR son regulados no está del todo claro. Por una parte, la estabilización del VDR inducida por la unión del ligando (calcitriol) es el principal mecanismo por el cual los niveles de VDR son regulados (Costa *et. al.*, 1987; Wiese *et. al.*, 1992); sin embargo, un aumento en la transcripción puede también participar (Costa *et. al.*, 1987; Yin *et. al.*, 2009). Nuestros resultados en SUM-229PE sugieren que el calcitriol podría estar prolongando el tiempo de vida media del VDR, mientras que el astemizol puede activar las vías de señalización que inducen su transcripción. La suma de ambos mecanismos podría explicar el mayor incremento en la expresión del VDR con la coincubación del calcitriol y del astemizol. En T-47D, el calcitriol por sí solo no indujo la expresión de VDR (Figura 16 C y D, número 2), lo cual, aunado a la baja expresión de éste (Figura 16 C y D, número 1; Figura 9) y alta expresión basal de CYP24A1 (Figura 10), podría ser la razón por la que T-47D fue ligeramente resistente a la actividad antiproliferativa del calcitriol (Tabla 3). No obstante, el tratamiento de T-47D con astemizol solo o en combinación con calcitriol indujo dos especies de VDR (Figura 16), las cuales explican porque esta línea celular llega a ser sensible al cotratamiento (Tabla 4). En cuanto a las dos especies de VDR, la de 50 kDa corresponde al VDR clásico; sin embargo, estudios previos han mostrado que algunos de los efectos del calcitriol pueden ser mediados por la proteína de alto peso molecular (~75 kDa) que comparte reactividad inmunológica con la especie de 50 kDa (Díaz *et. al.*, 2011; Yu *et. al.*, 1991). Adicionalmente, otros investigadores también han observado la presencia de una especie inmuno-reactiva de VDR de aproximadamente 75 kDa, cuya función aún no ha sido determinada y no se sabe como es que se obtiene esta variante (Yu *et. al.*, 1991). Sin embargo, Barsony y colaboradores en 1992, mostraron que después de la exposición con calcitriol, el VDR se asocia temporalmente con los microtubulos. El molibdato de sodio además de proteger al VDR

de proteasas endógenas, estabiliza su asociación con los microtúbulos. Quizá, al igual que el molibdato de sodio, el astemizol también protege al VDR de las proteasas y es por ello que al incubar las células de cáncer de mama con el antihistamínico, se observa mayor abundancia del receptor (Figura 16), o bien puede ser que la banda de 75 kDa quizá corresponda al VDR unido a microtubulos, pero esto requiere de mayor investigación. Es importante mencionar que el gen VDR es codificado por un gen relativamente grande, localizado en el brazo largo del cromosoma 12 (12q12-14) con al menos cinco regiones promotoras, capaz de generar múltiples transcritos específicos de tejidos (Khan *et. al.*, 2014). El incremento del VDR por el astemizol puede ser relevante fisiológicamente, como se muestra previamente en modelos de cáncer de próstata donde un ligero incremento en la expresión de VDR se tradujo en la sensibilización de las células al calcitriol, sin observar efectos secundarios (Yin *et. al.*, 2009).

El efecto sinérgico entre el calcitriol y el astemizol se observó a nivel de la proliferación celular y se reflejó en la inhibición de la expresión del marcador de proliferación Ki-67. La expresión de Ki-67 se utiliza normalmente para determinar el fenotipo molecular del cáncer de mama, pero también es frecuentemente usada como indicador de eficacia terapéutica (Urruticoechea *et. al.*, 2005). Es generalmente aceptado que la expresión de Ki-67 se incrementa en la fase S del ciclo celular y disminuye durante la fase G1 (Kill *et. al.*, 1996; du Manoir *et. al.*, 1991; Scholzen *et. al.*, 2000). En nuestro estudio, se observó la disminución consistente en la inmunoreactividad de Ki-67 después de tratar las células con calcitriol, astemizol o su combinación, sugiriendo que las células fueron arrestadas en fase G1. Lo anterior es congruente con los estudios previos que mostraron que el astemizol y el calcitriol inducen el arresto de las células en la fase G1 (Ouadid-Ahidouch *et. al.*, 2001; Ouadid-Ahidouch *et. al.*, 2004; Wang *et. al.*, 1996). Adicionalmente, en las microfotografías de Ki-67 se observó la disminución del tamaño celular en las células tratadas con astemizol, lo cual es indicativo de apoptosis (Bortner *et. al.*, 1997; Bortner *et. al.*, 1997).

