

TESIS DOCTORAL

**ACCIONES DE  $1\alpha,25$ -DIHIDROXI-3-EPI-  
VITAMINA D<sub>3</sub> EN CÁNCER DE MAMA Y SU  
RELACIÓN CON PIT-1**

M<sup>a</sup> Efigenia Arias Baltar

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL  
PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANO 2019



# AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE

**Acciones de 1,25-dihidroxi-3-epi-vitamina D<sub>3</sub> en cáncer de  
mama y su relación con Pit-1**

D. Román Pérez Fernández (director)  
D. Manuel Macía Cortiñas (director)  
D Anxo Vidal Figueroa (titor)

INFORMA/N:

*Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna. **M<sup>a</sup> Efigenia Arias Baltar**, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.*

*En Santiago., 12 de abril de 2019*

D. Román Pérez Fernández (director)

D. Manuel Macía Cortiñas (director)

D Anxo Vidal Figueroa (titor)



# DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE

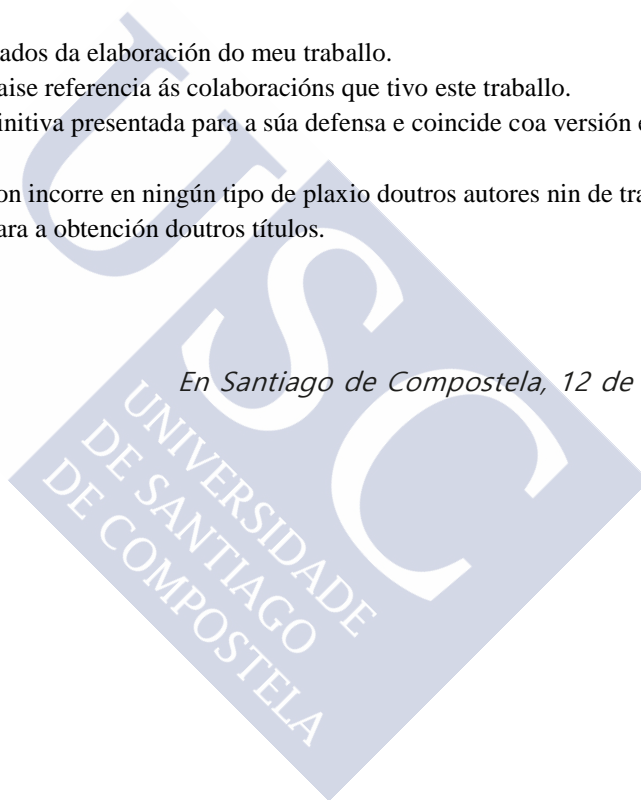
## Acciones de 1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-3-epi-vitamina D3 en cáncer de mama y su relación con Pit-1

