



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Sensibilización a la terapia hormonal de las células de
carcinoma mamario RE-negativo mediante la inducción de
receptores de estrógenos por el calcitriol”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. NANCY SANTOS MARTÍNEZ

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA**

Directores de la tesis:

**Dra. ROCÍO ÁNGELES GARCÍA BECERRA
Dr. FRANCISCO JAVIER CAMACHO ARROYO**

México, D.F.

ABRIL, 2014

Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, en colaboración con el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, bajo la dirección y tutoría del Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo y la Dra. Rocío Ángeles García Becerra

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No. 215643 otorgada durante la realización del posgrado y por el apoyo al proyecto No.129315

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rocío Ángeles García Becerra y al Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo por su apoyo y asesoría en la realización del trabajo, por la generosidad que me brindan al compartir sus conocimientos. Pero sobre todo por su confianza y amistad.

A los Drs. Lorenza Díaz, David Barrera, Euclides Avila, Alí Halhali, y Mayel Chirinos del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por su apoyo y enseñanzas. Al Jefe del Departamento el Dr. Fernando Larrea por la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su apoyo y aportaciones al trabajo.

A los sinodales los Drs. Gilberto Castañeda Hernández, María del Refugio García Villegas, María Eugenia del Carmen Mendoza Garrido y Lorenza Díaz Nieto por sus valiosas aportaciones al trabajo.

A mis compañeros David, Janice, Isela, Leticia, Verna, Ramiro, Mariana, Nancy, Andrea, Saúl, Helen, Aideé, Gabriela y Juan del laboratorio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por brindarme su apoyo en todo momento.

A mis compañeros del laboratorio 13 del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN por compartir una vida académica.

A Elizabeth Hernández, Eunice Vera, Beatriz Alcántara, Olinka Flores, Ma. Guadalupe Alarcón, Hilda Rojas y Luis Pérez por su asistencia técnica y apoyo secretarial.

DEDICATORIAS

Con todo mi amor y cariño para ustedes. Quienes hicieron todo en la vida para que yo pudiera cumplir este sueño. Gracias por nunca dejarme sola, por motivarme e inspirarme y ser ese gran soporte que me mantuvo de pie en los momentos más difíciles.

A mis Padres queridos Oli y Eloy

A mis cómplices de aventuras. Gracias por darme su amor, por creer en mí, por apoyarme y motivarme. Sin duda, ustedes son las personas con las que mejor me tocó compartir esta vida.

Mis hermanos Luis, Laura y Erik, y mi pequeño sobrino Santiago.

A mis viejos. Que siempre me dijeron que con trabajo se logran las cosas y me ensañaron a dejar el corazón en ello.

Mis abuelos Raymundo, Samuel, Sabina y Petra.

Gracias mi gran Sabio y Maestro, por guiarme en la vida, por sorprenderme cada instante y por amarme profundamente.

A ustedes las personas que conocí y con las que compartir muchos momentos increíbles y sobre todo para aquellas personas que con gran tristeza y profundo dolor perdí. Después de mucho aprendí que no puede haber un futuro si no hay un presente, que es importante dar el primer paso, que el genio no lo puede todo sino la determinación. Gracias por inspirarme, espero honrar su vida y memoria siempre.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
1. Generalidades.....	4
1.1 Estructura y función de la glándula mamaria.....	4
1.2 Los estrógenos y el receptor de estrógenos.....	6
2. Los estrógenos y el cáncer de mama.....	9
2.1 El receptor de estrógeno y el tratamiento endocrino en el cáncer de mama... ..	10
3. Vitamina D y el cáncer de mama.....	12
3.1 Bioactivación de la vitamina D.....	12
3.2 Mecanismos de acción de la vitamina D.....	16
3.2.1 Acciones genómicas.....	16
3.2.2 Acciones no genómicas.....	16
3.3. Efectos de la Vitamina D en el cáncer de mama.....	17
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23
1. Reactivos.....	23
2. Tejidos humanos y líneas celulares.....	23
3. Criterios de selección de la biopsia.....	24
4. Cultivos celulares.....	24
5. Inmunocitoquímica.....	25
6. Western blot.....	25
7. Proliferación celular.....	26
8. PCR en tiempo real.....	27
9. Análisis <i>in silico</i> para identificar elementos de respuesta a vitamina D en el promotor del RE α	28
10. Análisis estadísticos.....	29
RESULTADOS	30
1. Caracterización de las células de cáncer de mama.....	30
2. Las células de tumores mamario RE-negativo son sensibles a los efectos del calcitriol.....	32
3. El calcitriol incrementó la expresión RE α a través de un mecanismo dependiente del VDR en las células de cáncer de mama RE-negativo.....	34
4. El calcitriol induce la expresión de la proteína del RE α en células de cáncer de mama RE α -negativas.....	36

5. El calcitriol induce la expresión de un RE α funcional en las células de cáncer de mama RE α -negativa.	38
6. El calcitriol sensibiliza a las células de cáncer de mama RE α -negativas a los efectos antiproliferativos de los antiestrógenos	40
7. El ICI-182, 780 regula a la baja la expresión génica de <i>CCND1</i> y <i>EAG1</i> en células de cáncer de mama tratadas con calcitriol	42
8. El calcipotriol, un análogo de la vitamina D, incrementa la expresión del RE α en células de cáncer de mama RE α	44
9. La actividad de la MAPK en células de tumores mamarios RE-negativo tratadas con calcitriol.....	46
10. Análisis <i>in silico</i> de elementos de respuesta a vitamina D en el promotor del RE α	49
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIÓN.....	55
PERSPECTIVAS	56
REFERENCIAS	57
1. Revista electrónica.....	68
2. Página WEB.....	68
ABREVIACIONES.....	69
ANEXOS.....	70

RESUMEN

En el cáncer de mama, la presencia del receptor de estrógenos (RE) confiere un mejor pronóstico y respuesta a la terapia hormonal. Sin embargo, aproximadamente el 30% de los tumores de mama no expresan al RE. Varios estudios han sido llevados a cabo para restaurar la expresión de RE α en células de cáncer de mama RE α -negativas con la finalidad de sensibilizar a las células a los efectos inhibitorios de los antiestrógenos en el crecimiento celular. El objetivo del presente trabajo fue determinar si el calcitriol era capaz de restaurar la respuesta a los antiestrógenos mediante la inducción del RE α en células de cáncer de mama RE α -negativas. Las células derivadas de tumores de mama RE-negativos y una línea celular establecida SUM-229PE (RE α -negativo) fueron tratadas con calcitriol. Los estudios de PCR en tiempo real (qPCR) y western blot mostraron que el calcitriol a través de su receptor de vitamina D (VDR) indujo la expresión del ARNm y de la proteína del RE α . La funcionalidad del receptor inducido por calcitriol se comprobó por el aumento de la expresión génica de prolactina (PRL) estimulada por estradiol. Los ensayos de crecimiento celular con XTT en las células RE α -negativas tratadas con el calcitriol y posterior incubación con los antiestrógenos en presencia de la hormona mostraron la restauración de los efectos antiproliferativos de los antiestrógenos. El tratamiento combinado del calcitriol con el antagonista del receptor de estrógenos (ICI-182, 780) disminuyó la expresión génica de ciclina D1 (*CCND1*) y Éter-à-go-gó 1 (*EAG1*), genes involucrados en el ciclo celular y en el desarrollo del cáncer de mama. Además, los estudios de la actividad de la MAPK y los análisis *in silico* del promotor del RE α fueron llevados a cabo para dilucidar el posible mecanismo de inducción del RE α por el calcitriol. Los resultados mostraron regulación diferenciada de la actividad de la MAPK dependiendo del tipo celular. Siete posibles elementos de respuesta a la vitamina D (VDREs) fueron encontrados en la región promotora del RE α , lo cual sugiere la posible regulación directa del VDR sobre la transcripción

del RE α . En conclusión estos hallazgos demuestran que el tratamiento combinado de calcitriol y los antiestrógenos podría ser una buena estrategia terapéutica para aquellos pacientes con cáncer de mama RE α -negativo.

ABSTRACT

Approximately 30% of breast tumors do not express the estrogen receptor (ER) α , which is necessary for endocrine therapy approaches. Studies are ongoing in order to restore ER α expression in ER α -negative breast cancer. The aim of the present study was to determine if calcitriol could restore antiestrogen response by inducing ER α expression in ER α -negative breast cancer cells. Cultured cells derived from ER α -negative breast tumors and an established ER α -negative breast cancer cell line (SUM-229PE) were treated with calcitriol. Real time-PCR (qPCR) and western blot analyses showed that calcitriol induced ER α mRNA and protein expression via its vitamin D receptor. The ER α functionality was evaluated by prolactin gene expression analysis. Growth assays with XTT in ER-negative breast cancer cells treated with the hormone showed that calcitriol sensitizes them to the antiproliferative effects of the antiestrogens. In addition, cells treated with calcitriol and ICI-182, 780 resulted in a significant reduction of two important cell proliferation regulators, namely cyclin D1 (CCND1) and Ether à-go-go 1 (EAG1). Furthermore, MAPK activity and *in silico* analysis were performed to elucidate the possible mechanisms of ER α induction by calcitriol. A differential regulation of MAPK activity was observed and seven potential vitamin D response element (VDRE) were found in the promoter region of ER α , which indicate the possible direct regulation of vitamin D receptor (VDR) upon ER α expression. Overall, our findings demonstrated that the combined treatment of calcitriol and antiestrogens could be a new therapeutic strategy for ER α -negative breast cancer patients.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en las mujeres (aproximadamente el 23% del total de los cánceres) y es un problema de salud pública tanto en los países desarrollados como en los emergentes, debido a su incremento paulatino en frecuencia y mortalidad [1]. En México, los tumores de mama ocupan el primer lugar como causa de muerte por neoplasia en mujeres de 25 años en adelante [2].

1. Generalidades

1.1 Estructura y función de la glándula mamaria

La mama está formada por estructuras tubulares huecas llamadas alvéolos. Estos se unen para formar los lóbulos y cada uno de estos posee un ducto lactífero que drena en los orificios del pezón (Figura 1) [3].

Los alvéolos están recubiertos por células epiteliales secretoras y rodeados por células mioepiteliales. Los conductos están revestidos de epitelio escamoso estratificado. El revestimiento de los conductos mamarios principales está constituido por epitelio columnar pseudoestratificado y epitelio cuboidal de dos capas. Por debajo de este epitelio se encuentra una capa de células aplanadas: las células mioepiteliales. Los lóbulos se encuentran en un estroma denso, colagenoso y fibroso [3, 4].

Las funciones de la glándula mamaria son la síntesis, secreción y eyección de la leche; estas funciones, conocidas como lactación, se asocian al embarazo y al parto [5, 6]. La producción de leche es estimulada en gran parte por la hormona de la prolactina (PRL), secretada por la adenohipófisis, con ayuda de la progesterona y los estrógenos [7, 8]. La eyección de la leche es estimulada por la oxitocina, liberada por la neurohipófisis en respuesta a la succión por parte del

lactante [9]. La leche es impelida desde los alvéolos, a través de los ductos lactíferos hacia el pezón, donde se almacena en los senos de los ductos [6].

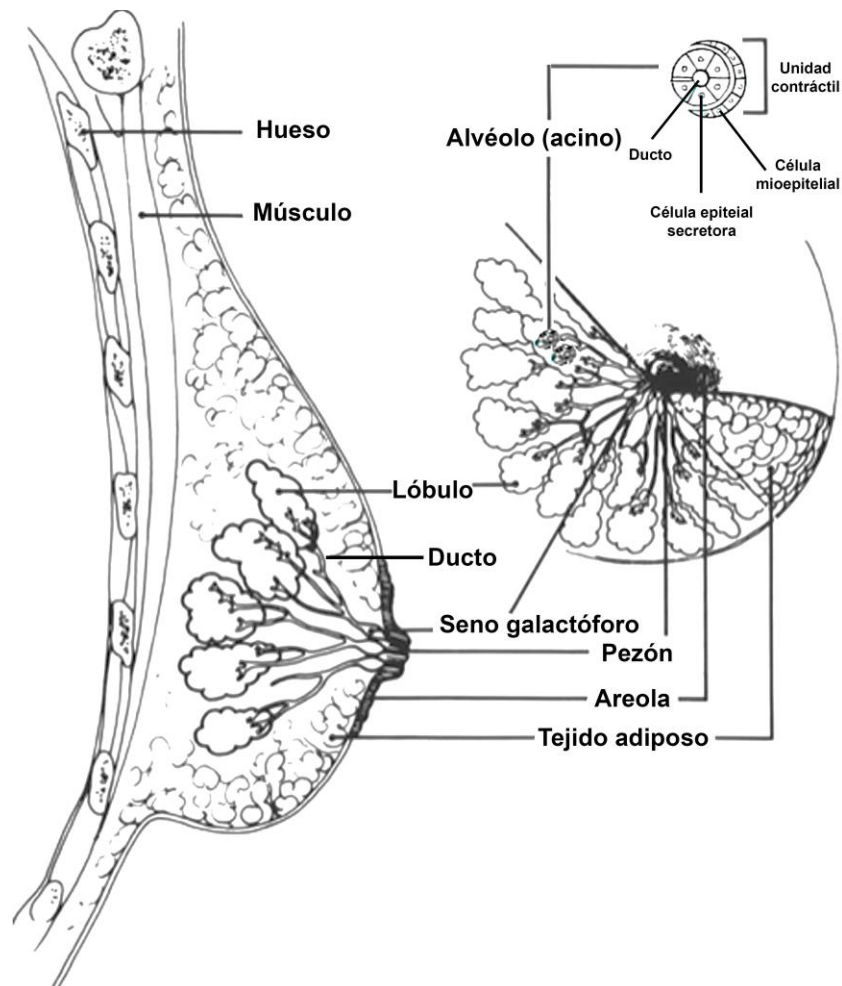


Figura 1. Anatomía de la glándula mamaria. La mama, es una prominencia de tamaño variable, posee ciertas estructuras tanto externas como internas. En el exterior se puede visualizar al pezón y la areola. Internamente la mama posee gran cantidad de tejido adiposo, que la constituye en un 90% dándole forma abultada, además se integran al tejido los conductos y los lóbulos que están compuestos por unidades más pequeñas conocidos como alvéolos. Estos a su vez están formados de células epiteliales secretoras y células mioepiteliales. Tomado y modificado de http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=File:Mammary_anatomy.jpg.

1.2 Los estrógenos y el receptor de estrógenos

Los estrógenos tienen acciones biológicas en diferentes tejidos. En la glándula mamaria, los estrógenos estimulan el crecimiento y la diferenciación del epitelio ductal y estimulan el crecimiento del tejido conectivo [10-12].

Los efectos de los estrógenos (principalmente el 17β estradiol, E2) están mediados por dos subtipos de receptores de estrógenos (RE), el subtipo α y el β , los cuales son codificados por diferentes genes localizados en el cromosoma 6 y 14, respectivamente [13, 14]. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de los factores de transcripción. El mecanismo general de acción de los estrógenos con el RE es regulado a través de dos vías: la genómica y la no genómica (Figura 2) [15].

En la vía la genómica, los estrógenos se difunden a través de la membrana celular y se unen al RE, que se encuentra en el citoplasma o en el núcleo [10]. La unión del ligando al receptor induce cambios en su conformación y la disociación de las proteínas de choque térmico, que mantienen al RE en un estado inactivo [16, 17]. El receptor activado se dimeriza e interacciona con los elementos de respuesta a estrógenos (EREs), que se encuentran localizados dentro de la región reguladora del ADN en los genes blanco [18]. La interacción del RE activado con el ADN puede ser de dos formas: directa o indirecta (a través de la unión con la proteína activadora 1 o la especificidad de proteína 1), lo que resulta en el reclutamiento de las proteínas coreguladoras (coactivadores o corepresores) que llevan a cabo la incorporación organizada de los componentes de la maquinaria transcripcional y de los factores intermediados que modifican la estructura de la cromatina [19-21]. El complejo estrógeno/RE/coreguladores modula la transcripción de muchos genes blancos de los estrógenos [22].

En la vía no genómica, los estrógenos puede actuar más rápidamente (en cuestión de segundos o minutos) a través del RE situado en la membrana

plasmática o adyacente a esta, o a través de otras proteínas de unión a estrógenos asociada a la membrana plasmática (como el receptor acoplado a la proteína G 30, GPR30) [23-26]. La activación de estos receptores membranales permiten la interacción con otras proteínas, tales como proteínas adaptadoras, receptores a factores de crecimiento, cinasas citoplasmáticas y enzimas (adenilato ciclasa, oxido nítrico-sintasa) [27-29]. Estas interacciones activan mecanismos independientes de la transcripción de genes [30].

Ambas vías la genómica y no genómica pueden interactúan entre sí para regular muchos procesos que están bajo la acción de los estrógenos. El RE nuclear induce la expresión del factor de crecimiento transformante α y de la anfiregulina los cuales son capaces de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) [31]. La vías de señalización como las de proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la fosfoinositol 3-cinasa/proteína cinasa B (PI3K/AKT) son activadas por receptores a factores de crecimiento como EGFR [32, 33]. Estas vías son capaces de fosforilar y activar al RE nuclear en la serina 118 y 167, este proceso es conocido como activación independiente de ligando [34, 35]. Por otro lado, el RE membranal es capaz unirse a caveolina 1 y activar a las metaloproteinasas de la matriz extracelular y escindir al factor de crecimiento epidérmico unido a heparina, ligando del EGFR [23]. La activación de la vías de señalización a factores de crecimiento conducen a la activación de RE nuclear y viceversa [32].