Sorprendentemente, el astemizol, además de inhibir la actividad de Eag1, inhibir la proliferación y promover la apoptosis, también disminuyó la expresión de Eag1 en el cultivo primario IDC1 (Figura 10 C). El hecho de que el astemizol disminuyera la expresión de Eag1 puede deberse a:

- a) El cultivo primario fue derivado recientemente y no presenta tantas alteraciones acumuladas por pases sucesivos en comparación a las líneas celulares.
- b) Alternativamente, el astemizol puede estar bloqueando los canales Eag1 localizados en el interior de la membrana nuclear, los cuales pueden participar en la homeostasis nuclear del potasio o interactuar indirectamente con la heterocromatina, como ha sido propuesto previamente y que se sugiere afectan la expresión génica (Chen *et. al.*, 2011).

El astemizol, además, de bloquear la corriente a través de Eag1 también tiene otros blancos: bloquea canales de potasio rectificadores tardíos (IKr), el canal de potasio Erg y los receptores de histamina tipo 1. El canal de potasio Erg puede participar en la proliferación de las células neoplásicas, por lo que la inhibición de su actividad también inhibe el crecimiento celular. Sin embargo, no es un buen blanco terapéutico ya que participa en la repolarización ventricular y su inhibición desencadena arritmias cardíacas, síndrome de QT largo e incluso muerte súbita, razón por la que el astemizol se retiró del mercado de los Estados Unidos y del mercado Europeo en 1999. No obstante, la mayoría de estos efectos adversos involucran la sobredosis de astemizol de más de 200 mg/día (cuando la dosis recomendada es de 10 mg), la interacción farmacológica (con fármacos que inhiben su catabolismo, como el ketoconazol), los sujetos con enfermedad cardíaca o hepática (García-Quiroz and Camacho, 2011).

Los posibles mecanismos de acción del efecto sinérgico de la combinación calcitriol-astemizol se resumen en lo siguiente: El astemizol sinergiza la actividad antiproliferativa del calcitriol al disminuir la expresión génica de CYP24A1 e incrementar la del VDR. En las células del cáncer de mama, el paso de la fase G1 a S del ciclo celular depende del paso de los iones K^+ a través del canal Eag1 (Figura 21, número 1), promoviendo la proliferación celular. La expresión del gen Eag1 y su actividad son bloqueadas por el calcitriol (Figura 21, número 2) y el astemizol (Figura 21, número 3), respectivamente. El astemizol disminuye la expresión de CYP24A1 a nivel de RNAm (Figura 21, número 4), permitiendo que el calcitriol evada el catabolismo. El astemizol incrementa la expresión del VDR (Figura 21, número 5) favoreciendo los efectos biológicos del calcitriol. Después de la activación del receptor de vitamina D (VDR) por el calcitriol, este receptor forma dímeros con el receptor de retinoides X (RXR), dicho complejo se transloca al núcleo y se unen a elementos de

respuesta de la vitamina D (VDRE) en la región promotora de genes blanco, posteriormente se reclutan coactivadores de la transcripción, la RNA polimerasa II y se promueve la expresión génica. El calcitriol puede reprimir la expresión génica al unirse el complejo calcitriol-VDR-RXR a VDRE atípicos negativos, con los cuales interacciona VDIR (represor de interacción con VDR), que recluta correpresores de la transcripción y con ello se inhibe la expresión génica (6). El mecanismo mediante el cual el astemizol disminuye la expresión génica de CYP24A1 e incrementa la de VDR necesita ser investigado (Figura 21).