D./Dna. M<sup>a</sup> Efigenia Arias Baltar

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

*En Santiago de Compostela, 12 de abril de 2019*



ASDO. M<sup>a</sup> Efigenia Arias Baltar

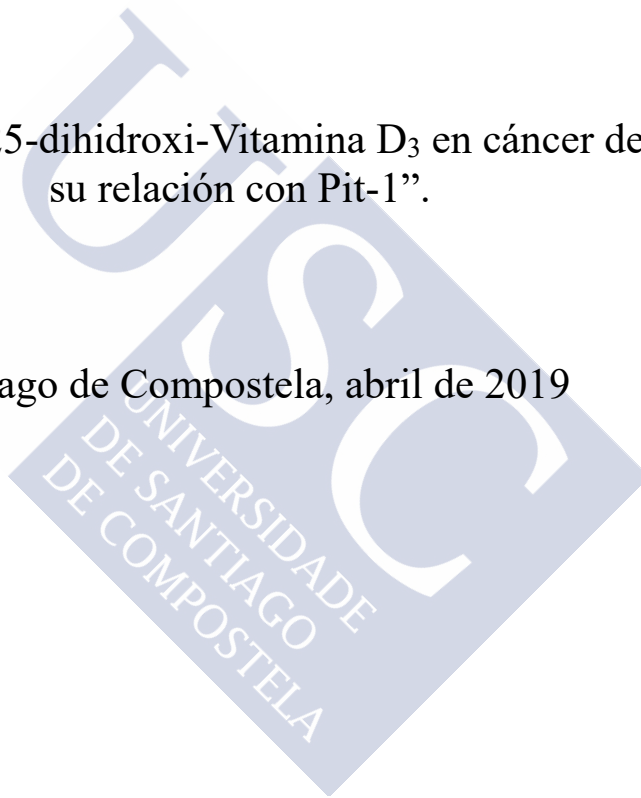


M<sup>a</sup> Efigenia Arias Baltar,

declara que no existe ningún potencial conflicto de interés  
relacionado con la tesis doctoral:

“Acciones de 1, $\alpha$ 25-dihidroxi-Vitamina D<sub>3</sub> en cáncer de mama y  
su relación con Pit-1”.

Santiago de Compostela, abril de 2019



Fdo: M<sup>a</sup> Efigenia Arias Baltar



## *Agradecimientos:*

Al Dr. Novo y al Dr. Macía que me sugirieron que hiciese una tesis, dada su procedencia, esta sugerencia se convirtió para mí en obligación. A Carmen Segura por preocuparse, molestarse y llevarme hasta Román. A Tomás García Caballero por animarme siempre.

A Román, por haber permitido que “una clínica” entrase en su laboratorio. Empleó conmigo tales dosis de paciencia y serenidad que incluso dejó de usar en las correcciones sus agudos y sarcásticos comentarios. Los eché en falta.

A Isabel Ben Batalla, una persona que admiro por su vitalidad y capacidad de trabajo. Agradezco su colaboración enormemente, su compañía y su amistad. Sin su ayuda no hubiera sido posible.

A Juan Sendón que siempre mostró su habilidad para dominar técnicas nuevas y para adaptarse a cualquier trabajo. Agradezco tu contagioso buen humor, tu cariño y los cientos de veces que me echaste una mano.

A Samuel, una persona que discreta y elegantemente representa una autoridad en el laboratorio. Tiene una forma de trabajar envidiablemente efectiva. Se mostró paciente y cariñoso conmigo desde el primer día hasta hoy. Gracias por todo.

Y a los compañeros de otros laboratorios: Marcos Ríos, Pablo Iglesias, Marcos Seoane a Catuxa... no importa lo atareados que estuviesen, siempre dispuestos a colaborar, a intentar solucionar un problema, a explicarme una vía o a pasar un rato...

Si no fuese por la compañía de todos vosotros en el laboratorio no hubiese invertido mi tiempo en este proyecto. Todas estas personas hicieron que la época en la que estuve en el Fisiología fuese una bonita etapa de mi vida que recuerdo nostálgicamente.

A mi familia. A mis padres, siempre me sorprende lo orgullosos que están de mis logros, yo también lo estoy de ellos. A las personas a las que esta tesis les robó tiempo de estar conmigo. Especialmente a Noel que no se cansó de recordármelo. A Amil que lo perdona todo al instante. Al resto de mi familia, son muy importantes para mí. A los que no puedo evitar que sigan conmigo: Otilia y Xerome.



# ABREVIATURAS

---





**1,25 D:** 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub>

**3-epiVD:** 1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-3-epi-vitamina D<sub>3</sub>

**BCL2:** gen que codifica a la proteína “B-cell lymphoma 2” (Bcl-2)

**BRCA1:** gen que codifica a la proteína susceptible 1 de cáncer de mama (“Breast cancer type 1 susceptibility protein”, BRCA1)

**COX-2:** ciclooxigenasa-2 o “prostaglandin-endoperoxide synthase 2”

**CYP24A1:** enzima 1 $\alpha$ -hidroxilasa (hidroxila la 25-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub> en posición 1)