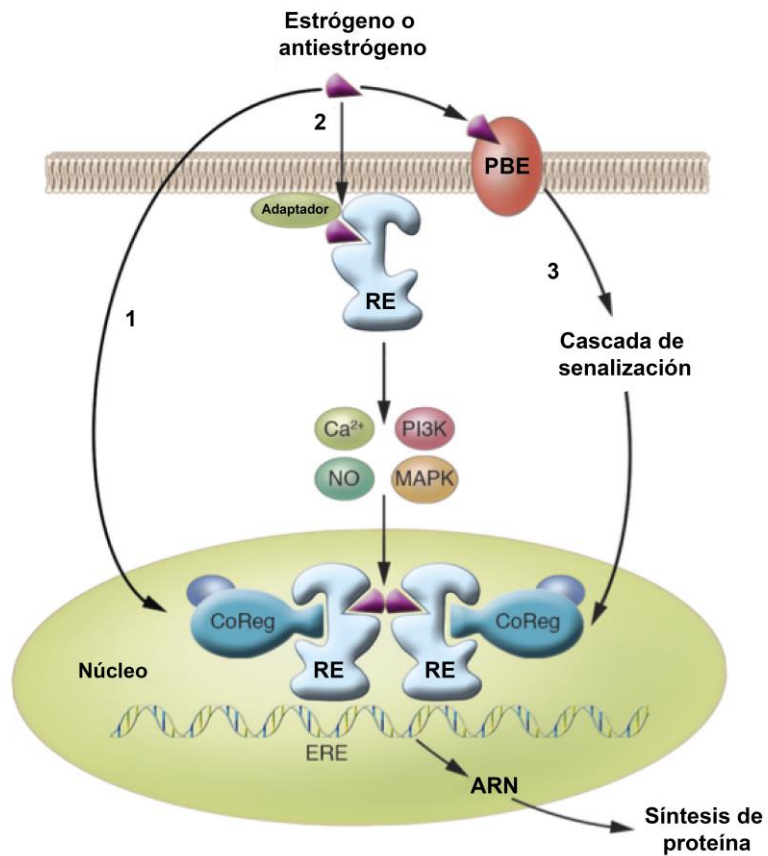


Figura 2. Mecanismo de acción de los estrógenos. Vía genómica (1). El estrógeno o los antiestrógenos se unen al receptor de estrógeno (RE), un factor de transcripción dependiente de ligando, y permite la interacción con los elementos de respuesta a estrógeno (ERE) en el ADN. El reclutamiento de coreguladores al complejo estrógeno/RE en el ADN regula la transcripción de genes blanco. Vía no genómica (2). Los efectos rápidos de los estrógenos pueden ser efectuados a través del RE localizado en la membrana o adyacente a ésta. La activación de cascadas de señalización de la MAPK o de la PI3K y de segundos mensajeros como calcio (Ca^{2+}) y óxido nítrico (NO) son señales mediadas por este receptor membranar. Otra proteína de unión a estrógenos (PBE, como la GPR30) que se encuentra localizada en la membrana celular, puede activar señales intracelulares dependientes de estrógenos (3). Tomado y modificado de Deroo BJ, Korach KS, The Journal of clinical investigation 2006, 116(3):561-570.

2. Los estrógenos y el cáncer de mama

La glándula mamaria es particularmente dependiente de estrógenos, y éstos son un factor de riesgo importante para el desarrollo del cáncer de mama [36]. La sobreexpresión de su receptor, particularmente el subtipo α , está asociada con la iniciación y la progresión de esta neoplasia [37].

El carcinoma mamario es una enfermedad heterogénea, que abarca una serie de entidades biológicas distintas que están relacionadas con una variedad de rasgos patológicos y clínicos [38]. El perfil de expresión de genes del cáncer de mama basado en la positividad para el RE y relacionado con el pronóstico o con el riesgo de metástasis clasifica al cáncer de mama en 2 grandes grupos: receptor de estrógeno (RE)-positivo y el RE-negativo.

El tipo de tumor RE-positivo (subtipo luminal A y B) tiene un inmunofenotipo similar al componente epitelial luminal de la glándula mamaria normal, poseen alta expresión de genes relacionados con los receptores hormonales, citoqueratinas luminales (CK 8, 18, 19), caderina-E y son de bajo grado histopatológico. Por otra parte, el fenotipo RE-negativo está dividido principalmente en dos subtipos: con sobreexpresión del receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2/neu) y el basal/mioepitelial. El subtipo HER-2/neu tiene amplificación y sobreexpresión del gen c-erbB2, sobreexpresa genes de proliferación y presenta escasos genes asociados al fenotipo luminal. El subtipo basal (conocido también como triple negativo) carece de la expresión del receptor de progesterona (RP), del HER-2 y del RE, tiene expresión de citoqueratinas de alto peso molecular (CK 5, 6, 14, 17), caderina-P, marcadores mesenquimáticos (α -actina y vimentina) y alteración de genes reparadores del DNA. Ambos subtipos del RE-negativo están asociados con caracteres histopatológicos de mal pronóstico (Figura 3) [39-42].

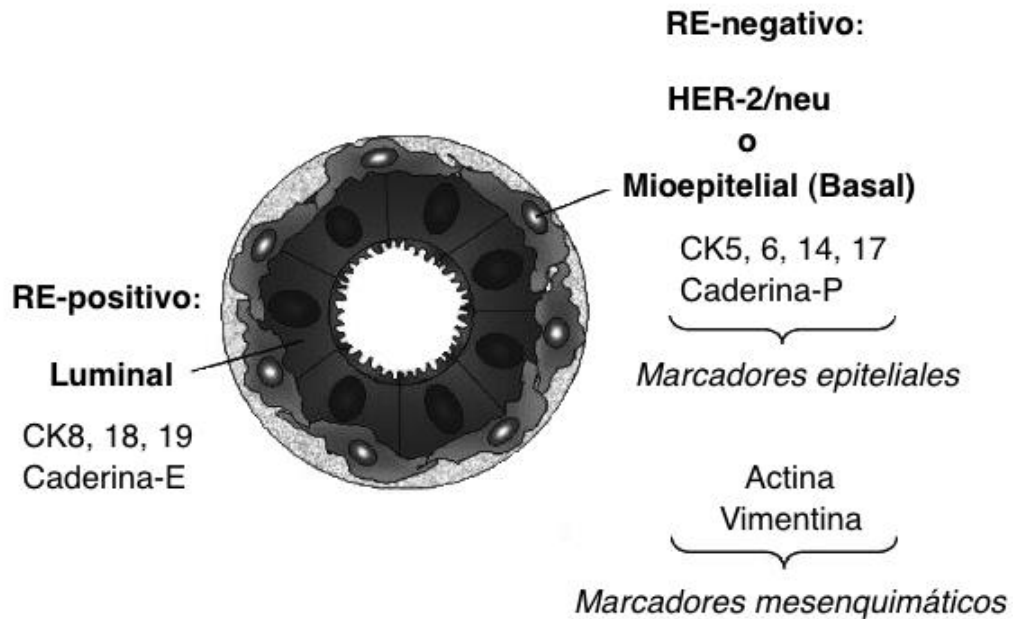


Figura 3. Clasificación y marcadores de tumores mamarios. El subtipo luminal posee alta expresión de genes relacionados con la proliferación celular, receptores hormonales, citoqueratinas (CK 8, 18, 19) y caderina-E. El subtipo con sobreexpresión de HER-2/neu tiene baja o nula expresión del RE y además sobreexpresa genes de proliferación. El subtipo basal/mioepitelial expresa citoqueratinas de alto peso molecular (CK 5, 6, 14, 17), caderina-P y marcadores mesenquimáticos (α -actina y vimentina) y carece de la expresión de receptores hormonales. Tomado y modificado de http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?pid=S0718-28642011000100010&script=sci_arttext.

2.1 El receptor de estrógeno y el tratamiento endocrino en el cáncer de mama

El RE α bajo la acción estrogénica juega un papel preponderante en la biología del cáncer de mama. La presencia de este receptor correlaciona con mejor pronóstico y supervivencia libre de la enfermedad, y otorga un beneficio sustancial como blanco terapéutico en la terapia hormonal del cáncer de mama [43].

El tratamiento endocrino (a veces conocido como terapia hormonal) funciona mediante la reducción de los niveles de estrógenos o el bloqueo de sus efectos a

través del RE con la finalidad de inhibir el crecimiento de las células cancerosas. Tres clases de agentes endocrinos anti-hormonales han sido utilizados: inhibidores de la aromatasa (IA, tales como el anastrozol, el letrozol y el exemestano) que inhiben la síntesis de estrógeno, moduladores selectivos de receptores de estrógeno (SERM, como el tamoxifeno) que bloquean la actividad del RE y reguladores selectivos a la baja del receptor de estrógeno (SERD, por ejemplo, el ICI-182, 780 [fulvestrant] e ICI-164, 384) que inducen la desestabilización y la degradación del RE [44].

El tamoxifeno ha sido la base de la terapia hormonal para pacientes pre- y postmenopáusicas con cáncer de mama RE-positivo. El uso de este compuesto por periodos largos incrementa la sobrevida y reduce el riesgo de recurrencia del cáncer original [45]. Sin embargo, del 25-35% de los tumores RE-positivos manifiestan resistencia de *novo* al tamoxifeno, y aquellos que inicialmente respondieron pueden adquirir resistencia a la terapia hormonal [46]. Además, más del 50% de los pacientes con tumores primarios RE-positivos pierden la expresión del RE α en tumores recurrentes, y cerca de un tercio de tumores metastásicos que mostraban respuesta inicial tendieron a desarrollar resistencia a la terapia hormonal y pérdida de la expresión del RE α [46]. En esta instancia, la falta de expresión del RE α excluye el uso del tamoxifeno como terapia adyuvante.

El cáncer de mama RE-negativo consta de tumores metastásicos que presentan mal pronóstico, debido a su comportamiento más agresivo y a que no responden a la terapia endocrina [43], este tipo de cáncer ha sido el centro de atención de varias investigaciones durante los últimos años con la finalidad de entender el origen y las características de este fenotipo. Los principales mecanismos propuestos en la pérdida de expresión del RE α en el cáncer de mama incluyen: hipermetilación del promotor [47, 48], la falta de aporte estrogénico [49], la hipoxia [50], la metilación en las islas CpG en la región promotora [51], la expresión alterada de microRNAs [52, 53] e hiperactivación de la MAPK debido a la sobreexpresión del EGFR o del gen c-erbB2 [54]. En relación con esto, en células

de cáncer de mama RE α -negativas se ha demostrado que el silenciamiento de microARNs específicos, la desmetilación del promotor del RE α con inhibidores de la ADN metiltransferasa-1, el tratamiento con inhibidores de la histona deacetilasa, o bien, la inhibición de la vía de señalización de MAPK, resultan en la reexpresión del RE α así como en la restauración de la respuesta al tratamiento antiestrogénico [52, 55, 56]. Esto indica que hay mecanismos reversibles en el cáncer de mama RE α -negativo que pueden ser terapéuticamente dirigidos.

3. Vitamina D y el cáncer de mama

La vitamina D juega un papel esencial en la homeostasis del calcio y el metabolismo óseo, pero en los últimos años se han descrito diversas acciones de esta vitamina en el control de varios sistemas endocrinos, en la modulación del sistema inmune, y en la prevención y actividad antitumoral de diversos tipos de cánceres [57, 58].

3.1 Bioactivación de la vitamina D

La síntesis de la vitamina D se inicia con la exposición de la piel a los rayos UV de la luz solar (290 nm a 315 nm) que generan la conversión fotolítica del 7-dehidrocolesterol a previtamina D, lo cual es seguido por isomerización térmica no enzimática a vitamina D (colecalfiferol) [59, 60]. La vitamina D más que una vitamina, es una prohormona, cuya configuración molecular es similar a la de los esteroides clásicos (cortisol, aldosterona, estradiol), ya que posee la estructura básica del anillo ciclopentanoperhidrofenantreno [61]. Esta vitamina también puede ser obtenida de la dieta en menor cantidad [57, 62, 63].

Para ejercer sus efectos fisiológicos, la vitamina D debe convertirse a su forma activa. Para ello, esta prohormona es transportada a el hígado por la proteína de

unión a vitamina D (DBP), que es una proteína fijadora específica para vitamina D y sus metabolitos [59, 64].

El primer paso en la activación metabólica de la vitamina D es la hidroxilación del carbono 25 por el citocromo P-450 (CYP27A1, 25 hidroxilasa) que favorecen la conversión de la vitamina D a 25-hidroxivitamina D (conocida también como calcidiol o hidroxicolecalciferol) [62]. Esta es la principal forma circulante de la vitamina D y por lo tanto es el mejor indicador de los niveles de esta vitamina [59].

El segundo paso consiste en el transporte del calcidiol hacia el riñón por la proteína DBP. Para completar su proceso de activación, el calcidiol es hidroxilado en el carbono 1 del anillo A y transformado a la forma activa de la vitamina D, que es la $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D (calcitriol), responsable de la mayoría de los efectos biológicos de la vitamina D [65]. Esta reacción de hidroxilación es catalizada por la enzima mitocondrial 1α -hidroxilasa (CYP27B1). Esta enzima se encuentra predominantemente en las células de los túbulos renales, pero también se expresa en sitios extrarrenales como placenta, monocitos, macrófagos, próstata, mama, colon, corazón, pulmón, cerebro, queratinocitos, células β pancreáticas y células paratiroides [66]. Estos sitios extrarrenales también contribuyen a la síntesis de la hormona.

La 24-hidroxilasa (CYP24A1) es la enzima que se encarga de inactivar al calcitriol. Esta hidroxilasa limita la cantidad de calcitriol en los tejidos blanco, acelerando su catabolismo hacia el $1\alpha,24,25$ -trihidroxivitamina D, y luego a ácido calcitroico (forma inactiva), que es excretado en la orina (Figura 4) [59, 62].

La regulación de la síntesis del calcitriol implica una serie de procesos de retroalimentación positiva y negativa que son el resultado de los cambios en la expresión de las enzimas hidroxilasas que lo sintetizan [62]. El calcitriol es una hormona importante en el metabolismo del calcio y del fósforo en el cuerpo [67]. Los niveles bajos de calcio (hipocalcemia) inducen un aumento en la expresión de

la hormona paratiroidea (PTH), y ésta a su vez, induce la transcripción de la enzima CYP27B1 en las células tubulares proximales del riñón, y por ende incrementa la producción de calcitriol [62]. Para regular su propia síntesis, el calcitriol suprime la producción de PTH y estimula la expresión de la CYP24A1, enzima que previamente estaba inhibida por los bajos niveles de calcio y de la PTH. La inducción de la CYP24A1 resulta en la autorregulación de los niveles del calcio cuando estos se encuentran altos (hipercalcemia) [62]. Además de la PTH, otras hormonas ejercen regulación endocrina sobre la actividad de la CYP27B1, como son los estrógenos, la calcitonina, la PRL, la hormona de crecimiento y la insulina [61].

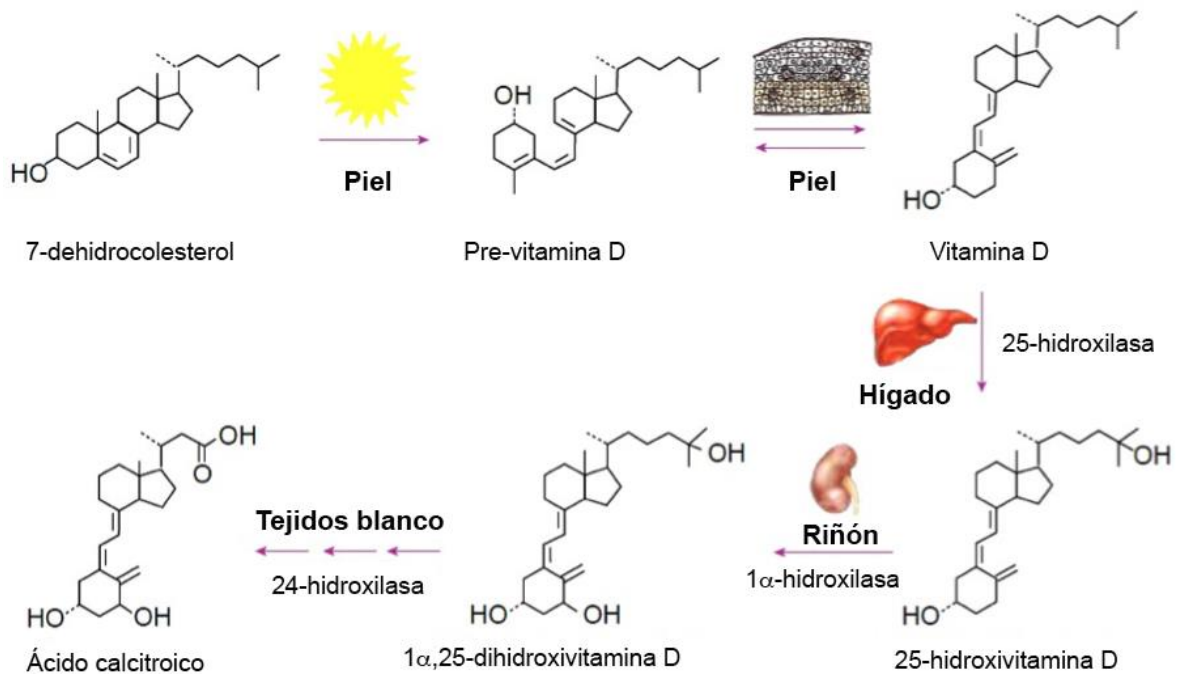


Figura 4. Síntesis y metabolismo de la vitamina D. Durante la exposición a la luz ultravioleta B, el 7-dehidrocolesterol que se encuentra en la piel es convertido a pre-vitamina D, y éste a su vez, es inmediatamente convertido a vitamina D por un proceso dependiente de calor. La vitamina D es luego transportada al hígado unida a la DBP, donde es convertida a 25-hidroxivitamina D, el metabolito que circula en mayor cantidad. La etapa de activación final, la 1 α -hidroxilación ocurre principalmente, pero no exclusivamente, en el riñón donde se forma 1 α ,25-dihidroxivitamina D, la forma activa de la vitamina D. El catabolismo se lleva a cabo por una enzima, la 24-hidroxilasa, la cual cataliza una serie de etapas de oxidación que tienen como resultado la escisión de una cadena lateral. Tomado y modificado de Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Am J Physiol Renal Physiol 2005; 289: F8-28.