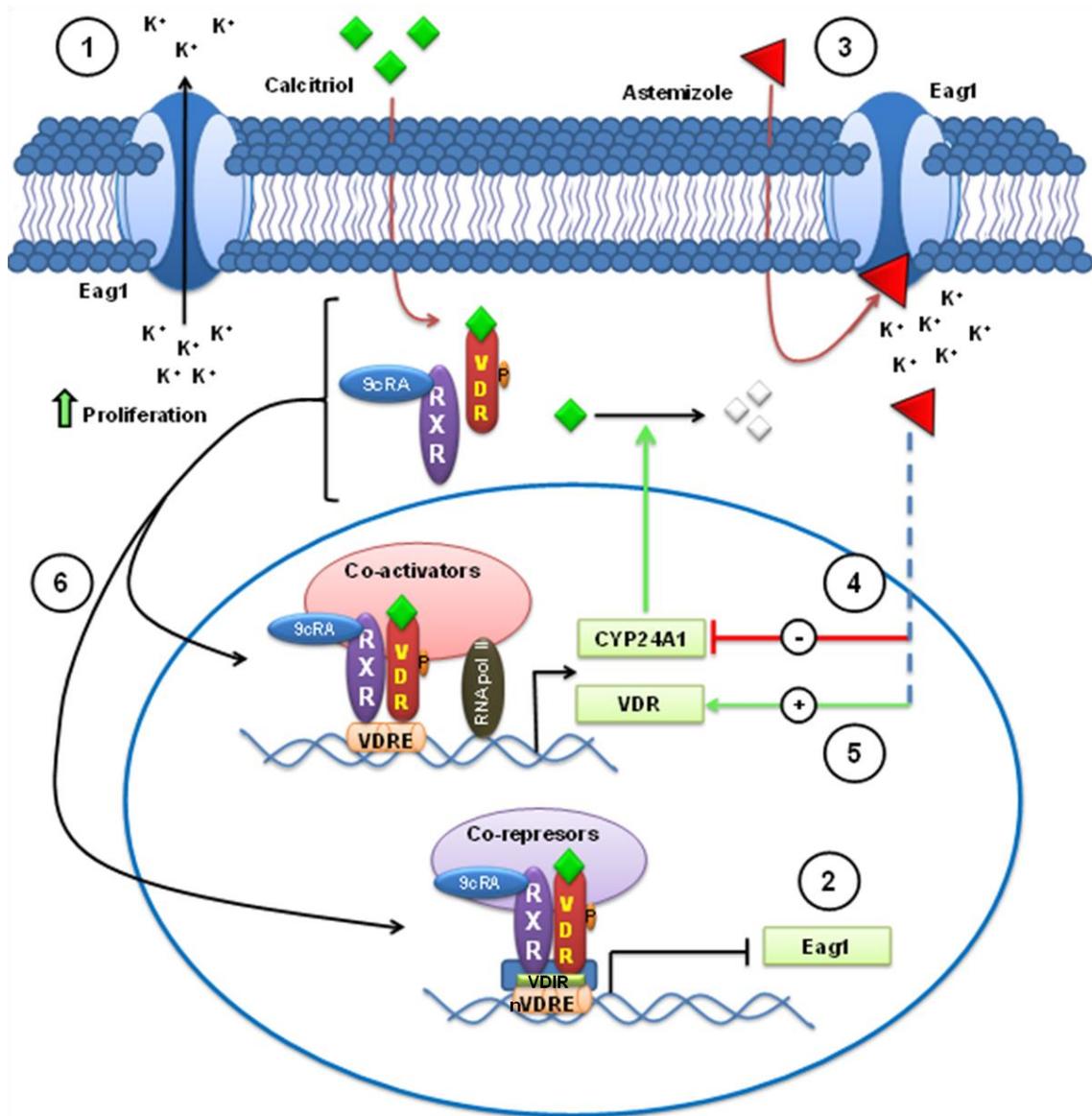


Figura 21. Ilustración de la discusión. VDR = receptor de la vitamina D, 9cRA = 9-cis ácido retinoico. CYP24A1 = citocromo involucrado en la inactivación del calcitriol, RXR = Receptor a retinoides X, RNApol II= RNA polimerasa tipo II, Rombo verde = calcitriol, triángulo rojo = astemizol, VDRE = elementos de respuesta a la vitamina D, nVDRE = elementos de respuesta a la vitamina D atípicos negativos, VDIR = represión de interacción con VDR, Eag1 = canal de potasio éter-à-go-go- tipo 1. Las líneas punteadas indican eventos mecánicos que aún no han sido determinados (García-Quiroz *et. al.*, 2012).

Probablemente al activarse el canal Eag1 se desencadena la activación de otros canales sensibles a voltaje, como los de calcio, ya que una característica de estos canales es su sensibilidad a cambios en el potencial de membrana. La señalización de calcio es un regulador de procesos importantes en cáncer, tal como apoptosis, proliferación, migración y diferenciación, de hecho, una variedad de canales y bombas de calcio se han asociado con diferentes tipos de cáncer, incluido el de mama (Azimi *et. al.*, 2014). Quizá, la activación de canales de calcio secundaria a la activación de Eag1, podría ser uno de los posibles mecanismos mediante el cual Eag1 incrementa la proliferación celular. Probablemente, el astemizol al bloquear la actividad Eag1 también afecta el transporte de calcio y con ello la proliferación celular.

Con base en estas observaciones y considerando la dosis recomendada de astemizol como antihistamínico, es necesario llevar a cabo ensayos clínicos diseñados para determinar la máxima dosis tolerada de astemizol en pacientes con cáncer y a la vez determinar la dosis como antineoplásico. También se ha demostrado que dependiendo de la concentración y del tejido, la histamina incrementa la proliferación celular y que antihistamínicos H₁ como terfenadina la inhiben (García-Quiroz *et. al.*, 2011). Probablemente, el astemizol como antihistamínico también inhibe la proliferación celular en mama.