**CYP27B1:** enzima 24-hidroxilasa (interviene en el catabolismo de 1,25D)

**DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol (“4,6-diamidino-2-phenylindole”)

**DBP:** proteína de unión a vitamina D (“Vitamin D-binding protein”)

**BrDU:** bromodeoxiuridina (“Bromodeoxyuridine”)

**EGF:** factor de crecimiento epidérmico (“epidermal growth factor”)

**EMT:** transición epithelial-mesénquimal (“Epithelial-Mesenchymal transition”)

**ERBB2:** gen que codifica el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 humano (ERBB2 o HER2)

**HER2:** receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 humano

**MCF-7:** línea celular de adenocarcinoma de mama humano (estrógeno positiva, luminal A, no metastática)

**MDA-MB-231:** línea celular de adenocarcinoma de mama humano (triple negativo, basal-like, metastática)

**MET:** transición mesénquimal-epitelial (“Mesenchymal-Epithelial Transition”)

**NF- $\kappa$ B:** factor nuclear kappa-beta (“nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”)

**Pit-1:** factor de transcripción hipofisario-1 o POU1F1 o “POU class 1 homeobox 1”

**POU1F1:** gen que codifica a POU1F1, o Pit-1, o factor de transcripción hipofisario-1 (POU class 1 homeobox 1 o POU domain, class 1, transcription factor 1)

**p53:** proteína supresora de tumores p53 (cellular tumor antigen p53)

**PBS:** tampón fosfato salino

**PI:** yoduro de propidio.

**PTH:** hormona paratiroidea

**RBI:** gen que codifica a la proteína asociada a retinoblastoma (pRb)

**RE:** receptor de estrógenos

**RP:** receptor de progesterona

**SCID:** inmunodeficiencia combinada severa (“severe combined immunodeficiency”)

**SNP’s:** polimorfismos de nucleótido único (“single nucleotide polymorphisms”)

**TP53:** gen que codifica a la proteína supresora de tumores p53 (p53)

**TNBC:** cáncer de mama triple negativo (“triple negative breast cancer”)



# RESUMEN

---





El factor de transcripción POU1F1, también conocido como Pit-1, se expresa en la glándula mamaria. Su expresión es mayor en tumores que en mama normal. La elevada expresión de Pit-1 en mama puede ser considerada como un factor pro-tumoral, correlacionándose positivamente su expresión con el desarrollo de metástasis y peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama. La 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D3 (1,25D) disminuye proliferación e incrementa diferenciación celular y apoptosis sobre células de cáncer de mama, por lo que se considera antitumoral. Sin embargo, su uso terapéutico está limitado por la inducción de hipercalcemia. La 1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-3-epi-vitamina D3 (3-epiVD) es un isómero óptico de la 1,25D que posee una actividad biológica semejante a 1,25D pero con menor actividad hipercalcémica.

En este trabajo, utilizando líneas celulares de adenocarcinoma de mama humana con o sin sobreexpresión de Pit-1, cultivos primarios de tumores de mama humana y xenoinjertos en ratones inmunodeficientes, evaluamos el efecto de la administración de 3-epiVD sola o combinada con quimioterapia sobre la progresión tumoral.

Nuestros resultados demuestran que administración de 3-epiVD, tanto de forma aislada como en combinación con cisplatino, inhibe la proliferación celular y el crecimiento tumoral in vivo e in vitro sin inducir hipercalcemia. La actividad anti-tumoral es significativamente mayor en tumores con sobreexpresión de Pit-1.

Nuestros datos sugirieron que el tratamiento con 3-epiVD sola o en combinación con cisplatino puede ser eficaz en tumores de mama, y que la expresión de Pit-1 en dichos tumores pudiera emplearse como factor predictor de respuesta a este fármaco.