3.2 Mecanismos de acción de la vitamina D

3.2.1 Acciones genómicas

La actividad biológica del calcitriol, el metabolito más activo de la vitamina D, es mediada a través de su receptor a vitamina D (VDR). Este pertenece a la superfamilia de receptores nucleares de hormonas esteroides, el cual actúa como un factor de transcripción activado por ligando [68]. La unión del calcitriol al VDR induce cambios conformacionales en el receptor que permiten la heterodimerización con el receptor retinoide X (RXR) [69]. El complejo calcitriol/VDR/RXR reconoce a los elementos de respuesta a vitamina D (VDREs) en la región promotora de genes blanco [70]. La unión del complejo con los VDREs activa el reclutamiento de proteínas coreguladoras que modulan la transcripción de genes (Figura 5) [71].

3.2.2 Acciones no genómicas

Las acciones no genómicas mediadas por el calcitriol son acciones rápidas y no involucra la transcripción de genes. Estos efectos son mediados por un VDR membranaral [72]. La unión del calcitriol a este receptor resulta en la activación de numerosas cascadas de señalización que están relacionadas con la rápida absorción intestinal del calcio (Ca^{2+}) [73]. La activación de la proteína cinasa C (PKC) resulta en la apertura rápida de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje y en el incremento del Ca^{2+} intracelular, gracias al estímulo de los VDR de membrana [74]. El incremento del calcio intracelular regula vías de señalización como la MAPK y éstas pueden regular la activación del VDR a través de la fosforilación del receptor [75]. Por lo tanto, la vía no genómica del VDR puede cooperar con la vía genómica en la regulación génica (Figura 5) [76].

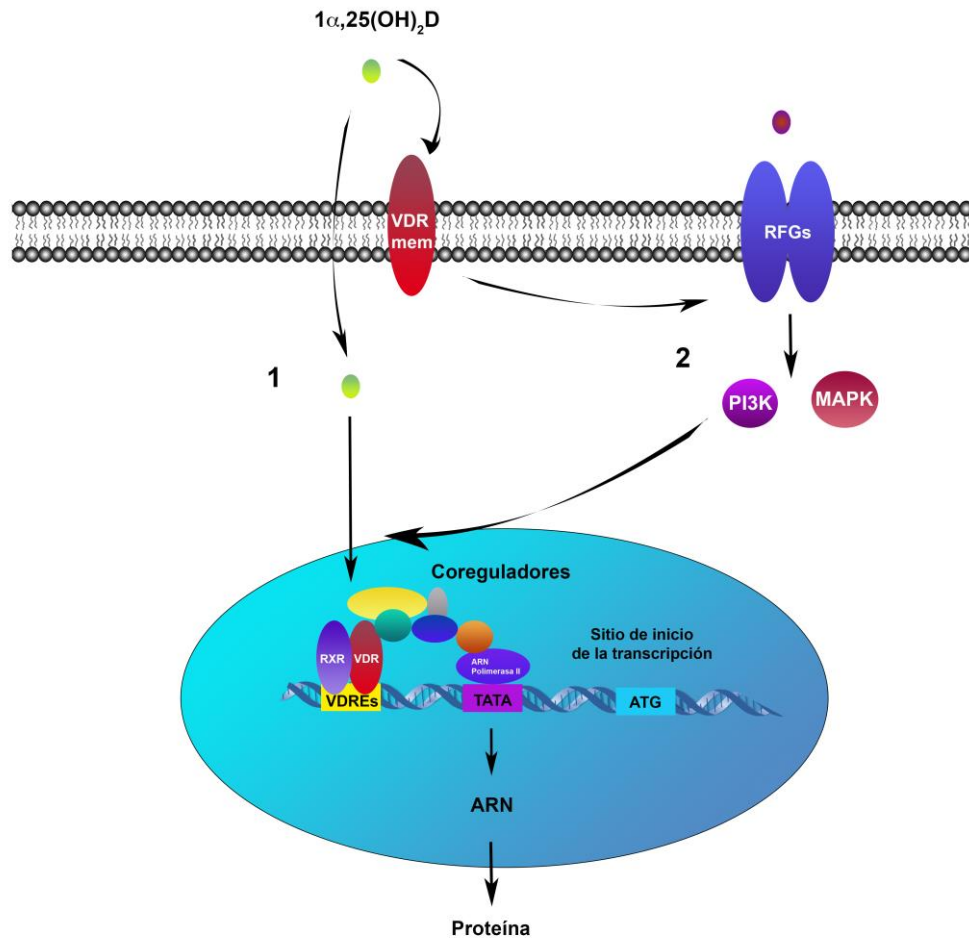


Figura 5. Mecanismos de acción del VDR. Vía genómica **(1)**. Unión del calcitriol con el receptor a vitamina D (VDR), cambio conformacional de este receptor y heterodimerización con el receptor a retinoide X (RXR). Reclutamiento de las proteínas coreguladoras y regulación de la transcripción génica. Vía no genómica **(2)**. Unión del calcitriol con un VDR membranal e interacción con los receptores a factores de crecimiento (RFGs) y activación de la PI3K y MAPK.

3.3. Efectos de la Vitamina D en el cáncer de mama

En el cáncer de mama el calcitriol vía el VDR tiene actividad antiproliferativa a través de varios mecanismos que incluyen: detención del ciclo celular, inducción de la apoptosis, e induce cambios en el fenotipo celular y en la expresión de genes (diferenciación) [77-79]. Estudios epidemiológicos han demostrado una

asociación entre los bajos niveles de vitamina D y un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama. Los pacientes con tumores de mama VDR-positivos tienen una supervivencia libre de la enfermedad significativamente mayor que aquellos con tumores VDR-negativos [80]. La progresión del cáncer de mama y la incidencia de tumores RE-negativos y triple negativos están asociados con bajos niveles de calcitriol [81-83]. De hecho, los ratones con silenciamiento para el VDR han demostrado ser más propensos a desarrollar tumores de mama RE- y RP-negativos comparado con los tipo silvestres [83].

También se ha descrito, que la actividad antiproliferativa del calcitriol en las células de cáncer de mama es llevada a cabo por regular a la baja al RE e interrumpir la vía de señalización dependiente de estrógenos que estimula la proliferación celular [84-86]. No obstante, el calcitriol también ha inhibido la proliferación de las células RE-negativas, lo que sugiere que la inhibición del crecimiento celular inducida por el calcitriol no está mediada únicamente a través del RE [77]. A este respecto, estudios de regulación del RE α en varias líneas celulares de cáncer de mama humano mostraron que el tratamiento de calcitriol no modifica o disminuye la expresión del RE. Mientras que, por el contrario, en una línea celular de cáncer de mama RE-negativa, el calcitriol incrementó la unión del estradiol a una proteína de unión a estrógenos [84-87].

Con la finalidad de conocer la participación del calcitriol sobre la regulación del RE α , el objetivo del presente trabajo fue investigar si esta hormona induce la expresión del RE α funcional, y por lo tanto, si puede restaurar los efectos antiproliferativos de los antiestrógenos en las células de cáncer de mama RE-negativo.

JUSTIFICACIÓN

El RE α es un importante marcador pronóstico del cáncer de mama y un factor predictivo de la respuesta a la terapia endocrina. Aunque la mayoría de los cánceres de mama primarios son RE α -positivos, alrededor de un tercio de estos tumores carecen del RE α en el momento del diagnóstico. Además, una fracción de los cánceres de mama que son inicialmente RE α -positivos pueden llegar a perder la expresión del receptor durante la progresión tumoral. Por otra parte, el calcitriol tiene efectos antiproliferativos y pro-diferenciantes en las células de cáncer de mama RE α -negativo. El hecho de que esta hormona pueda inducir cambios en el fenotipo celular por expresar proteínas relacionadas con formas menos agresivas y de buen pronóstico, hace importante el estudiar el efecto del calcitriol sobre la expresión del RE α en células de cáncer de mama RE-negativas. La posible inducción del RE α por medio del calcitriol, abre la posibilidad no solo de mejorar el pronóstico de vida, sino también de sensibilizar a las células a la terapia endocrina.

HIPÓTESIS

El calcitriol inhibe la vía de señalización de la MAPK lo que resultará en la expresión del RE α y en la sensibilización a la terapia hormonal en células de cáncer de mama con fenotipo RE-negativo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la inducción de los receptores de estrógenos por calcitriol en células de cáncer de mama con fenotipo RE-negativo con la finalidad de restaurar la respuesta a la terapia hormonal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener cultivos primarios a partir de biopsias obtenidas de pacientes con tumores de mama RE-negativos.
- Determinar la expresión del RE α y del VDR en las células de cáncer de mama.
- Evaluar si el calcitriol induce la expresión del RE α funcional en las células de cáncer de mama RE-negativas.
- Analizar si la inducción del RE α por el calcitriol restaura la respuesta a los antiestrógenos en las células de cáncer de mama con fenotipo RE α -negativo.
- Determinar si los antiestrógenos en las células RE α -negativas tratadas con calcitriol regulan la expresión de genes relacionados con la proliferación y progresión tumoral.
- Evaluar si el mecanismo de la inducción del RE α por el calcitriol es a través de regular la actividad de la vía de señalización de la MAPK.
- Investigar la presencia de elementos de respuesta a vitamina D en la región promotora del RE α .

MATERIAL Y METÓDOS

1. Reactivos

El 17β estradiol (E2), el 4-hidroxitamoxifeno y el calcipotriol (MC 903) fueron adquiridos de Sigma (St. Louis, MO, E.U.). Los medios de cultivo celular se obtuvieron de Life Technologies (Grand Island, NY, E.U.). El suero bovino fetal (FBS) fue comprado de Hyclone Laboratories Inc. (Logan, UT, E.U.) y el antiestrógeno ICI-182, 780 (fulvestrant) de Zeneca Pharmaceuticals (Wilmington, DE, E.U.). El Gefitinib (Iressa, ZD1839) fue proporcionado amablemente por AstraZeneca (Wilmington, DE, E.U.). El U0126 fue adquirido de Millipore (Billerica, MA, E.U.). El Trizol y los oligonucleótidos para la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) fueron obtenidos de Invitrogen (Carlsbad, CA, E.U.). La reacción TaqMan Master, las sondas, los tubos capilares, el sistema de transcripción inversa (RT) y el ensayo de proliferación celular (XTT) fueron comprados a Roche Applied Science (Indianapolis, IN, E.U.). El extracto nuclear de MCF-7 se adquirió de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Paso Robles, CA E.U.). El antagonista del VDR (23S)-25-dehidro-1-hidroxivitamina D3-26,23-lactona (TEI-9647) y $1\alpha,25$ -dihidroxicolecalciferol (calcitriol) fueron amablemente donados por Teijin Pharma Limited (Tokyo, Japón) y Hoffmann-La Roche Ltd. (Basilea, Suiza), respectivamente.

2. Tejidos humanos y líneas celulares

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (No. REF 1967, 2009). Las biopsias de las pacientes con tumores de mama RE-negativo fueron obtenidas por los médicos especializados del Instituto, con previa firma de carta de consentimiento informado por parte de la paciente involucrada. El tejido tumoral fue cortado en pequeños

fragmentos en un ambiente estéril. Estos pequeños pedazos (explantes) fueron lavados con el tampón fosfato salino (PBS), y posteriormente, fueron distribuidos en todo el frasco de cultivo celular con medio. Después de algunos días, poblaciones mixtas de células se derivaron a partir de los explantes [88, 89]. Un total de 5 cultivos independientes de tumores de mama RE-negativo fueron utilizadas para este estudio. Las líneas celulares establecidas de cáncer de mama RE-negativo; SUM-229PE y RE-positivo; BT-474 y MCF-7 fueron adquiridas de Asterand (San Francisco, CA, E.U.) y ATCC (Manassas, VA, E.U.), respectivamente.

3. Criterios de selección de la biopsia

Criterios de inclusión: Paciente femenina con diagnóstico histológico de carcinoma ductal o lobulillar, con tumores VDR-positivos, RE-negativos, receptor de progesterona (RP)-positivos o negativos y HER-2-positivos o negativos.

Criterios de exclusión: Pacientes con antecedentes de radio o quimioterapia.

Criterios de eliminación: Tejidos dañados por contaminación con microorganismo como hongos y bacterias.

4. Cultivos celulares

Las células derivadas de los tumores mamarios RE-negativos se cultivaron en medio DMEM-HG suplementado con 5% de FBS inactivado, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y se incubaron en 5% de CO₂ a 37°C. Después de alcanzar una confluencia del 70%, rondas de tripsinización (tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.25%) fueron realizadas para obtener los subcultivos. El medio de cultivo se cambió cada 3 días. Aproximadamente después de 8 pasajes las células fueron caracterizadas mediante el análisis de la expresión del RE α y del VDR por western blot e inmunocitoquímica. La línea celular SUM-229PE se cultivó en medio Ham's F-12 suplementado con 5% de

FBS inactivado, 5 µg/ml de insulina, 1 µg/ml de hidrocortisona, 1 M de HEPES y 1% de antibiótico-antimicótico. La línea BT-474 fue sembrada en medio Hybri-Care ATCC 46X suplementado con 10% de FBS inactivado, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. La MCF-7 se cultivó en medio DMEM-HG suplementado con 5% de FBS inactivado, 50 µg/ml de E2, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Todas las líneas celulares establecidas se incubaron en 5% de CO₂ a 37°C. Los procedimientos experimentales se realizaron en medio DMEM-F12 suplementado con 5% de FBS inactivado y tratado con carbón-dextrán, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

5. Inmunocitoquímica

Las células cultivadas se sembraron a una densidad de 25000-75000 células/cubreobjeto, y se fijaron con etanol al 96%. La recuperación antigénica se realizó mediante la incubación con el amortiguador EDTA 1X (Biocare Medical, CA, E.U.) durante 10 min a 330°C y fueron bloqueadas con H₂O₂ al 0.3% e incubadas en la presencia de los siguientes anticuerpos por aproximadamente 1 h: RE α (1:250, Bio SB) [90] y VDR (1:100, Santa Cruz de Biotecnología Inc, CA, E.U.) [91]. Después de dos lavados con PBS, las células se incubaron secuencialmente con *Immuno Detector Biotin Link* e *Immuno Detector HRP* (BioSB) durante 10 min cada uno. La tinción fue completada con DAB (3,3'diaminobencidina) al 0.1% en Tris-HCl conteniendo 0.04% de H₂O₂.

6. Western blot

Las células se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de calcitriol (1x10⁻⁸M y 1x10⁻⁷M), inhibidores de MAPK (U0126; 10 µM, gefitinib; 0.8 µM) o el vehículo durante 4 y 72 h. Posteriormente, se obtuvieron los lisados de las proteínas de las células usando un amortiguador de lisis (50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 1 % Nonidet P-40, 15 mM NaF y 1 mM Na₃VO₄, pH 7.5) en

presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas Complete de Roche (inhibidores de serín proteasas, metaloproteasas y cisteín proteasas). La concentración de las proteínas se determinó utilizando el estuche Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, Hercules, CA, E.U.). Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida (10% SDS-PAGE) bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) mediante electroforesis. Las membranas se bloquearon con 5% de leche descremada en Tris amortiguador salino con Tween (TBST) y se incubaron durante la noche a 4 °C en la presencia de los siguientes anticuerpos: ratón anti-RE α (1:200, Santa Cruz) [92], conejo anti-MAPK-p (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, E.U.) [93], después, se lavaron con TBST y se incubaron con el anticuerpo secundario cabra anti-ratón o anti-conejo (1:2000, Santa Cruz) conjugados con la peroxidasa de rábano (HRP), respectivamente. Para la visualización, las membranas se procesaron con el sustrato BM chemiluminescence blotting substrate (Roche Applied Science). La normalización se llevo a cabo tratando a las membranas con un amortiguador para remover los anticuerpos unidos (2 % peso/volumen de SDS, Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, 100 mM de 2-mercapto-etanol) durante 30 min a 50 °C. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo ratón anti-GAPDH (1:10000, Millipore) [94] y después con el secundario cabra anti-ratón conjugado con HRP (1:10000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, E.U.). El análisis densitométrico de las bandas resultantes se realizó utilizando el software ImageJ (NIH, E.U.).

7. Proliferación celular

Para determinar el efecto del calcitriol sobre la proliferación de las células de cáncer de mama RE-negativas, así como también, el efecto del tratamiento combinado de los antiestrógenos con el calcitriol se realizaron las siguientes estrategias experimentales. Las células se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 96 pozos a una densidad de 500-1000 células/pozo por sextuplicado.

Después, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de calcitriol (1×10^{-11} M – 1×10^{-6} M) durante 6 días. En otro ensayo las células fueron incubadas en presencia o ausencia de calcitriol (1×10^{-8} M) durante 48 h. Posteriormente, el medio de cultivo fue retirado y luego fueron incubadas con E2 (1×10^{-8} M), E2 con tamoxifeno (1×10^{-6} M), E2 con ICI-182, 780 (1×10^{-6} M), tamoxifeno (1×10^{-6} M) e ICI-182, 780 (1×10^{-6} M) en presencia o ausencia de calcitriol. Las placas se incubaron a 37 °C durante 6 días y la viabilidad celular fue determinada. La proliferación celular fue medida mediante el estuche de ensayo colorimétrico XTT de Roche. Después de 4 h de incubación, la absorbancia a 492 nm se midió en un lector de microplacas (BioTek, Winooski, VT, E.U.). Los valores de concentración inhibitoria (CI_{50}) se obtuvieron por medio del análisis de la regresión no lineal de la curva dosis-respuesta utilizando el programa SigmaPlot, Jandel Scientific.