En resumen, el estudio *in vitro* estableció que el calcitriol cuando se coincuba en la presencia de astemizol, incrementa sus efectos antineoplásicos en las células que expresen tanto VDR como Eag1. Este efecto fue probablemente debido a la regulación a la alta del VDR y a la inactivación de CYP24A1; así como a la inhibición de la expresión de Eag1 y a la actividad mediada por calcitriol y astemizol, respectivamente (Figura 21). Nuestros datos proporcionan bases científicas para probar ambos compuestos simultáneamente en sujetos afectados con cáncer de mama, particularmente en tumores que expresen VDR y Eag1. Además, la descripción mecanística de las interacciones moleculares involucradas en los efectos antineoplásicos del calcitriol y astemizol definidos aquí sugieren que el tratamiento combinado podría ser benéfico para pacientes con tumores sólidos o metastásicos con diferente firma molecular, incluyendo aquellos que no son sensibles a la terapia hormonal e inmunológica.

Acorde a lo anterior, *in vivo*, la coadministración de calcitriol y astemizol inhibió en mayor medida el crecimiento tumoral en comparación con el efecto de cada fármaco por separado. El efecto en conjunto de calcitriol y astemizol también se vio reflejado a nivel de la expresión de Ki-67, así como en el incremento de la expresión de VDR y disminución de Eag1. En estudios anteriores, para evaluar los efectos antineoplásicos del calcitriol, éste se administra tres veces por semana, pero con base en los antecedentes *in vitro*, se decidió administrar el calcitriol solo dos veces por semana. Si bien se han reportado efectos adversos del calcitriol como la hipercalcemia, ésta puede evitarse con un esquema de dosificación intermitente, misma que se aplicó en este estudio y en el cual no se observaron cambios significativos en los niveles de calcio en el suero de ratones (Tabla 7). Eag1 se encuentra principalmente expresado a nivel del sistema nervioso central, donde no se conoce su función con exactitud, pero se ha relacionado la disminución de su expresión con la esquizofrenia. Si bien el astemizol no atraviesa la barrera hematoencefálica, el calcitriol sí lo hace, por lo que se evaluó el efecto de los tratamientos sobre la expresión de Eag1 en el cerebro y se encontró que a las dosis administradas de calcitriol no se observó efecto sobre la expresión de Eag1 en cerebro. Por todo lo anterior, nuestro trabajo sugiere la factibilidad de probar con mayor seguridad y simultáneamente ambos compuestos en pacientes con cáncer de mama, ya que permitirían mayor efecto terapéutico disminuyendo la dosis y sin efectos secundarios a nivel neurológico. Sin embargo, sería necesario llevar a cabo un monitoreo cardíaco de la paciente, así como la evaluación de los niveles de calcio en la sangre.

La mayoría de los nuevos fármacos antineoplásicos tienen baja tasa de éxito ya que no pasan la fase I de ensayos clínicos (Kamb *et. al.*, 2007); no obstante, el calcitriol y el astemizol son fármacos comercializados actualmente en México y aprobados por la COFEPRIS; de hecho, para el estudio de los efectos *in vivo* se usó una suspensión pediátrica de astemizol.

8. CONCLUSIÓN

La administración concomitante del calcitriol y astemizol inhibió en mayor medida la proliferación celular y el crecimiento tumoral en comparación con el efecto de cada fármaco por separado. La explicación mecanística de este efecto reside, al menos en parte, a la potenciación de la bioactividad y biodisponibilidad del calcitriol mediada por el astemizol. Estos resultados proporcionan bases científicas para los estudios clínicos diseñados con la finalidad de probar ambos compuestos a bajas dosis manteniendo su efecto antineoplásico y con menos efectos secundarios. Lo aquí descrito ofrece una alternativa plausible y aplicable a aquellos fenotipos de cáncer de mama y a otros tumores que coexpresen Eag1 y VDR.

9. PERSPECTIVAS

Considerando la dosis recomendada de astemizol como antihistamínico, es necesario llevar a cabo ensayos clínicos diseñados para determinar la máxima dosis tolerada de astemizol en pacientes con cáncer y a la vez determinar la dosis como antineoplásico.

Si bien, hay estudios clínicos en fase II para determinar el efecto y la dosis del calcitriol como antineoplásico en cáncer de próstata, es necesario evaluar el efecto del calcitriol en pacientes con cáncer de mama.