<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1, GLÁNDULA MAMARIA Y CÁNCER DE MAMA.....	1
1.1. Anatomía de la mama.....	1
1.2. Cáncer de mama.....	2
1.2.1. Incidencia, prevalencia y mortalidad.....	2
1.2.2. Biología molecular y oncogénesis.....	3
1.2.3. Factores de riesgo.....	5
1.2.4. Histología.....	7
1.2.5. Estadiaje tumoral.....	8
1.2.6. Subtipos de cáncer de mama.....	9
1.2.7. Tratamiento del cáncer de mama.....	12
1.2.7.1. Cirugía.....	12
1.2.7.2. Radioterapia.....	13
1.2.7.3. Hormonoterapia.....	13
1.2.7.4. Quimioterapia.....	15
1.2.7.5. Terapias biológicas.....	16
2. FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN HIPOFISARIO-1 (PIT-1).....	16
2.1. Pit-1 en neoplasias de mama.....	17
3. VITAMINA D.....	18
3.1. Generalidades.....	18
3.2. Vitamina D y cáncer.....	22
3.3. Vitamina D y cáncer de mama.....	23
3.4. Problemas del tratamiento con vitamina D.....	25
3.5. Análogos de vitamina D: 1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-3-epi-vitamina D <sub>3</sub> .....	26
4. RELACIÓN ENTRE PIT-1 Y VITAMINA D.....	28
<b>OBJETIVOS</b> .....	31
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	35
1. CULTIVOS CELULARES.....	37
2. PLÁSMIDOS Y TRANSFECCIONES.....	38
3. ENSAYO REPORTADOR DE LUCIFERASA.....	39
4. TRATAMIENTOS CELULARES.....	40
5. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR POR INCORPORACIÓN DE BROMODEOXIURIDINA (BRDU).....	40
6. ENSAYO DE VIABILIDAD/PROLIFERACIÓN CELULAR (MTT).....	41
7. EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADNC.....	41
8. PCR Y PCR A TIEMPO REAL (QPCR).....	42
9. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA Y WESTERN BLOT.....	43
10. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR.....	44
11. ANÁLISIS DE APOPTOSIS MEDIANTE ANEXINA V.....	45
12. DETERMINACIÓN DE LA CALCEMIA <i>IN VIVO</i> .....	46
13. EXPERIMENTOS DE XENOINJERTOS EN RATONES INMUNODEFICIENTES....	46
14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	48

<b>RESULTADOS</b> .....	49
1. EXPRESIÓN DE PIT-1 EN LÍNEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA DE MAMA HUMANA.....	51
2. EXPRESIÓN DE VDR EN LÍNEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA DE MAMA HUMANA.....	52
3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE 3-EPIVD CON RELACIÓN A 1,25D.....	53
4. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON 1,25D O 3-EPIVD SOBRE LOS NIVELES DE CALCIO EN SANGRE.....	53
5. EXPRESIÓN DE PIT-1 EN LÍNEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA DE MAMA TRAS TRATAMIENTO CON 1,25D Y 3-EPIVD.....	54
6. EFECTO DE 1,25D Y 3-EPIVD SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	55
7. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON 1,25D Y 3-EPIVD EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE MAMA CON Y SIN SOBREEXPRESIÓN DE PIT-1 <i>IN VIVO</i> .....	56
8. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON 3-EPIVD Y QUIMIOTERAPIA SOBRE VIABILIDAD/PROLIFERACIÓN CELULAR <i>IN VITRO</i> .....	58
9. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON 3-EPIVD Y CISPLATINO SOBRE VIABILIDAD/PROLIFERACIÓN CELULAR <i>IN VITRO</i> .....	61
10. ESTUDIO DE CICLO CELULAR EN CÉLULAS MCF-7 TRAS EL TRATAMIENTO CON CISPLATINO Y 3-EPIVD.....	64
11. ESTUDIO DE APOPTOSIS EN CÉLULAS MCF-7 TRAS EL TRATAMIENTO CON CISPLATINO Y 3-EPIVD.....	65
12. EFECTO <i>IN VIVO</i> DE LOS TRATAMIENTOS CON CISPLATINO Y 3-EPIVD.....	66
13. ENSAYO MTT EN CULTIVOS PRIMARIOS DE TUMORES DE MAMA TRATADOS <i>IN VITRO</i> CON 3-EPI VD, CISPLATINO O UNA COMBINACIÓN DE AMBOS.....	68
<b>DISCUSIÓN</b> .....	71
<b>CONCLUSIONES</b> .....	83
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	87
<b>ANEXOS</b> .....	103
ANEXO I: COPIA AUTORIZACIÓN COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA.....	103
ANEXO II: COPIA AUTORIZACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN ANIMAL.....	105