8. PCR en tiempo real

Las líneas celulares y las células derivadas de los tumores mamarios se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de calcitriol o del vehículo (0,1 % de etanol) durante 24 h y se determinó la expresión génica del $RE\alpha$, y la participación del VDR sobre la expresión de dicho receptor, utilizando el antagonista del VDR, el TEI-9647 (1×10^{-6} M). Los análisis de expresión génica de *PRL*, *CCND1* y de *EAG1* se realizaron con la finalidad determinar la funcionalidad del $RE\alpha$ expresado y el efecto del antiestrógeno ICI-182, 780. Para esto, las células de mama RE-negativas fueron tratadas con o sin calcitriol (1×10^{-8} M) durante 48 h, posteriormente, el medio se retiró y las células fueron incubadas con E2 (1×10^{-8} M) o ICI-182, 780 (1×10^{-6} M) en presencia o ausencia de calcitriol durante 24 h más. Después, el ARN se extrajo con el reactivo Trizol y se utilizó para la síntesis de ADN complementario (ADNc) usando el sistema de transcriptasa reversa (RT) y oligo-dT. La PCR en tiempo real (qPCR) se llevó a cabo con el equipo de Roche LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), de acuerdo con el siguiente protocolo: la activación de Taq ADN

polimerasa y desnaturalización del ADN a 95 °C durante 10 min por 45 ciclos de amplificación de 10 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 1 s a 72 °C. Los iniciadores específicos para cada gen se diseñaron tomando como base la información del banco de genes: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&itool=toolbar>) y un programa en red de diseño de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis (<https://qpcr2.probefinder.com/organism.jsp>). Los oligonucleótidos fueron los siguientes: *RE α -F*, CCTTCTTCAAGAGAAGTATTCAAGG; *RE α -R*, GTTTTTATCAATGGTGCCTGG; *EAG1-F*, CCTGGAGGTGATCCAAGATG; *EAG1-R*, CCAAACACGTCTCCTTTTCC; *CCND1-F*, GAAGATCGTCGCCACCTG; *CCND1-R*, GACCTCCTCCTCGCACTTCT; *PRL-F*, AAAGGATCGCCATGGAAAG; *PRL-R*, GCACAGGAGCAGGTTTGAC. La expresión génica del gen de la deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH) *GAPDH-F*, AGCCACATCGCTGAGACAC; *GAPDH-R*, GCCCAATACGACCAAATCC fue usada como control interno. Los valores de concentración estimuladora (CE₅₀) se obtuvieron por medio del análisis de la regresión no lineal de la curva dosis-respuesta utilizando el programa SigmaPlot, Jandel Scientific.

9. Análisis *in silico* para identificar elementos de respuesta a vitamina D en el promotor del RE α

La secuencia derivada del cromosoma humano 6, que contiene la región promotora del RE α , fue obtenida de la base de datos del UCSC Genome Browser [95, 96]. El programa MatInspector [97] fue utilizado para identificar posibles elementos de respuesta a vitamina D en la región promotora del RE α . Estos están compuestos por dos hexanucleótidos repetidos separados internamente por un número variable de nucleótidos (Ejemplo, GGTCCA-NNN-GGTCCA, donde N es cualquier nucleótido; este en particular es nombrado como DR3).

10. Análisis estadísticos

Los datos se expresan como la media \pm la desviación estándar (D.E.). Los análisis estadísticos se determinaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y todas las comparaciones múltiples por el método de Holm-Sidak, utilizando un paquete de software especializado (SigmaStat, Jandel Scientific). Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

1. Caracterización de las células de cáncer de mama

Las biopsias de pacientes con diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal invasivo (CDI) o carcinoma ductal *in situ* (CDIS) con fenotipo RE-negativo y un grado histopronóstico entre 5-9 de acuerdo al sistema de diagnóstico Scarff–Bloom–Richardson (SBR) fueron obtenidas y utilizadas para el cultivo celular. Aproximadamente dos semanas después del cultivo de células primarias, múltiples focos de poblaciones heterogéneas de células se observaron alrededor de los explantes, y fueron positivas para los marcadores de CK 7 y vimentina (datos no mostrados), lo cual indica una población celular heterogénea. Las células se dejaron crecer y después del pase 8, fueron caracterizadas por inmunocitoquímica para el RE α y el VDR. Las células derivadas de los tumores mamarios que se utilizaron para este estudio fueron las que presentaron positividad para VDR y negatividad para RE α (tabla 1). En la figura 6 se muestra una imagen representativa de la tinción del RE α y del VDR. Las células derivadas de los tumores mamarios y la línea celular establecida SUM-229PE no mostraron inmunoreactividad para el RE α , la línea celular BT-474 fue usada como control positivo de la presencia de este receptor. Todas las células tumorales mamarias mostraron señal para el VDR.

Tabla 1- Caracterización de las biopsias

Número de identificación	Diagnóstico histopatológico	Inmunocitoquímica	
		RE α	VDR
1	CDI (SBR 9)	-	+
2	CDI (SBR 8)	-	+
3	CDI (SBR 8)	-	+
4	CDI (ND)	-	+
5	CDI (SBR 5)	-	+

Abreviaciones: CDI: carcinoma ductal invasivo; RE α : receptor de estrógenos alfa; VDR: receptor de vitamina D; SBR: sistema de diagnóstico Scarff–Bloom–Richardson, ND: no determinado.

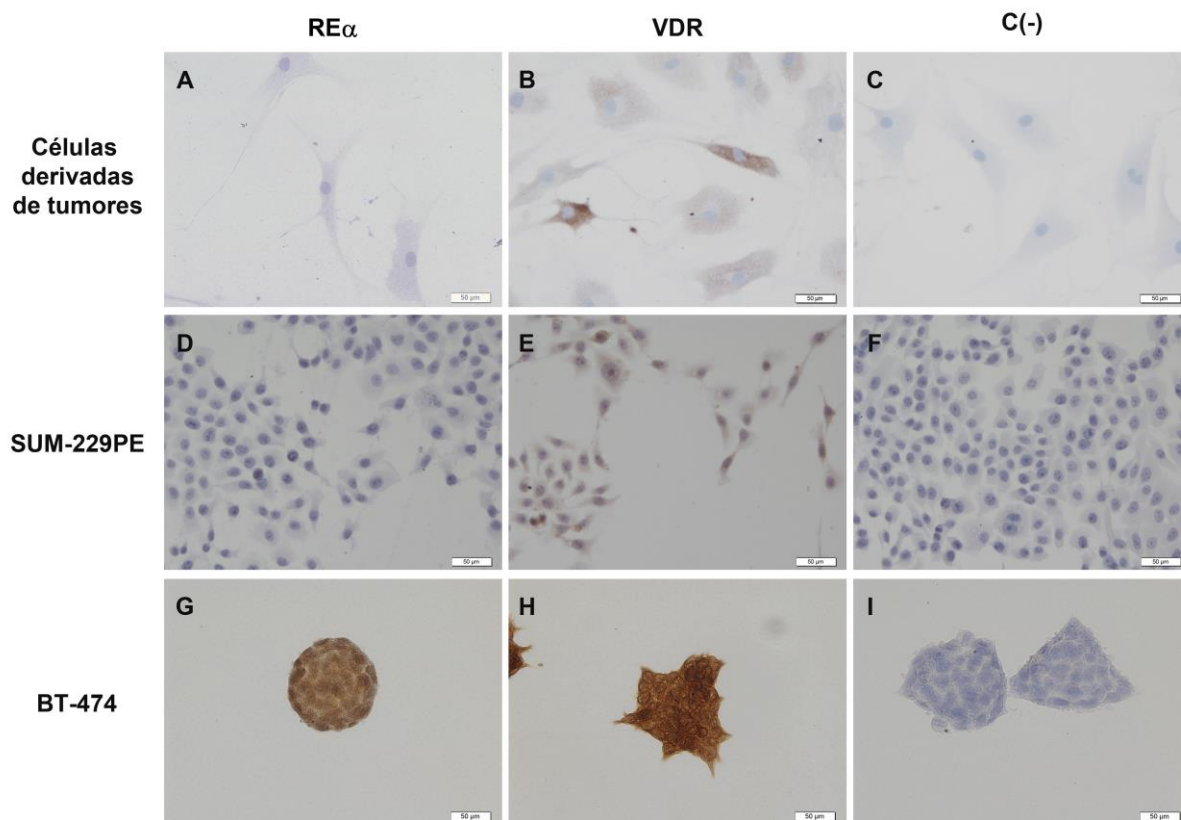


Figura 6. Imágenes representativas de las células derivadas de los tumores (A-C), SUM-229PE (D-F) y BT-474 (G-I). Las células derivadas de los tumores mamarios (A) y la SUM-229PE (D) fueron negativas para RE α , mientras que BT-474 fue positiva (G). Todas las células presentaron tinción para VDR (B, E y H) en regiones citoplasmáticas, nucleares y perinuclear (marrón). Los controles negativos se llevaron a cabo en ausencia del anticuerpo primario para cada línea celular (C, F e I). Las imágenes representativas se muestran en aumento de 20X.

2. Las células de tumores mamario RE-negativo son sensibles a los efectos del calcitriol

Para determinar el efecto del calcitriol sobre la proliferación celular, las células derivadas de los tumores mamarios RE-negativos y las células SUM-229PE fueron incubadas con concentraciones crecientes de calcitriol (1×10^{-11} M – 1×10^{-6} M) durante 6 días. En las figuras 7A y C se muestra que en las células derivadas de los tumores mamarios así como la línea celular SUM-229PE, el calcitriol disminuyó el crecimiento de manera dependiente de la concentración con una CI_{50} de 4.303×10^{-10} M y 2.253×10^{-10} M, respectivamente. Además, con la finalidad de comprobar la funcionalidad del modelo, la expresión de la *CYP24A1*, un gen altamente inducido por esta hormona fue determinada. En las figuras 7B y D se observa que el calcitriol incrementó la expresión de la *CYP24A1* de manera dependiente de la concentración, tanto en las células derivadas de los tumores de mama RE-negativos como en la línea celular SUM-229PE con una CE_{50} de 3.456×10^{-9} M y 1.159×10^{-8} M, para cada tipo celular.

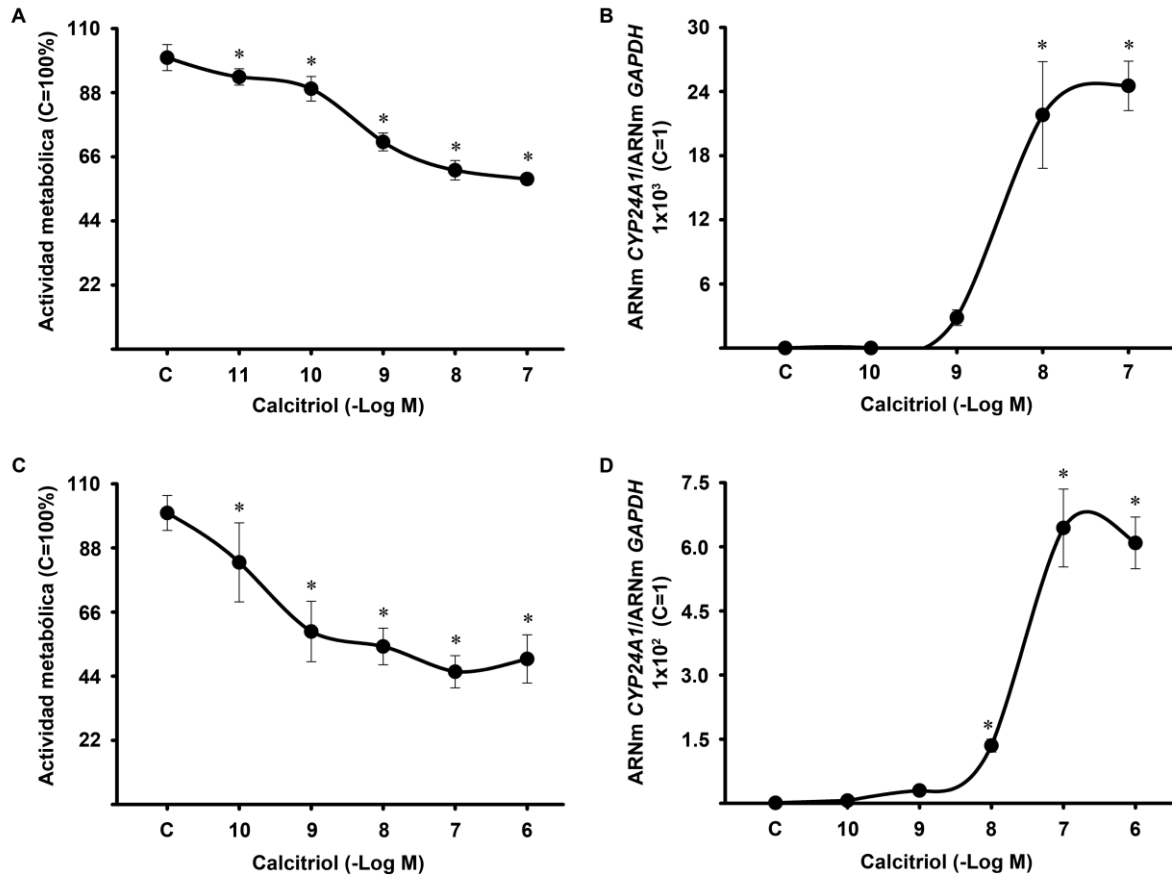


Figura 7. Las células de cáncer de mama RE-negativo son sensibles a los efectos del calcitriol. A y B) Las células derivadas de tumores de mama RE-negativo y, **C y D)** las células SUM-229PE fueron incubadas con concentraciones crecientes de calcitriol (abarcado desde 1×10^{-11} M – 1×10^{-6} M) durante 6 días para determinar el crecimiento celular y durante 24 h para analizar la expresión génica de la *CYP24A1*. Los ensayos de crecimiento celular fueron llevados a cabo por el método colorimétrico de XTT. Los valores representan la media \pm D.E. Los datos se normalizaron otorgando el 100% de la actividad metabólica a las células tratadas con vehículo (C). Los resultados son representativos de dos experimentos independientes realizados por sextuplicados $*P \leq 0.05$ vs C. Análisis de la expresión génica de la *CYP24A1* fueron llevados a cabo por el método de qPCR. Los resultados de 3 experimentos se expresan como la media \pm D.E. de la razón de la expresión relativa del *CYP24A1* versus el gen constitutivo *GAPDH*. Los datos se normalizaron a 1 para las células tratadas con vehículo (C), $*P \leq 0.05$ vs C.

3. El calcitriol incrementó la expresión $RE\alpha$ a través de un mecanismo dependiente del VDR en las células de cáncer de mama RE-negativo

Las células de cáncer de mama RE-negativo se incubaron en presencia de calcitriol (1×10^{-7} M) durante 24 h y la expresión génica del $RE\alpha$ se evaluó por qPCR. En la figura 8A se muestra que el calcitriol incrementó significativamente, con respecto a su control, la expresión del ARNm del $RE\alpha$ en las células derivadas de los diferentes tumores y en la línea celular SUM-229PE. Por el contrario, en las células BT-474 el calcitriol reguló a la baja los niveles de ARNm del $RE\alpha$, como ha sido reportado previamente en otros estudios [98].

La CE_{50} del tratamiento con calcitriol y la participación de VDR se evaluó en las células derivadas de los tumores de mama $RE\alpha$ -negativo. En la figura 8B se muestra que el calcitriol aumentó significativamente el ARNm del $RE\alpha$ de una manera dependiente de la concentración con una CE_{50} de 9.8×10^{-9} M. Este efecto fue mediado específicamente a través del VDR, ya que el antagonista del VDR, el TEI-9647, suprimió significativamente el efecto estimulador del calcitriol sobre la expresión del $RE\alpha$. La presencia del antagonista del VDR por sí solo no modificó la expresión del $RE\alpha$ (Figura 8C).