Llevar a cabo estudios clínicos en pacientes con cáncer de mama para probar ambos compuestos a bajas dosis con la finalidad de mantener sus efectos antineoplásicos y disminuir los posibles efectos secundarios.

Evaluar el efecto antineoplásico del calcitriol y/o del astemizol en otros tumores que también expresen estos biomarcadores, como el de colon, ya que en este tipo de tumores tanto Eag1 como VDR se encuentran altamente expresados.

Determinar el mecanismo mediante el cual el astemizol disminuye la expresión génica de CYP24A1 e incrementa la de VDR.

Evaluar el efecto del astemizol como bloqueador de Eag1, sobre los niveles intracelulares de calcio y las consecuencias en la proliferación celular.

10. LISTA DE ABREVIATURAS

Calcidiol	25-hidroxivitamina D ₃
Calcitriol	1 α ,25 dihidroxivitamina D ₃
CI:	concentracion inhibitoria
CI₂₀:	concentracion inhibitoria al 20%
CI₅₀:	concentración inhibitoria al 50 %
CYP24A1:	enzima 1 α , 25-dihidroxivitamina D ₃ -24-hidroxilasa (24OHasa)
CYP27A1:	vitamina D-25-hidroxilasa (25-OHasa)
CYP27B1:	25-hidroxivitamina D ₃ -1 α -hidroxilasa (1 α -hidroxilasa)
Eag1:	canal de potasio éter-à-go-go- tipo 1
GAPDH:	gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
HER-2 neu:	receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
IC:	índice de combinación
ICQ:	inmunocitoquímica
IDC:	siglas en inglés de invasive ductal carcinoma (carcinoma ductal invasivo)
IHQ:	inmunohistoquímica
nVDRE's:	elementos de respuesta a la vitamina D atípicos negativos
PMS:	N-metildibenzopirazina metil sulfato
qPCR:	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RE:	receptor de estrógenos
RP:	receptor de progesterona
RT:	transcriptasa reversa
RXR:	receptor a retinoides X
SFB:	suero fetal de bovino
siRNA:	RNA pequeño de interferencia
TEI-9647:	Antagonista del VDR, 23S-25-dehydro-1-hydroxyvitamina-D ₃ -26,23-lactona
VDIR:	factor de transcripción denominado “represor que interactúa con el VDR”
VDR:	receptor de la vitamina D
VDRE's:	elementos de respuesta a la vitamina D
WB:	western blot
XTT:	sodio 3'-(1-(fenilaminocarbonilo)-3,4-tetrazolium)-bis (4-metoxi-6-nitro) hidrato de ácido benceno sulfónico

11. REFERENCIAS

Alberts B. BD, Lewis J: **Biología Molecular de la célula**, Ediciones Omega, Cuarta edición, cap 24, 2002.

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

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

Azimi I, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR: **Calcium influx pathways in breast cancer: oportunities for pharmacological intervention.** *British Journal of Pharmacology* **2014**, 171: 945-960.

Barrera D: **Acciones biológicas del calcitriol en la placenta humana.** Colección posgrado, Primera edición, pag 16, **2013**

Barsony J, McKoy W: **Molybdate increases intracelular 3', 5'-guanosine cyclic monophosphate and stabilizes vitamin D receptor association with tubulin-containing filaments.** *The Journal of Biological Chemistry*, **1992**, 267 (34): 24457-24465.

Beer TM, Munar M, Henner WD: **A Phase I trial of pulse calcitriol in patients with refractory malignancies: pulse dosing permits substantial dose escalation.** *Cancer* **2001**, 91(12):2431-2439.

Beer TM, Myrthue A: **Calcitriol in cancer treatment: from the lab to the clinic.** *Molecular Cancer Therapeutics* **2004**, 3(3):373-381.

Beer TM: **Development of weekly high-dose calcitriol based therapy for prostate cancer.** *Urologic Oncology* **2003**, 21(5):399-405.

Berger U, McClelland RA, Wilson P, Greene GL, Haussler MR, Pike JW, Colston K, Easton D, Coombes RC: **Immunocytochemical determination of estrogen receptor, progesterone receptor, and 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in breast cancer and relationship to prognosis.** *Cancer Research* **1991**, 51(1):239-244.

Borowiec AS, Hague F, Harir N, Guenin S, Guerineau F, Gouilleux F, Roudbaraki M, Lassoued K, Ouadid-Ahidouch H: **IGF-1 activates hEAG K (+) channels through an Akt-dependent signaling pathway in breast cancer cells: role in cell proliferation.** *Journal of Cellular Physiology* **2007**, 212(3):690-701.

Bortner CD, Cidlowski JA: **Caspase independent/dependent regulation of K (+), cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis.** *The Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274(31):21953-21962.