# INTRODUCCIÓN

---





# 1. GLÁNDULA MAMARIA Y CÁNCER DE MAMA

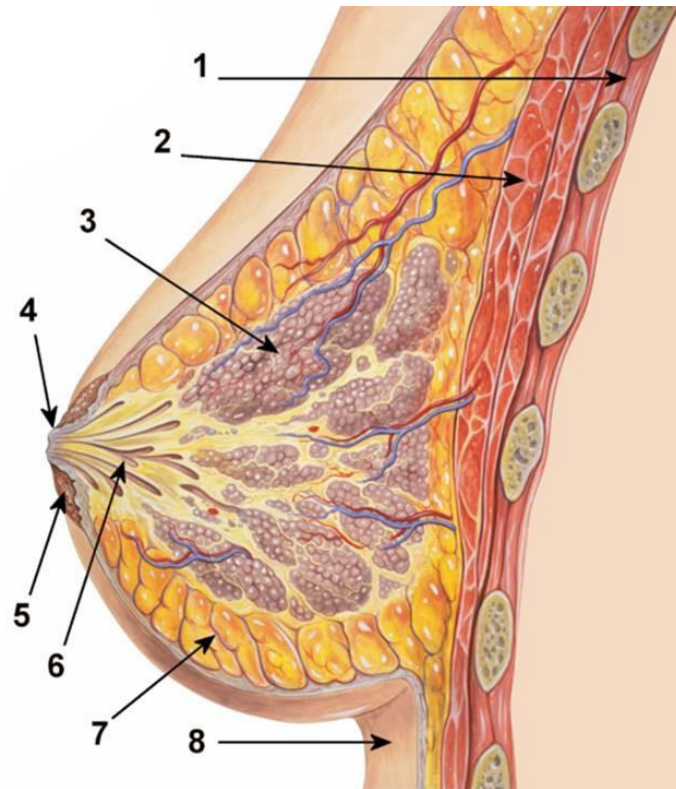
## 1.1. Anatomía de la mama

La mama es una glándula par, situada sobre la pared torácica entre la segunda y sexta costilla y entre el borde esternal y la línea media axilar. Está formada por tejido glandular e intersticial.

Las glándulas mamarias están compuestas por 4-18 lóbulos, cada uno de los cuales desemboca en el pezón a través de un conducto galactóforo. Los lóbulos mamarios se subdividen en lobulillos, conformados por epitelio tubular que en su porción más distal forma dilataciones saculares revestidas de epitelio alveolar constituyendo los alveolos mamarios (Figura 1).

El epitelio está formado por dos tipos de células: las células epiteliales y las células mioepiteliales, ambas rodeadas de una membrana basal. Las células mioepiteliales están presentes en la porción más periférica de la glándula y tienen origen ectodérmico, poseen miofibrillas y receptores de oxitocina. Durante la lactancia, en respuesta a la estimulación del pezón se libera oxitocina en la neurohipófisis, que estimula la contracción de las células mioepiteliales favoreciendo la eyección de leche.

Embriológicamente, el epitelio de la glándula mamaria tiene origen ectodérmico, mientras que el tejido fibroadiposo tiene origen en el mesodermo. En la pubertad, por el efecto de los estrógenos y progesterona, se desarrolla el parénquima y el estroma de la mama, elongándose y ramificándose los ductos hasta alcanzar su estructura adulta. Durante el embarazo, los estrógenos, progesterona y lactógeno placentario estimulan el crecimiento mamario. Tras el parto el descenso hormonal facilita el inicio de la secreción láctea que se mantiene gracias a los efectos de prolactina y oxitocina (Fernández-Cid, A., 2000).



**Figura 1.** Esquema de la estructura de la mama: 1, pared torácica; 2, pectoral mayor; 3, glándula mamaria; 4, pezón; 5, areola; 6, conductos galactóforos; 7, tejido adiposo; 8 piel. (Modificado desde la imagen original de Patrick J. Lynch, uso permitido bajo licencia Creative Commons Atribución 3.0 Unported)