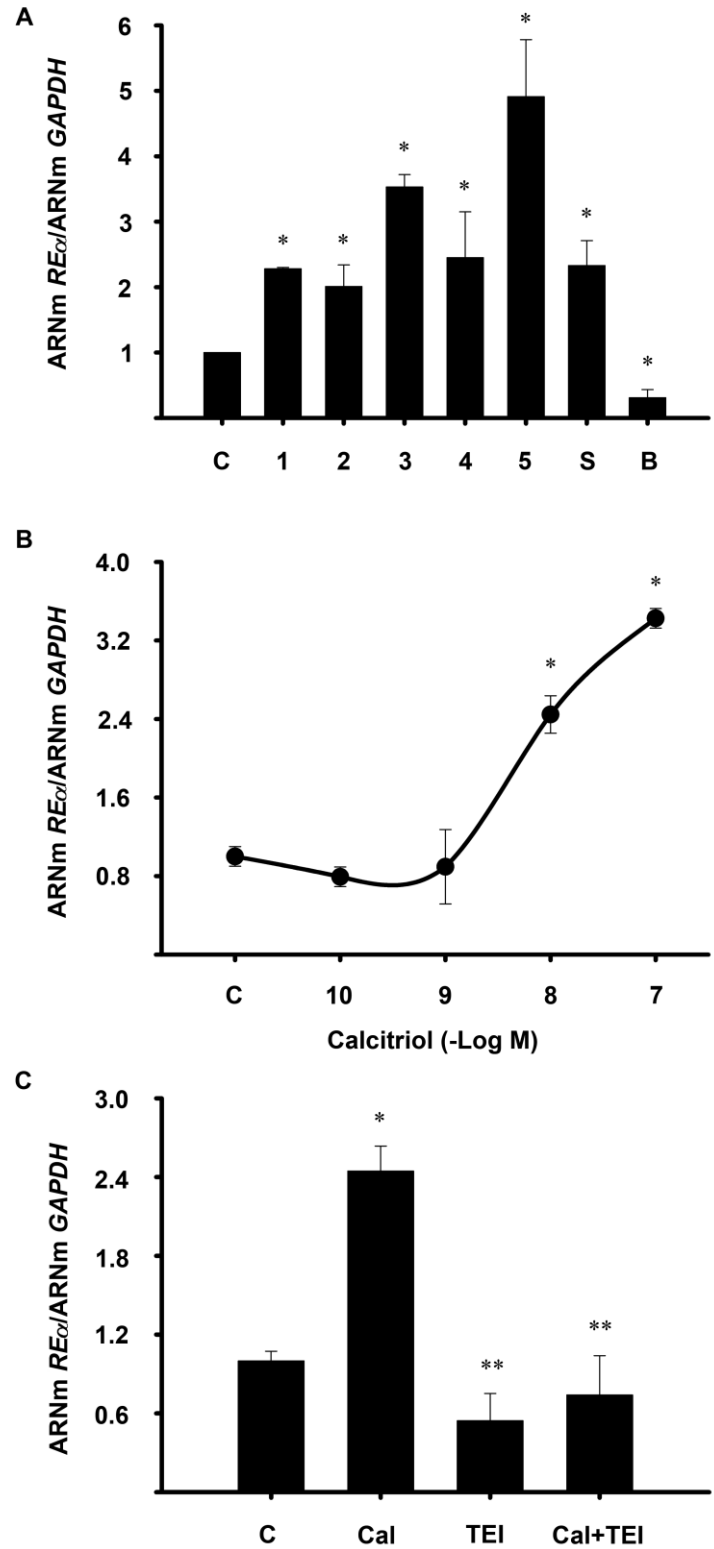


Figura 8. El calcitriol incrementó la expresión del ARNm del RE_{α} vía VDR en las células de cáncer de mama RE_{α} -negativas. A) Células derivadas de tumores mamarios de cinco pacientes

con cáncer de mama RE α -negativo (1-5), la línea celular SUM-229PE (S) RE α -negativa y la línea celular BT-474 (B) RE α -positiva se incubaron con calcitriol (1×10^{-7} M) o su vehículo (C, etanol) durante 24 h. Posteriormente, se extrajo el ARNm y se realizó el análisis de la expresión del RE α por qPCR. **B)** Las células derivadas de tumores de mama fueron tratadas con concentraciones crecientes de calcitriol (1×10^{-10} M y 1×10^{-7} M) durante 24 h. **C)** Las células se incubaron en ausencia (C) o presencia de calcitriol (Cal, 1×10^{-8} M), con o sin el antagonista del VDR (TEI, 1×10^{-6} M). Las graficas **B** y **C** son representativas de dos experimentos independientes por triplicado de dos cultivos celulares de tumores de mama RE α -negativo diferentes. Los resultados se muestran como la media \pm D.E del índice normalizado de RE α /GAPDH. Los datos muestran un valor de 1 para las células tratadas con vehículo (C), * $P \leq 0.05$ vs C ** $P \leq 0.05$ vs calcitriol solo.

4. El calcitriol induce la expresión de la proteína del RE α en células de cáncer de mama RE α -negativas

Las células SUM-229PE se incubaron con calcitriol y se evaluó la expresión proteica del RE α por western blot. La figura 9A muestra los resultados de las células incubadas con calcitriol a una concentración 1×10^{-7} M durante 4 h. La presencia de una banda de 66 kDa correspondiente al RE α fue observada en las células tratadas con calcitriol, a juzgar por la presencia del RE α en las células MCF-7, el cual fue utilizado como control positivo. La inhibición de la actividad de la MAPK con el U0126 o el gefitinib indujo la expresión del RE α , como ha sido previamente reportado [55], estos inhibidores de la MAPK fueron empleados como controles de la expresión del RE α . La inducción del receptor fue también observada a las 72 h de tratamiento con dos concentraciones de calcitriol (1×10^{-8} y 1×10^{-7} M). Además, un aumento en la intensidad relativa de la banda fue apreciado con un incremento en la concentración de calcitriol (Figura 9B).

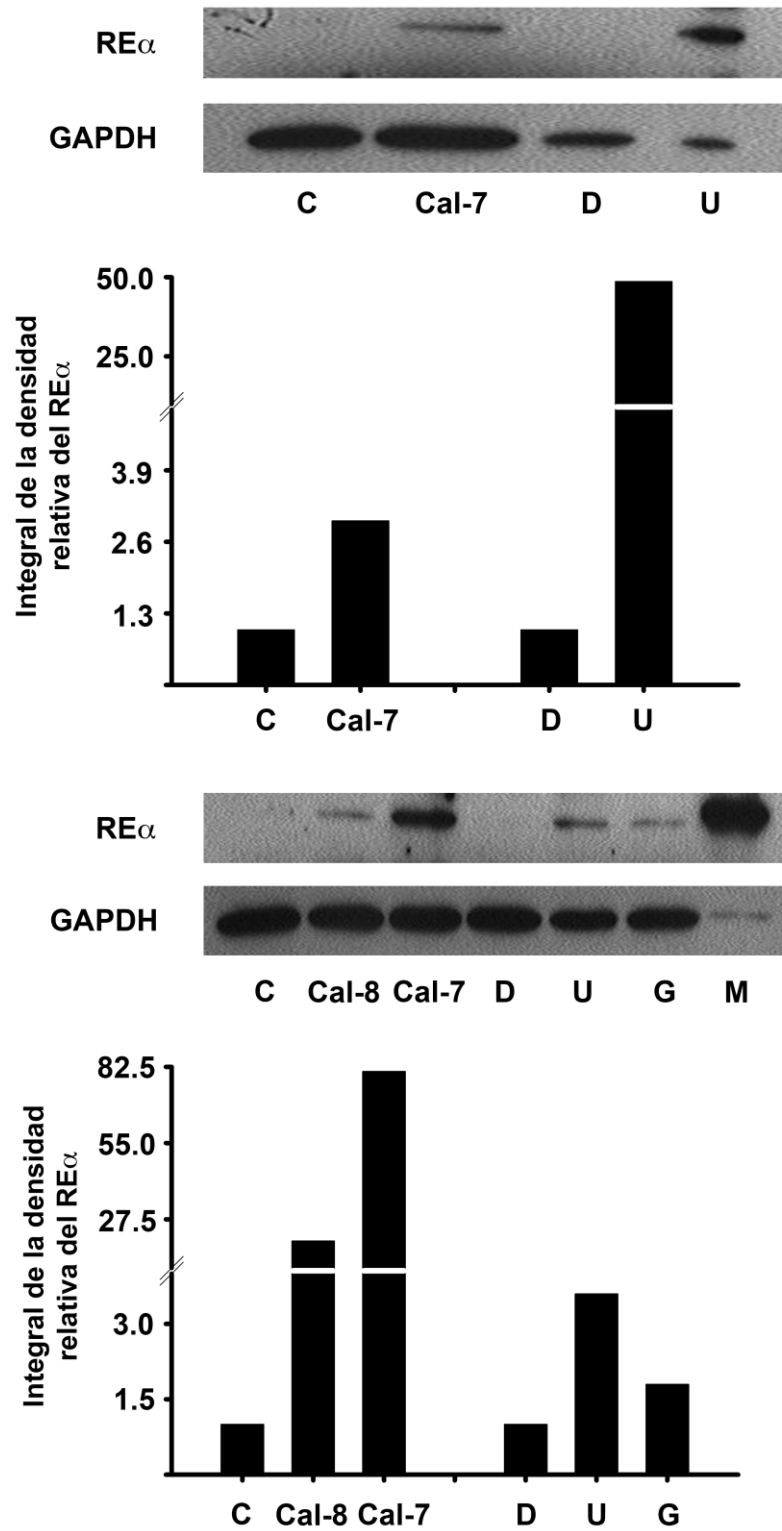


Figura 9. El calcitriol induce la expresión de la proteína del RE α . Células SUM-229PE fueron tratadas con calcitriol (Cal, 1×10^{-8} M y 1×10^{-7} M) durante 4 y 72 h (A y B, respectivamente) y dos

inhibidores de la MAPK: U0126 (U, 10 μ M) o gefitinib (G, 0.8 μ M) utilizados como controles de la inducción del RE α . Las incubaciones se realizaron en la presencia de etanol (C) o DMSO (D), vehículos del calcitriol y de los inhibidores de la MAPK. La expresión de la proteína se estudió con ensayos de western blot. El extracto nuclear de la línea celular MCF-7 (M) se utilizó como control positivo de la presencia del RE α . La GAPDH se utilizó como control de carga. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes y se expresan como la integral de la densidad relativa del RE α versus la GAPDH. El valor arbitrario de 1 se le dio a las células tratadas con C y D.

5. El calcitriol induce la expresión de un RE α funcional en las células de cáncer de mama RE α -negativa.

La funcionalidad del RE α se determinó por analizar la capacidad del receptor para activar la transcripción de *PRL*, un gen inducido por estrógenos [99]. Las células derivadas de los tumores de mama RE α -negativas se incubaron en presencia o ausencia de calcitriol (1×10^{-8} M) durante 48 h y posteriormente se trataron con E2 (1×10^{-8} M) o ICI-182, 780 (1×10^{-6} M) en presencia o ausencia de calcitriol, durante 24 h (Figura 10). En ausencia de calcitriol (barras negras), el E2 y el ICI-182, 780 no modificaron la expresión de *PRL*, sin embargo, en las células tratadas con calcitriol (barras blancas), el E2 incrementó la expresión de *PRL* de manera significativa, mientras que el ICI-182, 780 no cambió la expresión del gen. Los datos sugieren que el incremento en la expresión de *PRL* corresponde a la activación transcripcional llevada a cabo por el receptor y el E2, lo cual indica que el RE α expresado es funcional.

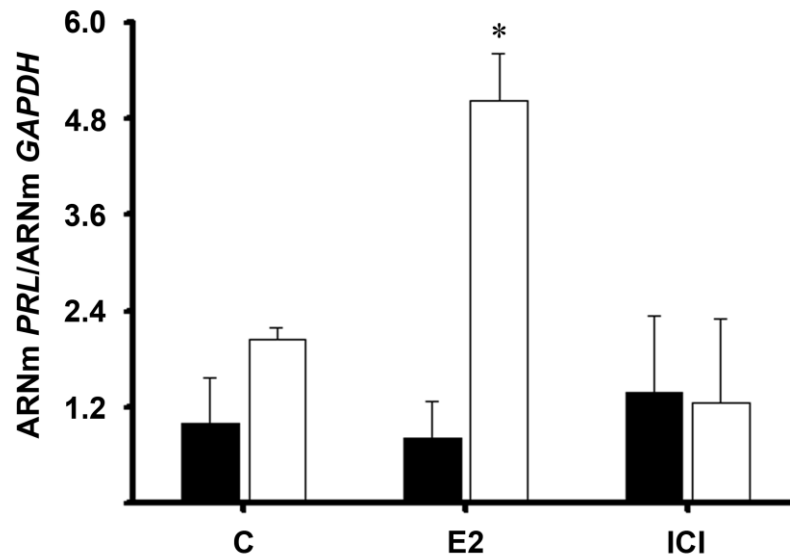


Figura 10. El calcitriol induce un RE α transcripcionalmente activo. Las células derivadas de los tumores de mama RE α -negativos se incubaron en ausencia (barras negras) o presencia de calcitriol 1×10^{-8} M (barras blancas) durante 48 h. Posteriormente, las células fueron coincubadas con o sin calcitriol más estradiol (E2, 1×10^{-8} M), ICI-182, 780 (ICI, 1×10^{-6} M) o vehículo (C) durante 24 h. La expresión del gen de *PRL* se determinó por qPCR. La gráfica es una imagen representativa de un cultivo derivado del tumor de mama RE-negativo. Los resultados se muestran como la media \pm D.E por triplicado del índice de *PRL/GAPDH*. Los datos se normalizaron a 1 para las células tratadas con el vehículo (C), * $P \leq 0.05$ vs C.

6. El calcitriol sensibiliza a las células de cáncer de mama RE α -negativas a los efectos antiproliferativos de los antiestrógenos

La respuesta a los efectos antiproliferativos de los antiestrógenos en las células de cáncer de mama con fenotipo RE α -negativo, a las cuales se les indujo la expresión del RE α por medio del calcitriol, fue determinada mediante ensayos de crecimiento celular. Para esto, las células se incubaron en presencia de calcitriol (1×10^{-8} M) o su vehículo, durante 48 h. Después, fueron coincubadas con o sin calcitriol más el agonista del RE α (E2, 1×10^{-8} M) o los antagonistas del RE α (Tx e ICI, 1×10^{-6} M) o la combinación de los antagonistas más E2, durante 6 días. Los resultados mostraron que en ausencia de calcitriol (barras negras), ninguno de los compuestos probados afectaron el crecimiento celular en las células RE-negativas. El tratamiento con calcitriol (barras blancas) *per se* disminuyó significativamente la proliferación celular comparado con las células no tratadas con la hormona. De manera interesante, en presencia de calcitriol, los antiestrógenos solos y su combinación con E2 inhibieron la proliferación celular en comparación con su control. Este efecto resultó relevante debido a que el calcitriol sensibilizó a las células RE-negativas a los efectos antiproliferativos de los antiestrógenos. El E2 (1×10^{-8} M) no modificó el crecimiento celular en las células tratadas con la hormona (Figura 11A). Además, mayor concentración de E2 (1×10^{-7} M) inhibió la proliferación (Figura 11B). Resultados similares fueron observados en las células SUM-229PE; sin embargo, en estas células el tamoxifeno solo o en combinación con E2 no modificó de manera significativa el crecimiento celular (Figura 11C). Las células MCF-7 fueron usadas como control del efecto antiproliferativo de los antiestrógenos a través del RE α . La figura 11D muestra como en las células no tratadas con calcitriol, el E2 aumentó significativamente el crecimiento celular, mientras que, en las células tratadas con la hormona no se observó este efecto, debido probablemente a la actividad antiproliferativa del calcitriol. Los antiestrógenos y su combinación con E2 inhibieron significativamente el crecimiento celular en ambas células tratadas y no tratadas con calcitriol.

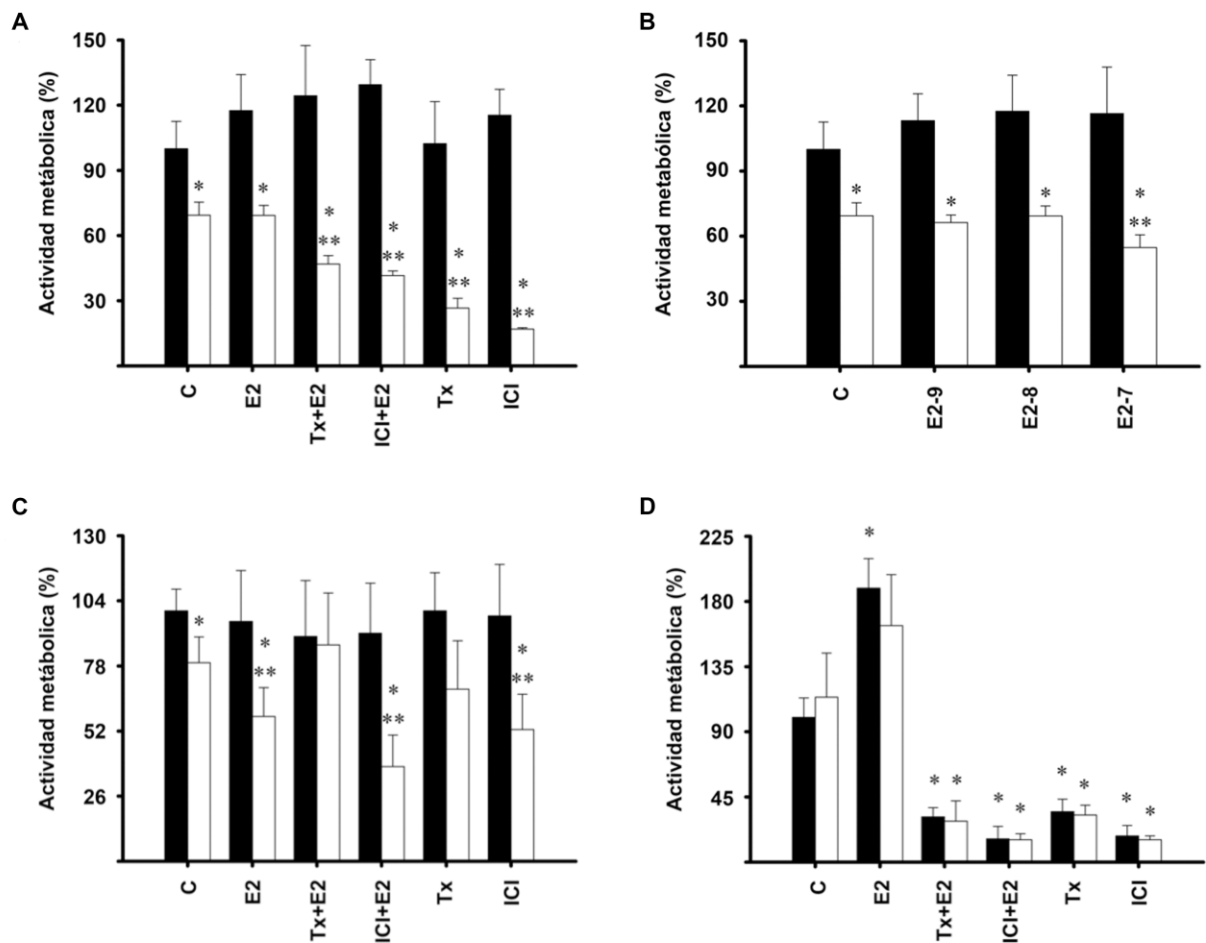


Figura 11. La inducción del RE α por el calcitriol en las células de cáncer de mama RE α -negativo las sensibilizó a los efectos de los antiestrógenos. A) y B) Las células derivadas de los tumores de mama, y las líneas celulares C) SUM-229PE y D) MCF-7 se incubaron en ausencia (barras negras) o la presencia de calcitriol 1×10^{-8} M (barras blancas) durante 48 h. Después, las células se coincubaron con o sin calcitriol más estradiol (E2, 1×10^{-9} M a 1×10^{-7} M) (B) y (E2, 1×10^{-8} M), tamoxifeno (Tx, 1×10^{-6} M), ICI-182, 780 (ICI, 1×10^{-6} M), etanol (C), o la combinación de los antagonistas con E2 durante 6 días (A, C y D). Los ensayos de crecimiento celular se realizaron por el método colorimétrico XTT. Las barras representan la media \pm D.E. Los datos se normalizaron, utilizando la actividad metabólica de las células tratadas con vehículo (C, barra negra) como el 100%. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes realizados en sextuplicado para A, B y C, y de 3 experimentos independientes por sextuplicado para D, * $P \leq 0.05$ vs C (barra negra) y ** $P \leq 0.05$ vs C (barra blanca).