Bortner CD, Hughes FM, Cidlowski JA: **A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis.** *The Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272(51):32436-32442.

Brandan ME, Villasañor NY: **Detección del cáncer de mama: Estado de la mamografía en México.** *Cancerología* **2006**, 1:147-162.

Camacho J: **Ether a go-go potassium channels and cancer.** *Cancer Letters* **2006**, 233(1):1-9.

Chavarri-Guerra Y, Villarreal-Garza C, Liedke PE, Knaul F, Mohar A, Finkelstein DM, Goss PE: **Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system.** *The Lancet Oncology* **2012**, 13(8):e335-343.

Chen Y, Sánchez A, Rubio ME, Kohl T, Pardo LA, Stühmer W: **Functional K(v)10.1 channels localize to the inner nuclear membrane.** *PLoS One* **2011**, 6(5):e19257.

Chou TC: **Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies.** *Pharmacological Reviews* **2006**, 58(3):621-681.

Clark GM, McGuire WL: **Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer.** *Seminars in Oncology* **1988**, 15(2) Suppl 1:20-25.

Costa EM, Feldman D: **Measurement of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor turnover by dense amino acid labeling: changes during receptor up-regulation by vitamin D metabolites.** *Endocrinology* **1987**, 120(3):1173-1178.

Deeb KK, Trump DL, Johnson CS: **Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics.** *Nature Reviews Cancer* **2007**, 7(9):684-700.

Díaz L, Ceja-Ochoa I, Restrepo-Angulo I, Larrea F, Avila-Chávez E, García-Becerra R, Borja-Cacho E, Barrera D, Ahumada E, Gariglio P, Álvarez-Rios E, Ocadiz-Delgado R, García-Villa E, Hernández-Gallegos E, Camacho Arroyo I, Morales A, Ordaz-Rosado

D, García-Latorre E, Escamilla J, Sánchez-Peña LC, Saqui-Salces M, Gamboa-Domínguez A, Vera E, Uribe-Ramírez M, Murbartían J, Ortiz CS, Rivera-Guevara C, De Vizcaya-Ruiz A, Camacho J: **Estrogens and human papilloma virus oncogenes regulate human ether-a-go-go-1 potassium channel expression.** *Cancer Research* **2009**, 69(8):3300-3307.

Díaz L, Martínez-Reza I, García-Becerra R, González L, Larrea F, Méndez I: **Calcitriol stimulates prolactin expression in non-activated human peripheral blood mononuclear cells: breaking paradigms.** *Cytokine* **2011**, 55(2):188-194.

Downie BR, Sánchez A, Knötgen H, Contreras-Jurado C, Gymnopoulos M, Weber C, Stühmer W, Pardo LA: **Eag1 expression interferes with hypoxia homeostasis and induces angiogenesis in tumors.** *The Journal of Biological Chemistry* **2008**, 283(52):36234-36240.

du Manoir S, Guillaud P, Camus E, Seigneurin D, Brugal G: **Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment.** *Cytometry* **1991**, 12(5):455-463.

Fakih MG, Trump DL, Muindi JR, Black JD, Bernardi RJ, Creaven PJ, Schwartz J, Brattain MG, Hutson A, French R, Jhonson CS: **A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of intravenous calcitriol in combination with oral gefitinib in patients with advanced solid tumors.** *Clinical Cancer Research* **2007**, 13(4):1216-1223.

Farias LM, Ocaña DB, Díaz L, Larrea F, Avila-Chávez E, Cadena A, Hinojosa LM, Lara G, Villanueva LA, Vargas C, Hernández.Gallegos E, Camacho-Arroyo I, Dueñas-González A, Pérez-Cárdenas E, Pardo LA, Morales A, Taja-Chayeb L, Escamilla J, Sánchez-Peña C, Camacho J: **Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers.** *Cancer Research* **2004**, 64(19):6996-7001.

Gallego G: **Nódulo Palpable de Mama.** *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* **2005**, 56(1):82-91.

García-Becerra R, Díaz L, Camacho J, Barrera D, Ordaz-Rosado D, Morales A, Ortiz CS, Avila E, Bargallo E, Arrecillas M, Halhali A, Larrea F: **Calcitriol inhibits Ether-a go-go potassium channel expression and cell proliferation in human breast cancer cells.** *Experimental Cell Research* **2010**, 316(3):433-442.

García-Ferreiro RE, Kerschensteiner D, Major F, Monje F, Stühmer W, Pardo LA: **Mechanism of block of hEag1 K⁺ channels by imipramine and astemizole.** *The Journal of General Physiology* **2004**, 124(4):301-317.