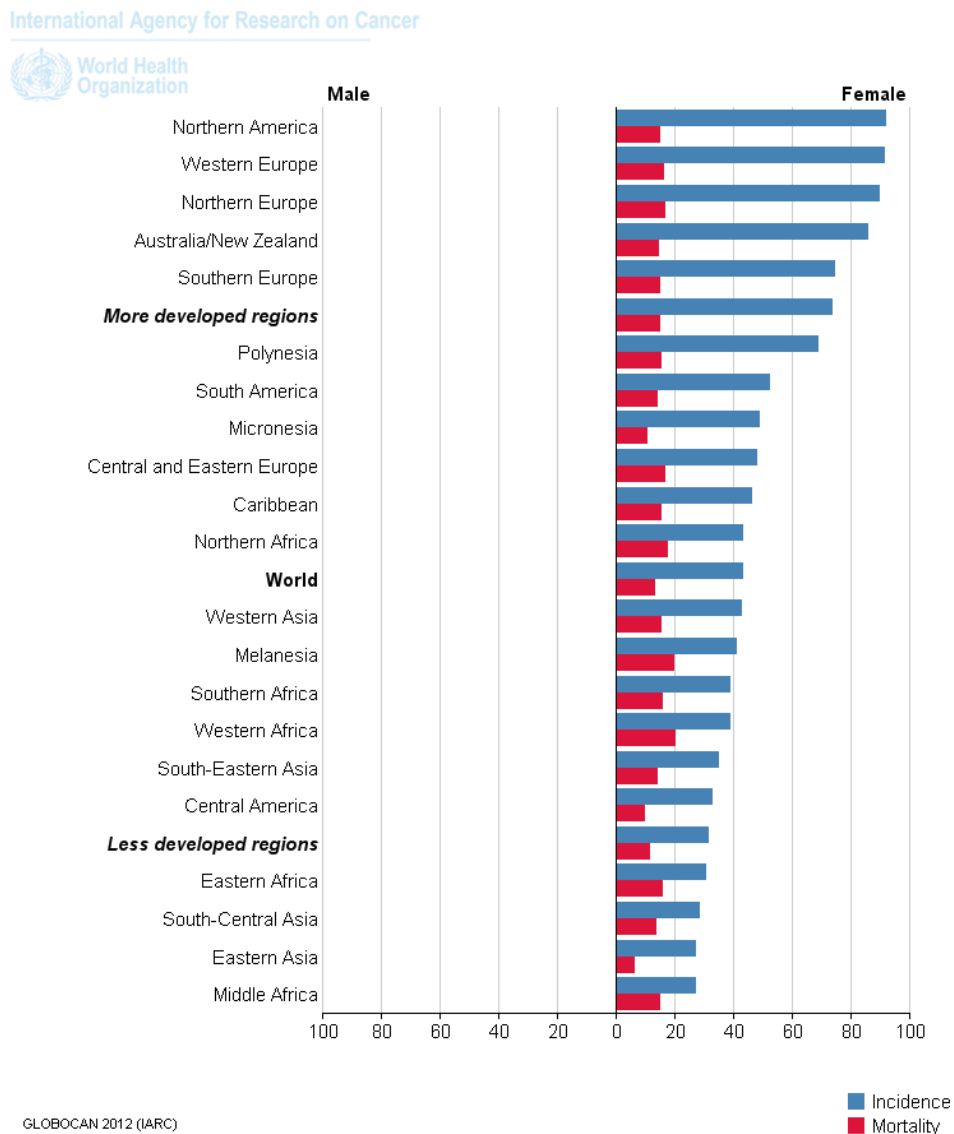
## 1.2. Cáncer de mama

### 1.2.1. Incidencia, prevalencia y mortalidad

El cáncer de mama es el segundo cáncer en frecuencia en el mundo y, con diferencia, el tumor maligno más frecuente en mujeres con una estimación de 1,67 millones de nuevos casos diagnosticados en 2012 en todo el mundo (lo que representa el 25 % de todos los cánceres). Las tasas de incidencia varían y casi se cuadruplican entre los 27 por 100.000 en África Central hasta los 96 por 100.000 en Europa Occidental (Ferlay *et al.*, 2015) (Figura 2).