7. El ICI-182, 780 regula a la baja la expresión génica de *CCND1* y *EAG1* en células de cáncer de mama tratadas con calcitriol

El ICI-182, 780 tiene efectos antiproliferativos en las células de cáncer de mama RE-positivas, uno de los mecanismos moleculares por los que los antiestrógenos inhiben la proliferación celular es mediante la disminución de la expresión del gen *CCND1* y el bloqueo de la progresión del ciclo celular a través del RE α [100, 101]. Por lo tanto, en este trabajo se estudiaron los efectos del ICI-182, 780 y del E2 sobre la expresión de *CCND1* en las células derivadas de los tumores de mama RE α -negativas a las que se le indujo la expresión del RE α con el calcitriol. Las células fueron incubadas con o sin la hormona durante 48 h y posteriormente coincubadas con calcitriol más el E2 o el ICI-182, 780 durante 24 h más. La figura 12A muestra como en las células que no fueron tratadas con calcitriol (barras negras), el E2 (1×10^{-8} M) o el ICI-182, 780 (1×10^{-6} M) no cambiaron la expresión del gen de *CCND1*, mientras que, en las células tratadas con la hormona (barras blancas), el ICI-182, 780 reguló a la baja los niveles del ARNm de *CCND1* de manera significativa y el E2 no la modificó.

Otro gen que ha demostrado ser regulado por estrógenos es el canal de potasio *EAG1* [102]. En células de cáncer de mama, la inhibición de la expresión del canal se acompaña de una reducción significativa de la proliferación celular [89, 103]. La regulación de *EAG1* se estudió por ligandos agonistas y antagonistas del RE α como se describió arriba para *CCND1*. Los resultados mostraron (Figura 12B) que el E2 o el ICI-182, 780 no alteraron la expresión génica de *EAG1* en las células no tratadas con calcitriol (barras negras). Sin embargo, en las células tratadas con calcitriol, el antiestrógeno ICI-182, 780 disminuyó significativamente los niveles de ARNm de *EAG1* (barras blancas), mientras que la expresión de este canal no se vio afectada por el E2.

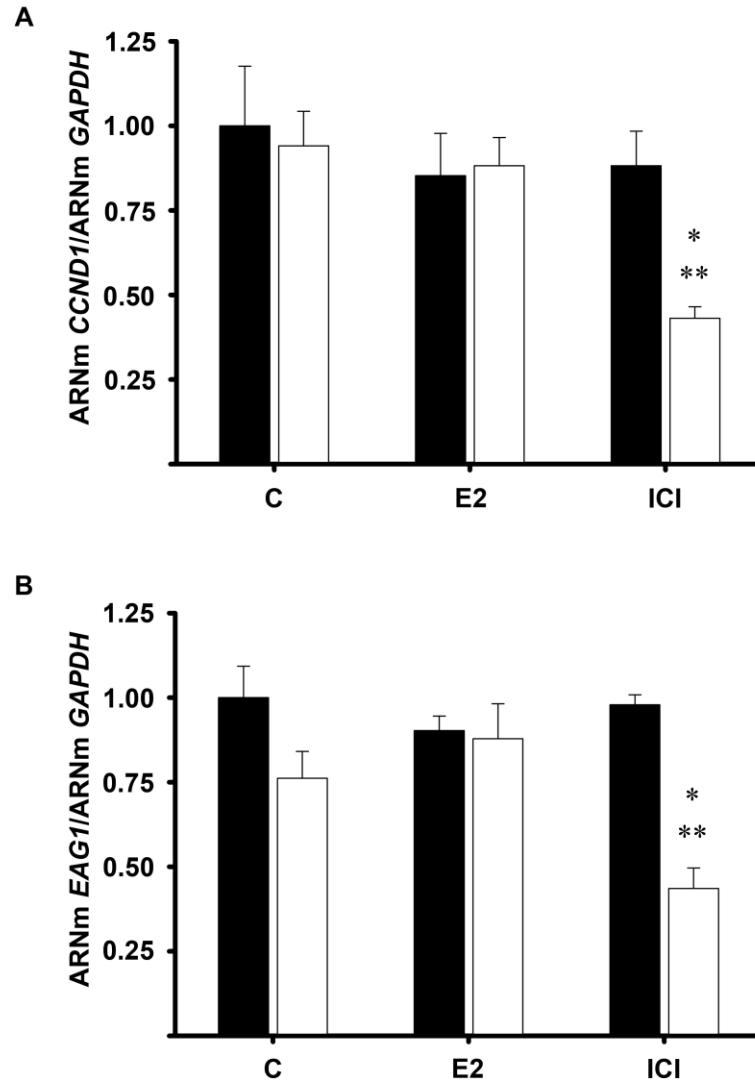


Figura 12. El ICI-182, 780 regula a la baja la expresión génica de *CCND1* y *EAG1* en células $RE\alpha$ -negativas tratadas con calcitriol. Las células derivadas de los tumores de mama se incubaron en ausencia (barras negras) o presencia de calcitriol 1×10^{-8} M (barras blancas) durante 48 h. Posteriormente, las células se coincubaron con o sin calcitriol más estradiol (E2, 1×10^{-8} M), ICI-182, 780 (ICI, 1×10^{-6} M) o su vehículo (C) durante 24 h. La expresión génica de **A)** *CCND1* y **B)** *EAG1* fue determinada por qPCR. Los resultados mostrados son la media \pm D.E de la razón del ARNm de la *CCND1* o *EAG1*/*GAPDH* por triplicado. Los datos se normalizaron estableciendo el valor de 1 para las células tratadas con vehículo (C, barras negras), * $P \leq 0.05$ vs C (barra negra) y ** $P \leq 0.05$ vs C (barra blanca).

8. El calcipotriol, un análogo de la vitamina D, incrementa la expresión del $RE\alpha$ en células de cáncer de mama $RE\alpha$.

El calcipotriol, un análogo sintético de la vitamina D con bajos efectos calcémicos en comparación con el calcitriol, ha sido considerado como un potente estimulador de la diferenciación celular e inhibidor de la proliferación en células de cáncer [104]. El análisis de la expresión del $RE\alpha$ por el tratamiento con el análogo de la vitamina D, también fue estudiado. Las células SUM-229PE se incubaron con concentraciones crecientes de calcitriol y calcipotriol (1×10^{-10} a 1×10^{-6} M) durante 24 h. La figura 13 muestra una comparación entre el efecto de las diferentes concentraciones de calcitriol y calcipotriol sobre la expresión genética del $RE\alpha$. Como se observa, ambos compuestos aumentaron la expresión del ARNm del $RE\alpha$ de una manera dependiente de la concentración con valores de CE_{50} similares para calcitriol y calcipotriol (2.21×10^{-8} M y 2.74×10^{-8} M, respectivamente).

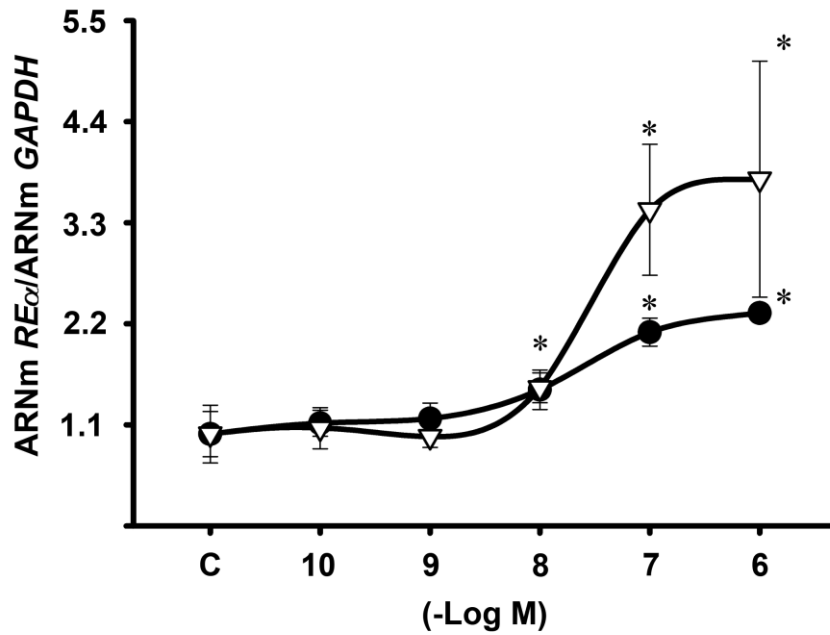


Figura 13. El calcipotriol induce la expresión del $RE\alpha$ en células de cáncer de mama RE-negativas. La línea celular SUM-229PE se incubó en presencia de diferentes concentraciones de calcitriol (círculos) y calcipotriol (triángulos) o solo vehículo (C, etanol) durante 24 h. Posteriormente, el ARNm se extrajo y se realizó qPCR. Los resultados se muestran como la media \pm D.E por triplicado de la razón del ARNm del $RE\alpha/GAPDH$. Los datos se normalizaron estableciendo el valor de 1 para las células tratadas con vehículo, * $P \leq 0.05$ vs C.

9. La actividad de la MAPK en células de tumores mamarios RE-negativo tratadas con calcitriol

La hiperactivación de MAPK induce pérdida de la expresión del RE α en células de cáncer de mama [54, 105], por lo tanto la inhibición de esta vía conduce a la re-expresión del RE α en células RE-negativas [55]. Con el fin de elucidar el posible mecanismo por el cual el calcitriol induce la expresión del RE α en las células de cáncer de mama RE-negativas se estudió la actividad de la MAPK. Las células derivadas de los tumores mamarios fueron tratadas con concentraciones crecientes de calcitriol (1×10^{-11} M – 1×10^{-7} M) durante 4 h y se realizaron análisis de la fosforilación de ERK 1 y 2 (MAPK-p 44/42). Los resultados mostraron que el calcitriol disminuyó la actividad de la MAPK (Figura 14) en las células derivadas de los tumores de mama RE-negativo. Por el contrario, en la línea celular SUM-229PE, el calcitriol no modificó de manera significativa la fosforilación de la MAPK a los 15 y 30 min de tratamiento con calcitriol. Una ligera tendencia a incrementar la fosforilación fue observada a las 4 h (Figura 15). Por lo tanto, la regulación diferenciada en la actividad de la MAPK por el calcitriol sugiere que la inducción del RE α por esta hormona no es a través de regular a la baja la actividad de esta vía.

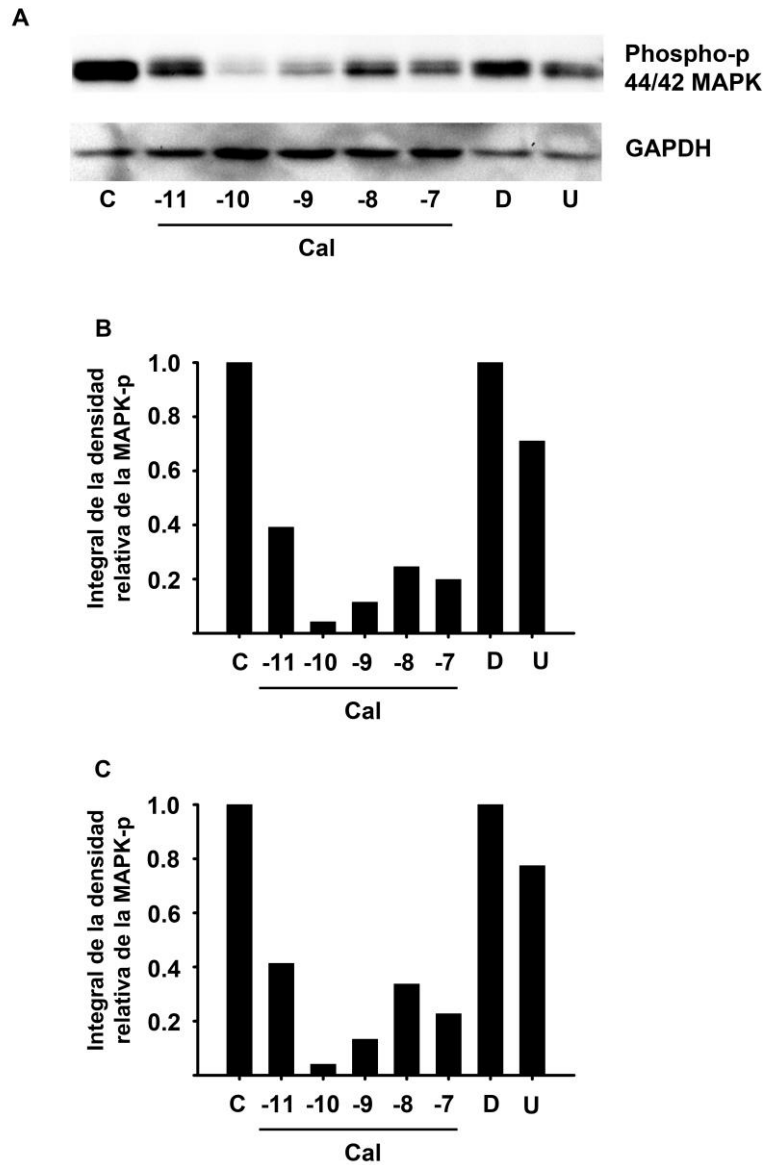


Figura 14. Actividad de la MAPK en células derivadas de tumores de cáncer de mama tratadas con calcitriol. A) Las células derivadas de los tumores de mama RE α -negativas fueron incubadas con concentraciones crecientes de calcitriol o su vehículo (C). El análisis de la fosforilación de la MAPK se realizó por western blot. El inhibidor de la MAPK, el U0126 (U) o su vehículo DMSO (D) fue utilizado como control. La GAPDH se utilizó como control de carga. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes y se expresa como la integral de la densidad relativa de la MAPK-p 44 (**B**) y de la MAPK-p 42 (**C**) versus la de GAPDH. Un valor arbitrario de 1 se le dio a las células tratadas con C.

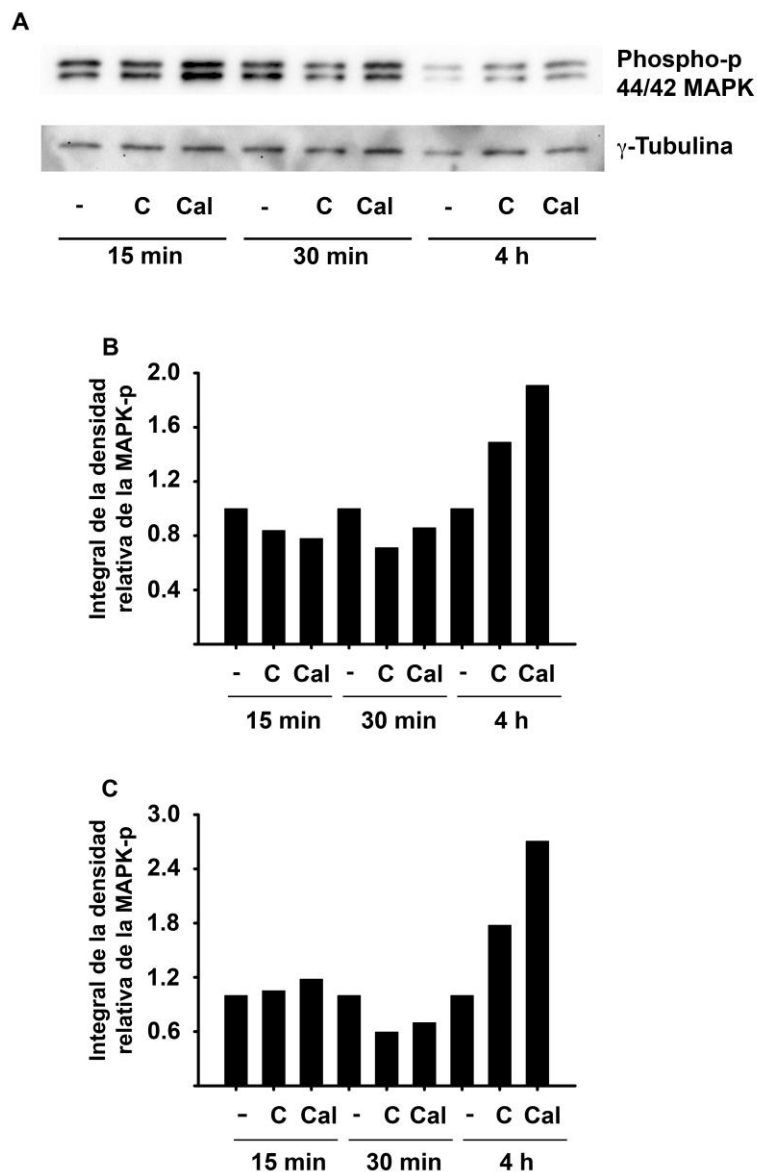


Figura 15. Actividad de la MAPK en la línea celular SUM-229PE tratadas con calcitriol. **A)** La línea celular SUM-229PE fue incubada con medio (-), vehículo (C) y/o calcitriol (Cal, 1×10^{-7} M) por 15, 30 min y 4 h. El análisis de la fosforilación de la MAPK se realizó por western blot. La γ -Tubulina se utilizó como control de carga. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes y se expresa como la integral de la densidad relativa de la MAPK-p 44 (**B**) y de la MAPK-p 42 (**C**) versus la de γ -Tubulina. Un valor arbitrario de 1 se le dio a las células tratadas con C.