García-Quiroz J, Camacho J: **Astemizole: an old anti-histamine as a new promising anti-cancer drug.** *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry* **2011**, 11(3):307-314.

Gavrilova-Ruch O, Schönherr K, Gessner G, Schönherr R, Klapperstuck T, Wohlrab W, Heinemann SH: **Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGR1 melanoma cells.** *The Journal of Membrane Biology* **2002**, 188(2):137-149.

Gómez-Varela D, Zwick-Wallasch E, Knötgen H, Sánchez A, Hettmann T, Ossipov D, Weseloh R, Contreras-Jurado C, Rothe M, Stühmer W, Pardo LA: **Monoclonal antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity.** *Cancer Research* **2007**, 67(15):7343-7349.

Hanahan D, Coussens LM: **Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment.** *Cancer cell* **2012**, 21(3):309-322.

Hansen CM, Frandsen TL, Brunner N, Binderup L: **1 alpha, 25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the invasive potential of human breast cancer cells in vitro.** *Clinical and Experimental Metastasis* **1994**, 12(3):195-202.

Hemmerlein B, Weseloh RM, Mello de Queiroz F, Knötgen H, Sánchez A, Rubio ME, Martin S, Schliephacke T, Jenke M, Heinz Joachim R, Stühmer W, Pardo LA: **Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours.** *Molecular Cancer* **2006**, 5(41):1-13.

Hergueta-Redondo M, Palacios J, Cano A, Moreno-Bueno G: **"New" molecular taxonomy in breast cancer.** *Clinical & Translational Oncology* **2008**, 10(12):777-785.

Imigo GF, Mancilla SE, Delama GI, Poblete SM, Fonfach ZC: **Clasificación molecular del cáncer de mama.** *Cuadernos de Cirugía* **2011**, 25:67-74.

Kamb A WS, Lengauer C.: **Why is cancer drug discovery so difficult?** *Nature Reviews Drug Discovery* **2007**, 6(2): doi:10.1038/nrd2155.

Khan MI, Bielecka ZF, Najm MZ, Bartnik E, Czarnecki JZ, Czarnecka AM, Szczylik C: **Vitamin D receptor gene polymorphisms in breast and renal cancer: Current state and future approaches (Review),** *International Journal of Oncology* 2014, 44:349-363.

Kill IR: **Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component.** *Journal of Cell Science* **1996**, 109 (Pt 6):1253-1263.

Knaul FM, López Carrillo L, Lazcano Ponce E, Gómez Dantes H, Romieu I, Torres G: **Breast cancer: a challenge for society and health systems.** *Salud Pública de México* **2009**, 51 Suppl 2:s138-140.

Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J: **Breast cancer in Mexico: a pressing priority.** *Reproductive Health Matters* **2008**, 16(32):113-123.

Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J: **Breast cancer in Mexico: an urgent priority.** *Salud Pública de México* **2009**, 51 Suppl 2:s335-344.

Lopes N, Sousa B, Martins D, Gomes M, Vieira D, Veronese LA, Milanezi F, Paredes J, Costa JL, Schmitt F: **Alterations in Vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions.** *BMC Cancer* **2010**, doi: 10.1186/1471-2407-10-483.

Ma Y, Qin H, Zheng Q, Wang Y, Wang Z, Yang Z: **Neoadjuvant chemotherapy with a combination of docetaxel, cisplatin, fluorouracil, and leucovorin in nonresectable advanced gastric cancer: a short communication.** *Medical Oncology* **2010**, 27(4):1089-1095.

Ma Y, Trump DL, Johnson CS: **Vitamin D in combination cancer treatment.** *Journal of Cancer* **2010**, 1:101-107.

Ma Y, Yu WD, Trump DL, Johnson CS: **1,25D3 enhances antitumor activity of gemcitabine and cisplatin in human bladder cancer models.** *Cancer* **2010**, 116(13):3294-3303.

Medina FH: **Oncología Clínica: Manual para médicos no oncólogos.** Ediciones PyDESA, Primera edición, Sección VI. Tumores de glándula mamaria, **2012**.

Muindi JR, Peng Y, Potter DM, Hershberger PA, Tauch JS, Capozzoli MJ, Egorin MJ, Johnson CS, Trump DL: **Pharmacokinetics of high-dose oral calcitriol: results from a phase 1 trial of calcitriol and paclitaxel.** *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **2002**, 72(6):648-659.

Muindi JR, Yu WD, Ma Y, Engler KL, Kong RX, Trump DL, Johnson CS: **CYP24A1 inhibition enhances the antitumor activity of calcitriol.** *Endocrinology* 2010, 151(9):4301-4312.