El 78% de las mujeres que padecen un cáncer de mama en España, sobreviven más de 5 años desde el diagnóstico. Se trata de una supervivencia global, sin tener en cuenta edad,

tipo histológico o fase de la enfermedad. Se estima que en España fallecen unas 6.080 mujeres al año por cáncer de mama (Ferlay *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Incidencia de cáncer de mama en distintas áreas geográficas (Globocan 2012). Con permiso de Elsevier.

### 1.2.2. Biología molecular del cáncer y oncogénesis

La transformación de una célula normal del organismo a una célula tumoral acontece por un daño a nivel de ADN, congénito o adquirido, de modo que se acumulan mutaciones

genéticas que permiten a la célula sobrevivir y multiplicarse evitando los mecanismos reguladores del organismo. El cáncer generalmente se asocia a alteraciones en múltiples genes. Es frecuente que se afecten los mecanismos de reparación de ADN de modo que las células presentan inestabilidad genómica, lo que facilita que se acumulen mutaciones deletéreas que favorecen el desarrollo tumoral. Las mutaciones del ADN pueden producir:

- activación de oncogenes, como receptores de los factores de crecimiento, factores de crecimiento, proteínas de señalización intracelular, etc.
- inactivación de genes supresores como *P53*, *P16*, *APC*, *NF1*, *RBI*, *PTEN*.
- alteración de genes responsables de la estabilidad del genoma, como los genes reguladores de la apoptosis (*BCL2*, *BAD*, *BAX*) o genes reparadores de ADN (*BRCA*) (Hanahan *et al.*, 2011).

Las células cancerosas también presentan cambios epigenéticos que favorecen la adquisición de un fenotipo tumoral. Las alteraciones epigenéticas son cambios en el ADN que no afectan a la secuencia, pero sí la expresión de éste (Karsli-Ceppioglu *et al.*, 2014).

Las alteraciones acumuladas a nivel genético o epigenético van a hacer que las células puedan adquirir un fenotipo caracterizado por:

- inmortalidad.
- inestabilidad genética.
- proliferación independiente de señales reguladoras del organismo.
- pérdida de inhibición por contacto.
- capacidad de invadir tejidos circundantes y a distancia (metástasis).
- capacidad de inducir neoangiogénesis.

Por otra parte, las células cancerosas se relacionan entre sí y con las células del tejido en el que se desarrollan (macrófagos, fibroblastos, etc.) estableciendo relaciones intercelulares, lo que se conoce como microambiente tumoral. Por ejemplo, las células del tumor pueden estimular a las células del estroma para que secreten factores de crecimiento o enzimas de degradación favorecedores del crecimiento y diseminación tumoral (Hanahan *et al.*, 2011).

Las metástasis son el principal mecanismo por el que un tumor desencadena la muerte del individuo. Las células cancerosas capaces de metastatizar, frecuentemente, presentan pérdida de expresión de proteínas de adhesión intercelular. El proceso de metástasis se

entiende como un proceso en múltiples fases que comienza con la invasión local de los tejidos circundantes al tumor, intravasación de las células tumorales en vasos linfáticos o hemáticos, tránsito a través del sistema circulatorio, extravasación de las células del sistema circulatorio a un órgano distante, formación de micrometástasis y finalmente crecimiento de estos grupos celulares en macrometástasis (Hanahan *et al.*, 2011). En este proceso de metástasis, ha sido demostrado que juega un papel clave la denominada transición epitelial-mesenquimal (EMT). La EMT es un programa evolutivo presente en condiciones fisiológicas en el desarrollo embrionario y procesos de reparación de heridas por el que las células epiteliales adquieren características fenotípicas de células mesenquimales. Las células cancerosas pueden adoptar características de este programa para adquirir cualidades de invasividad, resistencia a apoptosis y para facilitar su diseminación (Hanahan *et al.*, 2011, Kalluri *et al.*, 2009).

Los tumores epiteliales de mama crecen en un primer momento confinados a la mama intraductalmente e infiltrando el parénquima subyacente, siguiendo los conductos, tejido fibroso y grasa adquiriendo frecuentemente una morfología espiculada. El cáncer de mama disemina a los ganglios linfáticos, por orden de frecuencia: axilares, de mamaria interna y supraclaviculares. Por vía hematógena puede dar metástasis en hueso, pulmón, hígado y cerebro (Fernández-Cid *et al.*, 2000).