10. Análisis *in silico* de elementos de respuesta a vitamina D en el promotor del RE α .

El calcitriol a través de su receptor activa la transcripción de genes. La regulación directa del calcitriol a través de la unión del VDR a los posibles elementos de respuesta en la región promotora del RE α representa un mecanismo por el cual el calcitriol podría inducir la expresión del receptor. Con la finalidad de identificar los posibles elementos de respuesta putativos de la vitamina D en la región promotora de RE α , un análisis *in silico* fue llevado a cabo con el programa MatInspector utilizando una secuencia derivada del cromosoma humano 6, que contiene la región promotora del RE α . El análisis mostró seis posibles elementos de respuesta a vitamina D con una matriz de similitud >0.8 y uno <0.8 (tabla 2). Este número indica la coincidencia que se tiene con la secuencia buscada, cuando es igual a 1 significa que es la misma. Los datos muestran una posible regulación directa del VDR con sus elementos de respuesta en la región promotora del RE α .

Tabla 2. Elementos de respuesta putativos a vitamina D en la región promotora del RE α .

Matriz/ Familia	Opt.	Posición	Hebra	Similitud del núcleo	Similitud de matriz	Secuencia
V\$VDR_RX R.06/V\$RX RF	0.75	373-397	(+)	0.938	0.804	acgtgtgtgtcca gcAGGAgag ggt
V\$VDR_RX R.01/V\$RX RF	0.85	387-411	(+)	1.000	0.851	caggagagggg aggGAGGga agcca
V\$VDR_RX R.04/ V\$RXRF	0.79	508-532	(+)	0.821	0.824	ggacaagGCT Caccaagatga gttt
V\$VDR_RX R.04/ V\$RXRF	0.79	2991-3015	(-)	0.929	0.813	cttctcgGTTC acttgggctagg at
V\$VDR_RX R.04/ V\$RXRF	0.79	1223-1247	(+)	1.000	0.820	agaaagtGGT Caagaggtgga tcca
V\$VDR_RX R.03/ V\$RXRF	0.74	3838-3862	(+)	0.824	0.745	taaagtaaAGT Tcaggaagct gct
V\$VDR_RX R.01/ V\$RXRF	0.85	3936-3960	(-)	1.000	0.894	ttacaaaggtgct gGAGGacgg cca

Matriz/Familia: Describe la matriz generada para la familia a la cual pertenece el factor de transcripción, **Opt:** Umbral de matriz optimizado; umbral que minimiza los falsos positivos. **Posición:** indica la posición dentro de la secuencia analizada. **Hebra:** Para cada matriz que coincida con la secuencia consenso de la matriz de la IUPAC se muestra un alineado con la secuencia. Coincidencia en la hebra (+) se muestran encima de la secuencia, coincidencia en la hebra (-) se muestran debajo de la secuencia. **Similitud del núcleo:** define una región del núcleo dentro de la matriz que está representado por las cuatro posiciones más conservadas de nucleótidos. **Similitud de matriz:** Cuando una matriz coincide con una secuencia, el nivel de similitud se expresa como un número. Este puede ser mayor o igual, pero nunca menor que el umbral de búsqueda de la matriz que es de 0.8. **Secuencia:** muestra los nucleótidos individuales presentes en la secuencia candidata.

DISCUSIÓN

La presencia del $RE\alpha$ en los tumores de mama representa un buen indicador de la sobrevida y del pronóstico de las pacientes con cáncer de mama [106, 107]. Otros indicadores con valor pronóstico significativo son el RP y el receptor de andrógenos [108, 109]. En este estudio, el calcitriol fue capaz de inducir la expresión del $RE\alpha$ a través del VDR en células de cáncer de mama RE-negativas.

Los tumores de mama poco diferenciados y más agresivos son aquellos que no expresan los receptores a esteroides [110]. El calcitriol promueve la diferenciación de varios tipos de células tumorales, incluyendo el de mama [79, 111]. En el cáncer de mama poco diferenciado, la hormona es capaz de inducir la expresión de varias proteínas de adhesión (tales como caderina-E, claudina 7 y ocludina) [79]. La expresión de estas proteínas esta asociada a un fenotipo menos agresivo y diferenciado. Por lo tanto, la inducción del $RE\alpha$ por el calcitriol como se demostró en este trabajo, soporta la participación de esta hormona en el proceso de diferenciación celular.

La expresión del $RE\alpha$ en las células de cáncer de mama RE-negativas por el calcitriol permitió a las células incrementar el ARNm de la PRL cuando fueron estimuladas con E2. Estos resultados sugieren la inducción del un $RE\alpha$ funcional, capaz de activar la transcripción de genes dependientes de estrógenos.

La importancia que representa la inducción del $RE\alpha$ en las células de cáncer de mama RE-negativas es su potencial como blanco terapéutico, ya que este tipo de tumores son insensibles al tratamiento endocrino [42].

En este estudio, la capacidad del calcitriol para sensibilizar a las células a los efectos de los antiestrógenos quedó demostrada cuando las células derivadas de los tumores de mama $RE\alpha$ -negativos fueron coincubadas con estos dos compuestos. La inhibición del crecimiento celular fue significativa solo en aquellas

células derivadas de los tumores de mama tratadas con el calcitriol y los antiestrógenos (tamoxifeno e ICI) en comparación con las células no tratadas con la hormona. En la línea celular SUM-229PE, el tamoxifeno no inhibió la proliferación en las células tratadas con el calcitriol. Algunos estudios han demostrado que el tamoxifeno no ejerce sus efectos antagonistas en las células RE-positivas que sobreexpresan al HER-2/neu o EGFR [112]. La línea celular SUM-229PE sobreexpresa estos receptores a factores de crecimiento, lo que podría explicar la falta de efecto del tamoxifeno en la proliferación celular. De manera interesante, el antiestrógeno ICI-182, 780 (considerado como el antagonista puro del RE) sí fue capaz de inhibir la proliferación en estas células, este hecho demuestra como el calcitriol induce la expresión de un $RE\alpha$ funcional.

Los efectos mitogénicos del E2 estimulan el crecimiento tumoral del cáncer de mama [113]. En el presente estudio, la presencia del E2 no incrementó la proliferación de las células tratadas con calcitriol, por el contrario, el E2 inhibió el crecimiento celular. Este suceso puede explicarse por los efectos antiproliferativos del calcitriol que pueden estar bloqueando las acciones mitogénicas del E2 en las células de cáncer de mama. El mecanismo de los efectos antiproliferativos del E2 en las células que expresan nuevamente al receptor aún es desconocido. Sin embargo, los resultados aquí observados están en concordancia con aquellos reportes en donde se reexpresó al $RE\alpha$, con el uso de los inhibidores de la MAPK o por sobreexpresar al receptor, en las células de cáncer de mama RE-negativas. En ambos reportes, el E2 también inhibió la proliferación celular o no la modificó [55, 114]. Los estudios de los efectos antiproliferativos del E2 en las células que reexpresan al $RE\alpha$ tendrían que ser evaluados en un futuro.

Las acciones inhibitorias de los antiestrógenos en la proliferación celular del cáncer de mama RE-positivo son en parte ejercidas por la regulación a la baja de *CCND1*, uno de los reguladores más comunes del ciclo celular que está alterado y sobreexpresado en varios tipos de cáncer incluyendo el de mama [101, 115]. Los resultados mostraron que el ICI-182, 780 fue capaz de regular a la baja el ARNm

de *CCND1* en las células donde fue expresado nuevamente el $RE\alpha$ por el calcitriol, indicando su capacidad para afectar el ciclo celular.

El *EAG1* es un canal de potasio dependiente de voltaje que es considerado un marcador oncogénico y un blanco terapéutico de diversos tipos de cánceres [103, 116]. La sobreexpresión de este canal en células de cáncer de mama contribuye a la progresión del tumor [89, 117]. Por lo tanto, el bloqueo de su actividad y/o expresión disminuye la proliferación de las células cancerígenas [116]. De manera interesante, en las células de cáncer de mama $RE\alpha$ -negativas tratadas con calcitriol el ICI-182, 780 fue capaz de regular a la baja la expresión del ARN del *EAG1*, lo cual sugiere que los efectos antiproliferativos de los antiestrógenos son llevados a cabo a través de el $RE\alpha$ inducido por la hormona. La regulación a la baja de la expresión de *CCND1* y de *EAG1* por el antiestrógeno es de gran importancia debido a la participación de estos dos genes en el desarrollo y progresión tumoral.

El mecanismo por el cual el calcitriol induce la expresión del $RE\alpha$ a través de su receptor en las células de cáncer de mama RE -negativas es aún desconocido. Nosotros hipotetizamos que la inducción del $RE\alpha$ por calcitriol era llevada a cabo por inhibir la actividad de la MAPK. Los estudios de fosforilación de ERK 1 y 2 realizados para evaluar la actividad de la MAPK como posible vía regulada por el calcitriol para inducir la expresión del receptor, no mostraron una clara evidencia de que esta vía esté involucrada en el proceso. Los resultados revelaron que en las células derivadas de los tumores mamarios $RE\alpha$ -negativos el calcitriol disminuyó la fosforilación de la MAPK, mientras que en la línea celular SUM-229PE hubo una tendencia a incrementar la fosforilación. Estas diferencias en la activación de la MAPK indican que el mecanismo por el cual el calcitriol induce la expresión del $RE\alpha$ no es por regular a la baja la actividad de esta vía. Un estudio alternativo *in silico* para identificar VDREs en la región promotora del $RE\alpha$ fue realizado como mecanismo del calcitriol para regular la expresión del $RE\alpha$. En este análisis se mostraron siete posibles elementos putativos de respuesta a

vitamina D en la región promotora del RE α . Esto significa que el calcitriol a través del VDR puede unirse a uno de estos posibles elementos y regular de manera directa la transcripción del receptor, vía genómica. Futuras investigaciones al respecto tendrán que ser evaluadas.

El calcitriol tiene efectos hipercalcémicos en las células a altas concentraciones. Sin embargo, el desarrollo de numerosos análogos sintéticos de la vitamina D y la dosificación intermitente del calcitriol han permitido de manera sustancial la reducción de estos efectos [118, 119]. El calcipotriol, un análogo de vitamina D, con potente actividad antiproliferativa fue también capaz de regular a la alta la expresión génica del RE α en la línea celular SUM-229PE al igual que calcitriol. Esto sugiere que el tratamiento combinado de los análogos de la vitamina D con los antiestrógenos también puede ser considerado como una buena estrategia terapéutica para el cáncer de mama RE α -negativo.

CONCLUSIÓN

Los resultados presentados en este trabajo demuestran claramente la capacidad del calcitriol para inducir la expresión de un RE α funcional y de restaurar la respuesta a los antiestrógenos en un subconjunto de células de cáncer de mama RE α -negativas. El tratamiento combinado con calcitriol y los antiestrógenos podría representar una nueva estrategia terapéutica en aquellos pacientes afectados con tumores RE α -negativos o en tumores que perdieron la expresión del RE α lo cual podría mejorar su pronóstico de vida.

PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos de cambio en la corrida electroforética (EMSA) y CHIP para investigar la posible interacción del VDR con su VDRE en la región promotora del RE α .
- Estudiar el efecto del tratamiento combinado de los antiestrógenos con el calcitriol en el crecimiento tumoral del cáncer de mama RE α -negativo en un modelo *in vivo*.

REFERENCIAS

1. 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.
2. **Consenso Nacional sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario.** Elsevier México 2011.
3. Pandya S, Moore RG: **Breast development and anatomy.** *Clinical obstetrics and gynecology* 2011, **54**(1):91-95.
4. Stirling JW, Chandler JA: **The fine structure of the normal, resting terminal ductal-lobular unit of the female breast.** *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histology* 1976, **372**(3):205-226.
5. Cowie AT, Forsyth IA, Hart IC: **Hormonal control of lactation.** *Monographs on endocrinology* 1980, **15**:I-XIV, 1-275.
6. Delouis C, Dijiane J, Houdebine LM, Terqui M: **Relation between hormones and mammary gland function.** *Journal of dairy science* 1980, **63**(9):1492-1513.
7. Ostrom KM: **A review of the hormone prolactin during lactation.** *Progress in food & nutrition science* 1990, **14**(1):1-43.
8. Houdebine LM, Djiane J, Dusanter-Fourt I, Martel P, Kelly PA, Devinoy E, Servely JL: **Hormonal action controlling mammary activity.** *Journal of dairy science* 1985, **68**(2):489-500.
9. Gimpl G, Fahrenholz F: **The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation.** *Physiological reviews* 2001, **81**(2):629-683.
10. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC: **Production and actions of estrogens.** *The New England journal of medicine* 2002, **346**(5):340-352.
11. Porter JC: **Proceedings: Hormonal regulation of breast development and activity.** *The Journal of investigative dermatology* 1974, **63**(1):85-92.
12. Tsai MJ, O'Malley BW: **Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members.** *Annu Rev Biochem* 1994, **63**:451-486.
13. Green S, Walter P, Greene G, Krust A, Goffin C, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, Chambon P: **Cloning of the human oestrogen receptor cDNA.** *Journal of steroid biochemistry* 1986, **24**(1):77-83.

14. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA: **Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, **93**(12):5925-5930.
15. Osborne CK, Schiff R, Fuqua SA, Shou J: **Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2001, **7**(12 Suppl):4338s-4342s; discussion 4411s-4412s.
16. Smith DF, Toft DO: **Steroid receptors and their associated proteins.** *Mol Endocrinol* 1993, **7**(1):4-11.
17. Allan GF, Leng X, Tsai SY, Weigel NL, Edwards DP, Tsai MJ, O'Malley BW: **Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation.** *The Journal of biological chemistry* 1992, **267**(27):19513-19520.
18. Beato M: **Gene regulation by steroid hormones.** *Cell* 1989, **56**(3):335-344.
19. Hall JM, Couse JF, Korach KS: **The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(40):36869-36872.
20. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW: **Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology.** *Endocrine reviews* 1999, **20**(3):321-344.
21. Rosenfeld MG, Glass CK: **Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(40):36865-36868.
22. McKenna NJ, O'Malley BW: **Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators.** *Cell* 2002, **108**(4):465-474.
23. Razandi M, Oh P, Pedram A, Schnitzer J, Levin ER: **ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions.** *Mol Endocrinol* 2002, **16**(1):100-115.
24. Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER: **Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors.** *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(4):2701-2712.
25. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR, Jr.: **Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF.** *Mol Endocrinol* 2000, **14**(10):1649-1660.

26. Thomas P, Alyea R, Pang Y, Peyton C, Dong J, Berg AH: **Conserved estrogen binding and signaling functions of the G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in mammals and fish.** *Steroids* 2010, **75**(8-9):595-602.
27. Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E, Auricchio F: **Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells.** *The EMBO journal* 1996, **15**(6):1292-1300.
28. Kahlert S, Nuedling S, van Eickels M, Vetter H, Meyer R, Grohe C: **Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(24):18447-18453.
29. Wong CW, McNally C, Nickbarg E, Komm BS, Cheskis BJ: **Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(23):14783-14788.
30. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K, DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS *et al*: **Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity.** *Cell* 2001, **104**(5):719-730.
31. Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS: **Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype.** *Endocrinology* 2003, **144**(10):4562-4574.
32. Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK, Osborne CK: **Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004, **10**(1 Pt 2):331S-336S.
33. Sun M, Paciga JE, Feldman RI, Yuan Z, Coppola D, Lu YY, Shelley SA, Nicosia SV, Cheng JQ: **Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor alpha (ERalpha) via interaction between ERalpha and PI3K.** *Cancer research* 2001, **61**(16):5985-5991.
34. Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, Picard D: **Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation.** *The EMBO journal* 1996, **15**(9):2174-2183.

35. Joel PB, Smith J, Sturgill TW, Fisher TL, Blenis J, Lannigan DA: **pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167.** *Molecular and cellular biology* 1998, **18**(4):1978-1984.
36. Henderson IC: **Risk factors for breast cancer development.** *Cancer* 1993, **71**(6 Suppl):2127-2140.
37. Balleine RL, Wilcken NR: **High-risk estrogen-receptor-positive breast cancer: identification and implications for therapy.** *Molecular diagnosis & therapy* 2012, **16**(4):235-240.
38. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR: **Molecular evolution of breast cancer.** *J Pathol* 2005, **205**(2):248-254.
39. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS *et al*: **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(19):10869-10874.
40. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS *et al*: **Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer.** *Journal of the National Cancer Institute* 2009, **101**(10):736-750.
41. Holm K, Hegardt C, Staaf J, Vallon-Christersson J, Jonsson G, Olsson H, Borg A, Ringner M: **Molecular subtypes of breast cancer are associated with characteristic DNA methylation patterns.** *Breast cancer research : BCR* 2010, **12**(3):R36.
42. Sotiriou C, Pusztai L: **Gene-expression signatures in breast cancer.** *The New England journal of medicine* 2009, **360**(8):790-800.
43. Sommer S, Fuqua SA: **Estrogen receptor and breast cancer.** *Seminars in cancer biology* 2001, **11**(5):339-352.
44. Miller WR, Bartlett JM, Canney P, Verrill M: **Hormonal therapy for postmenopausal breast cancer: the science of sequencing.** *Breast cancer research and treatment* 2007, **103**(2):149-160.
45. Powles TJ, Ashley S, Tidy A, Smith IE, Dowsett M: **Twenty-year follow-up of the Royal Marsden randomized, double-blinded tamoxifen breast cancer prevention trial.** *Journal of the National Cancer Institute* 2007, **99**(4):283-290.
46. Johnston SR: **Acquired tamoxifen resistance in human breast cancer--potential mechanisms and clinical implications.** *Anticancer Drugs* 1997, **8**(10):911-930.