Nishimura R OT, Okumura Y, Tashima R, Toyozumi Y, Arima N.: **Changes in the ER, PgR, HER2, p53 and Ki-67 biological markers between primary and recurrent breast cancer: discordance rates and prognosis.** *World Journal of Surgical Oncology* 2011, 9(131): doi: 10.1186/1477-7819-9-131

O'Malley FP: **Lobular neoplasia: morphology, biological potential and management in core biopsies.** *Modern Pathology* 2010, 23 (2):S14-25.

Ouadid-Ahidouch H, Le Bourhis X, Roudbaraki M, Toillon RA, Delcourt P, Prevarskaya N: **Changes in the K⁺ current-density of MCF-7 cells during progression through the cell cycle: possible involvement of a h-ether.a-gogo K⁺ channel.** *Receptors & Channels* 2001, 7(5):345-356.

Ouadid-Ahidouch H, Roudbaraki M, Delcourt P, Ahidouch A, Joury N, Prevarskaya N: **Functional and molecular identification of intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in breast cancer cells: association with cell cycle progression.** *American Journal Physiology-Cell Physiology* 2004, 287(1):C125-134.

Pardo LA, del Camino D, Sánchez A, Alves F, Bruggemann A, Beckh S, Stühmer W: **Oncogenic potential of EAG K (+) channels.** *EMBO Journal* 1999, 18(20):5540-5547.

Pardo LA, Stühmer W: **Eag1 as a cancer target.** *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2008, 12(7):837-843.

Peehl DM SE, Feldman D.: **Rationale for combination ketoconazole/ vitamin D treatment of prostate cancer.** *Urology* 2001, 58(2) Suppl 1:123-126.

Pinder SE: **Ductal carcinoma in situ (DCIS): pathological features, differential diagnosis, prognostic factors and specimen evaluation.** *Modern pathology* 2010, 23 Suppl 2: S8-13.

Rodríguez-Cuevas S, Macias CG, Franceschi D, Labastida S: **Breast carcinoma presents a decade earlier in Mexican women than in women in the United States or European countries.** *Cancer* 2001, 91(4):863-868.

Roy J, Vantol B, Cowley EA, Blay J, Linsdell P: **Pharmacological separation of hEAG and hERG K⁺ channel function in the human mammary carcinoma cell line MCF-7.** *Oncology Reports* 2008, 19(6):1511-1516.

Scholzen T, Gerdes J: **The Ki-67 protein: from the known and the unknown.** *Journal of Cellular Physiology* **2000**, 182(3):311-322.

Schulz M, Schmoldt A: **Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics.** *Die Pharmazie* **2003**, 58(7):447-474.

Sotiriou C, Pusztai L: **Gene-expression signatures in breast cancer.** *The New England Journal of Medicine* **2009**, 360(8):790-800.

Swami S, Krishnan AV, Wang JY, Jensen K, Peng L, Albertelli MA, Feldman D: **Inhibitory effects of calcitriol on the growth of MCF-7 breast cancer xenografts in nude mice: selective modulation of aromatase expression *in vivo*.** *Hormones and Cancer* **2011**, 2(3):190-202.

Toell A, Macias-González M, Ruf Dagmar, Steinmeyer A, Ishizuka S, Carlberg C: **Different molecular mechanisms of vitamin D3 receptor antagonists.** *Molecular Pharmacology* **2001**, 59: 1478-1485.

Ufartes R, Schneider T, Mortensen LS, de Juan Romero C, Hentrich K, Knoetgen H, Beilinson V, Moebius W, Tarabykin V, Alves F, Pardo LA, Rawlins JN, Walther Stühmer: **Behavioural and functional characterization of Kv10.1 (Eag1) knockout mice.** *Human Molecular Genetics* **2013**, 22(11):2247-2262.

Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M: **Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer.** *Journal of Clinical Oncology* **2005**, 23(28):7212-7220.

Wang QM, Jones JB, Studzinski GP: **Cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a mediator of the G1-S phase block induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in HL60 cells.** *Cancer Research* **1996**, 56(2):264-267.

Wiese RJ, Uhland-Smith A, Ross TK, Prahl JM, DeLuca HF: **Up-regulation of the vitamin D receptor in response to 1,25-dihydroxyvitamin D3 results from ligand-induced stabilization.** *The Journal of Biological Chemistry* **1992**, 267(28):20082-20086.

Yin Y, Ni J, Chen M, Guo Y, Yeh S: **RRR-alpha-vitamin E succinate potentiates the antitumor effect of calcitriol in prostate cancer without overt side effects.** *Clinical Cancer Research* **2009**, 15(1):190-200.