47. Lapidus RG, Ferguson AT, Ottaviano YL, Parl FF, Smith HS, Weitzman SA, Baylin SB, Issa JP, Davidson NE: **Methylation of estrogen and progesterone receptor gene 5' CpG islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 1996, **2**(5):805-810.
48. Rody A, Holtrich U, Solbach C, Kourtis K, von Minckwitz G, Engels K, Kissler S, Gatje R, Karn T, Kaufmann M: **Methylation of estrogen receptor beta promoter correlates with loss of ER-beta expression in mammary carcinoma and is an early indication marker in premalignant lesions.** *Endocrine-related cancer* 2005, **12**(4):903-916.
49. Jeng MH, Yue W, Eischeid A, Wang JP, Santen RJ: **Role of MAP kinase in the enhanced cell proliferation of long term estrogen deprived human breast cancer cells.** *Breast cancer research and treatment* 2000, **62**(3):167-175.
50. Stoner M, Saville B, Wormke M, Dean D, Burghardt R, Safe S: **Hypoxia induces proteasome-dependent degradation of estrogen receptor alpha in ZR-75 breast cancer cells.** *Mol Endocrinol* 2002, **16**(10):2231-2242.
51. Ottaviano YL, Issa JP, Parl FF, Smith HS, Baylin SB, Davidson NE: **Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells.** *Cancer research* 1994, **54**(10):2552-2555.
52. Zhao JJ, Lin J, Yang H, Kong W, He L, Ma X, Coppola D, Cheng JQ: **MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer.** *The Journal of biological chemistry* 2008, **283**(45):31079-31086.
53. Adams BD, Furneaux H, White BA: **The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines.** *Mol Endocrinol* 2007, **21**(5):1132-1147.
54. Oh AS, Lorant LA, Holloway JN, Miller DL, Kern FG, El-Ashry D: **Hyperactivation of MAPK induces loss of ERalpha expression in breast cancer cells.** *Mol Endocrinol* 2001, **15**(8):1344-1359.
55. Bayliss J, Hilger A, Vishnu P, Diehl K, El-Ashry D: **Reversal of the estrogen receptor negative phenotype in breast cancer and restoration of antiestrogen response.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007, **13**(23):7029-7036.

56. Fan J, Yin WJ, Lu JS, Wang L, Wu J, Wu FY, Di GH, Shen ZZ, Shao ZM: **ER alpha negative breast cancer cells restore response to endocrine therapy by combination treatment with both HDAC inhibitor and DNMT inhibitor.** *Journal of cancer research and clinical oncology* 2008, **134**(8):883-890.
57. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS: **Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics.** *Nat Rev Cancer* 2007, **7**(9):684-700.
58. Plum LA, DeLuca HF: **Vitamin D, disease and therapeutic opportunities.** *Nature reviews Drug discovery* 2010, **9**(12):941-955.
59. Adams JS, Hewison M: **Update in vitamin D.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2010, **95**(2):471-478.
60. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E: **Vitamin D.** *American journal of physiology Renal physiology* 2005, **289**(1):F8-28.
61. Norman AW: **From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health.** *The American journal of clinical nutrition* 2008, **88**(2):491S-499S.
62. Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ: **Vitamin D: metabolism.** *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 2010, **39**(2):243-253, table of contents.
63. Holick MF, Chen TC: **Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences.** *The American journal of clinical nutrition* 2008, **87**(4):1080S-1086S.
64. Cooke NE, Haddad JG: **Vitamin D binding protein (Gc-globulin).** *Endocrine reviews* 1989, **10**(3):294-307.
65. Kochupillai N: **The physiology of vitamin D : current concepts.** *The Indian journal of medical research* 2008, **127**(3):256-262.
66. Morris HA, Anderson PH: **Autocrine and paracrine actions of vitamin d.** *The Clinical biochemist Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists* 2010, **31**(4):129-138.
67. Holick MF: **Vitamin D and bone health.** *The Journal of nutrition* 1996, **126**(4 Suppl):1159S-1164S.
68. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E: **Vitamin D.** *The American journal of physiology* 1999, **277**(2 Pt 2):F157-175.
69. Bettoun DJ, Burris TP, Houck KA, Buck DW, 2nd, Stayrook KR, Khalifa B, Lu J, Chin WW, Nagpal S: **Retinoid X receptor is a nonsilent major contributor to vitamin D receptor-mediated transcriptional activation.** *Mol Endocrinol* 2003, **17**(11):2320-2328.

70. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW: **The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed.** *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 1998, **13**(3):325-349.
71. Tagami T, Lutz WH, Kumar R, Jameson JL: **The interaction of the vitamin D receptor with nuclear receptor corepressors and coactivators.** *Biochemical and biophysical research communications* 1998, **253**(2):358-363.
72. Huhtakangas JA, Olivera CJ, Bishop JE, Zanella LP, Norman AW: **The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 alpha,25(OH)₂-vitamin D₃ in vivo and in vitro.** *Mol Endocrinol* 2004, **18**(11):2660-2671.
73. Nemere I, Yoshimoto Y, Norman AW: **Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D₃.** *Endocrinology* 1984, **115**(4):1476-1483.
74. Wali RK, Baum CL, Sitrin MD, Brasitus TA: **1,25(OH)₂ vitamin D₃ stimulates membrane phosphoinositide turnover, activates protein kinase C, and increases cytosolic calcium in rat colonic epithelium.** *The Journal of clinical investigation* 1990, **85**(4):1296-1303.
75. Morelli S, Buitrago C, Boland R, de Boland AR: **The stimulation of MAP kinase by 1,25(OH)₂-vitamin D₃ in skeletal muscle cells is mediated by protein kinase C and calcium.** *Molecular and cellular endocrinology* 2001, **173**(1-2):41-52.
76. Narayanan R, Sepulveda VA, Falzon M, Weigel NL: **The functional consequences of cross-talk between the vitamin D receptor and ERK signaling pathways are cell-specific.** *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(45):47298-47310.
77. Fife RS, Sledge GW, Jr., Proctor C: **Effects of vitamin D₃ on proliferation of cancer cells in vitro.** *Cancer letters* 1997, **120**(1):65-69.
78. Simboli-Campbell M, Narvaez CJ, Tenniswood M, Welsh J: **1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces morphological and biochemical markers of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells.** *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 1996, **58**(4):367-376.
79. Pendas-Franco N, Gonzalez-Sancho JM, Suarez Y, Aguilera O, Steinmeyer A, Gamallo C, Berciano MT, Lafarga M, Munoz A: **Vitamin D regulates the phenotype of human breast cancer cells.** *Differentiation* 2007, **75**(3):193-207.

80. 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.**
81. Janowsky EC, Lester GE, Weinberg CR, Millikan RC, Schildkraut JM, Garrett PA, Hulka BS: **Association between low levels of 1,25-dihydroxyvitamin D and breast cancer risk.** *Public Health Nutr* 1999, **2(3):283-291.**
82. Mawer EB, Walls J, Howell A, Davies M, Ratcliffe WA, Bundred NJ: **Serum 1,25-dihydroxyvitamin D may be related inversely to disease activity in breast cancer patients with bone metastases.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1997, **82(1):118-122.**
83. Yao S, Ambrosone CB: **Associations between vitamin D deficiency and risk of aggressive breast cancer in African-American women.** *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2012.
84. Swami S, Krishnan AV, Feldman D: **1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 down-regulates estrogen receptor abundance and suppresses estrogen actions in MCF-7 human breast cancer cells.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2000, **6(8):3371-3379.**
85. Simboli-Campbell M, Narvaez CJ, van Weelden K, Tenniswood M, Welsh J: **Comparative effects of 1,25(OH)2D3 and EB1089 on cell cycle kinetics and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells.** *Breast cancer research and treatment* 1997, **42(1):31-41.**
86. Stoica A, Saceda M, Fakhro A, Solomon HB, Fenster BD, Martin MB: **Regulation of estrogen receptor-alpha gene expression by 1, 25-dihydroxyvitamin D in MCF-7 cells.** *Journal of cellular biochemistry* 1999, **75(4):640-651.**
87. Davoodi F, Brenner RV, Evans SR, Schumaker LM, Shabahang M, Nauta RJ, Buras RR: **Modulation of vitamin D receptor and estrogen receptor by 1,25(OH)2-vitamin D3 in T-47D human breast cancer cells.** *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 1995, **54(3-4):147-153.**
88. Li Z, Bustos V, Miner J, Paulo E, Meng ZH, Zlotnikov G, Ljung BM, Dairkee SH: **Propagation of genetically altered tumor cells derived from fine-needle aspirates of primary breast carcinoma.** *Cancer research* 1998, **58(23):5271-5274.**
89. Garcia-Becerra R, Diaz L, Camacho J, Barrera D, Ordaz-Rosado D, Morales A, Ortiz CS, Avila E, Bargallo E, Arrecillas M *et al*: **Calcitriol inhibits Ether-a go-go potassium channel expression and cell proliferation in human breast cancer cells.** *Exp Cell Res* 2010.

90. Tesch M, Shawwa A, Henderson R: **Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor status in breast cancer.** *Am J Clin Pathol* 1993, **99**(1):8-12.
91. Maurer U, Jehan F, Englert C, Hubinger G, Weidmann E, DeLuca HF, Bergmann L: **The Wilms' tumor gene product (WT1) modulates the response to 1,25-dihydroxyvitamin D3 by induction of the vitamin D receptor.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(6):3727-3732.
92. Lappano R, Recchia AG, De Francesco EM, Angelone T, Cerra MC, Picard D, Maggiolini M: **The cholesterol metabolite 25-hydroxycholesterol activates estrogen receptor alpha-mediated signaling in cancer cells and in cardiomyocytes.** *PloS one* 2011, **6**(1):e16631.
93. Radomska HS, Alberich-Jorda M, Will B, Gonzalez D, Delwel R, Tenen DG: **Targeting CDK1 promotes FLT3-activated acute myeloid leukemia differentiation through C/EBPalpha.** *The Journal of clinical investigation* 2012, **122**(8):2955-2966.
94. Almeras L, Eyles D, Benech P, Laffite D, Villard C, Patatian A, Boucraut J, Mackay-Sim A, McGrath J, Feron F: **Developmental vitamin D deficiency alters brain protein expression in the adult rat: implications for neuropsychiatric disorders.** *Proteomics* 2007, **7**(5):769-780.
95. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D: **The human genome browser at UCSC.** *Genome research* 2002, **12**(6):996-1006.
96. deConinck EC, McPherson LA, Weigel RJ: **Transcriptional regulation of estrogen receptor in breast carcinomas.** *Molecular and cellular biology* 1995, **15**(4):2191-2196.
97. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T: **MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites.** *Bioinformatics* 2005, **21**(13):2933-2942.
98. Hussain-Hakimjee EA, Mehta RG: **Regulation of steroid receptor expression by 1alpha-hydroxyvitamin D5 in hormone-responsive breast cancer cells.** *Anticancer Res* 2009, **29**(9):3555-3561.
99. Duan R, Ginsburg E, Vonderhaar BK: **Estrogen stimulates transcription from the human prolactin distal promoter through AP1 and estrogen responsive elements in T47D human breast cancer cells.** *Molecular and cellular endocrinology* 2008, **281**(1-2):9-18.

100. Musgrove EA, Hamilton JA, Lee CS, Sweeney KJ, Watts CK, Sutherland RL: **Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation of cyclin gene expression associated with changes in T-47D human breast cancer cell cycle progression.** *Molecular and cellular biology* 1993, **13**(6):3577-3587.
101. Watts CK, Sweeney KJ, Warlters A, Musgrove EA, Sutherland RL: **Antiestrogen regulation of cell cycle progression and cyclin D1 gene expression in MCF-7 human breast cancer cells.** *Breast cancer research and treatment* 1994, **31**(1):95-105.
102. Diaz L, Ceja-Ochoa I, Restrepo-Angulo I, Larrea F, Avila-Chavez E, Garcia-Becerra R, Borja-Cacho E, Barrera D, Ahumada E, Gariglio P *et al*: **Estrogens and human papilloma virus oncogenes regulate human ether-a-go-go-1 potassium channel expression.** *Cancer research* 2009, **69**(8):3300-3307.
103. Pardo LA, Suhmer W: **Eag1 as a cancer target.** *Expert Opin Ther Targets* 2008, **12**(7):837-843.
104. Binderup L, Bramm E: **Effects of a novel vitamin D analogue MC903 on cell proliferation and differentiation in vitro and on calcium metabolism in vivo.** *Biochem Pharmacol* 1988, **37**(5):889-895.
105. Brinkman JA, El-Ashry D: **ER re-expression and re-sensitization to endocrine therapies in ER-negative breast cancers.** *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2009, **14**(1):67-78.
106. Clark GM, McGuire WL: **Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer.** *Semin Oncol* 1988, **15**(2 Suppl 1):20-25.
107. McGuire WL, Osborne CK, Clark GM, Knight WA, 3rd: **Steroid hormone receptors and carcinoma of the breast.** *The American journal of physiology* 1982, **243**(2):E99-102.
108. Liu S, Chia SK, Mehl E, Leung S, Rajput A, Cheang MC, Nielsen TO: **Progesterone receptor is a significant factor associated with clinical outcomes and effect of adjuvant tamoxifen therapy in breast cancer patients.** *Breast cancer research and treatment*, **119**(1):53-61.
109. Luo X, Shi YX, Li ZM, Jiang WQ: **Expression and clinical significance of androgen receptor in triple negative breast cancer.** *Chin J Cancer* 2010, **29**(6):585-590.
110. Gordon LA, Mulligan KT, Maxwell-Jones H, Adams M, Walker RA, Jones JL: **Breast cell invasive potential relates to the myoepithelial phenotype.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2003, **106**(1):8-16.

111. Palmer HG, Gonzalez-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, Quintanilla M, Cano A, de Herreros AG, Lafarga M *et al*: **Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling.** *J Cell Biol* 2001, **154**(2):369-387.
112. Garcia-Becerra R, Santos N, Diaz L, Camacho J: **Mechanisms of Resistance to Endocrine Therapy in Breast Cancer: Focus on Signaling Pathways, miRNAs and Genetically Based Resistance.** *International journal of molecular sciences* 2012, **14**(1):108-145.
113. Doisneau-Sixou SF, Sergio CM, Carroll JS, Hui R, Musgrove EA, Sutherland RL: **Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells.** *Endocrine-related cancer* 2003, **10**(2):179-186.
114. Jiang SY, Jordan VC: **Growth regulation of estrogen receptor-negative breast cancer cells transfected with complementary DNAs for estrogen receptor.** *Journal of the National Cancer Institute* 1992, **84**(8):580-591.
115. Barnes DM, Gillett CE: **Cyclin D1 in breast cancer.** *Breast cancer research and treatment* 1998, **52**(1-3):1-15.
116. Camacho J: **Ether a go-go potassium channels and cancer.** *Cancer letters* 2006, **233**(1):1-9.
117. Ouadid-Ahidouch H, Ahidouch A: **K⁺ channel expression in human breast cancer cells: involvement in cell cycle regulation and carcinogenesis.** *J Membr Biol* 2008, **221**(1):1-6.
118. 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.
119. Masuda S, Jones G: **Promise of vitamin D analogues in the treatment of hyperproliferative conditions.** *Mol Cancer Ther* 2006, **5**(4):797-808.

REFERENCIAS DE INTERNET

1. Revista electrónica

Felipe Imigo G., et al., *Clasificación molecular del cáncer de mama* [en línea], Revistas Electrónicas UACH, 2011, [Acceso 28/01/2014], Cuadernos de cirugía (Valdivia), v.25 n.1, Formato HTML, Disponible en: http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?pid=S0718-28642011000100010&script=sci_arttext, ISSN 0718-2864

2. Página WEB

File:Mammary anatomy.jpg. [Autor n.d.]. Embryology. [Acceso 10/04/2014], de http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=File:Mammary_anatomy.jpg

ABREVIACIONES

ADN: ácido desoxirribonucleico
AKT: proteína cinasa B
ARN: ácido ribonucleico
CCND1: ciclina D1
CE₅₀: concentración estimuladora 50
CI₅₀: concentración inhibitoria 50
CK: citoqueratina
CYP: citocromo P-450
CYP24A1: 24-hidroxilasa
CYP27A1: 25 hidroxilasa
CYP27B1: 1 α -hidroxilasa
DAB: 3,3'diaminobencidina
DBP: proteína de unión a vitamina D
DMSO: dimetil sulfóxido
E2: 17 β estradiol
EAG1: éter-à-go-gó 1
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERE: elementos de respuesta a estrógenos
GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GRP30: receptor acoplado a la proteína G 30
HER2: receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano
IA: inhibidores de aromatasa
MAPK: proteína cinasas activadas por mitógenos
PBS: tampón fosfato salino
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PI3K: fosfoinositol 3-cinasas
PKC: proteína cinasa C
PRL: prolactina
PTH: hormona paratiroidea
RE: receptor de estrógenos
RP: receptor de progesterona
RXR: receptor X retinoide
SERD: reguladores selectivos a la baja del receptor de estrógeno
SERM: moduladores selectivos de receptores de estrógeno
TBST: tris amortiguador salino con Tween
VDR: receptor a vitamina D
VDRE: elementos de respuesta a la vitamina D

ANEXOS

Contribuciones científicas generadas por la postulante durante la realización del programa de Doctorado en Ciencias en la especialidad de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Zacatenco, y en colaboración con el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

1. **Santos-Martinez N**, Diaz L, Ordaz-Rosado D, Garcia-Quiroz J, Barrera D, Avila E, Halhali A, Medina-Franco H, Ibarra-Sanchez MJ, Esparza-Lopez J et al: Calcitriol restores antiestrogen responsiveness in estrogen receptor negative breast cancer cells: a potential new therapeutic approach. *BMC Cancer* 2014, 14:230.
2. Garcia-Becerra R, **Santos N**, Diaz L, Camacho J: Mechanisms of Resistance to Endocrine Therapy in Breast Cancer: Focus on Signaling Pathways, miRNAs and Genetically Based Resistance. *International Journal of Molecular Sciences* 2012, 14(1):108-145.
3. Segundo lugar del Premio CANIFARMA 2012 en el área de Investigación Básica.