### 1.2.3. Factores de riesgo

Se han propuesto una serie de factores de riesgo estadísticamente asociados a mayor incidencia de cáncer de mama (AIHW, 2009). Los más importantes son:

a) Edad. El riesgo de cáncer de mama aumenta de manera casi lineal con la edad. La mayoría de los casos (70-80%) se diagnostican después de los 50 años, con un máximo entre los 45 y los 65.

b) Factores demográficos. La incidencia de cáncer de mama varía en las distintas zonas del mundo, de 92 casos /100.000 mujeres al año en Estados Unidos, hasta los 27 casos/100.000 mujeres/año en África central (Ferlay *et al.*, 2013).

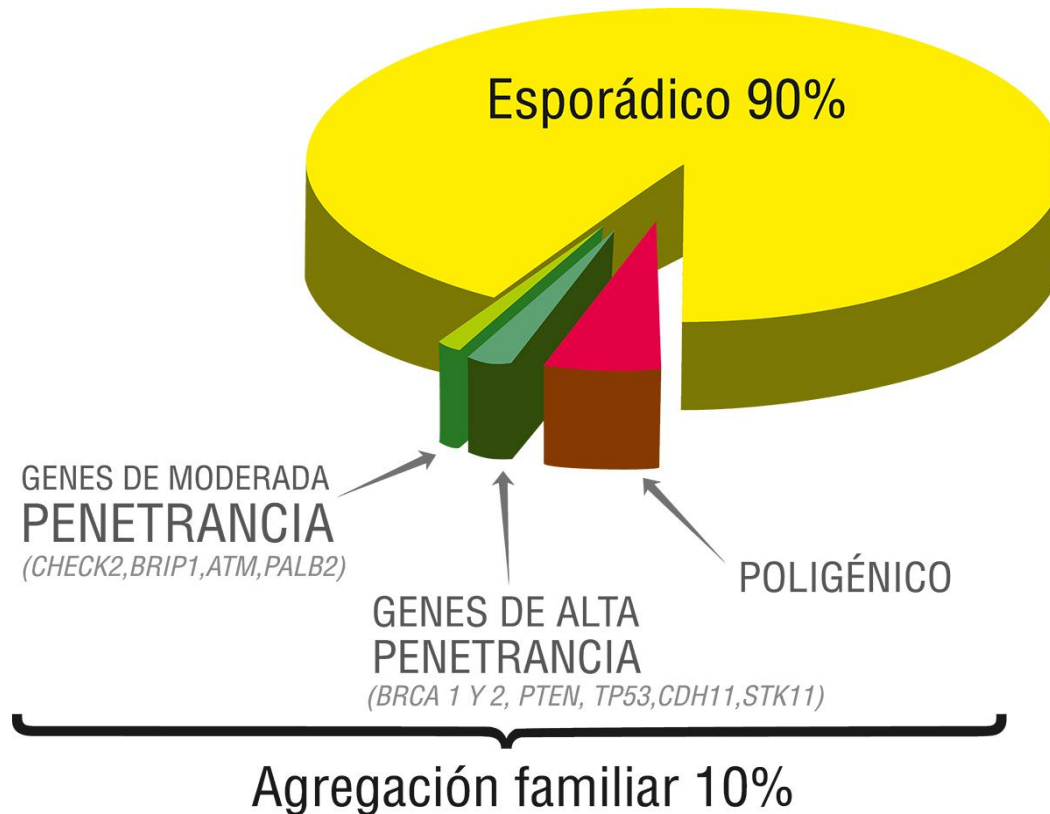
c) Raza. El cáncer de mama se presenta a edades más tempranas y con mayor mortalidad en mujeres afroamericanas.

d) Historia ginecológica. La menarquia temprana, menopausia tardía, mayor edad al primer embarazo a término y la nuliparidad representan factores estadísticamente asociados a mayor riesgo de cáncer de mama. El hecho de dar lactancia materna es protector contra cáncer de mama siendo este efecto más importante cuanto mayor sea su duración (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002).

e) Antecedentes familiares. Cuando existen familiares de primer grado afectos de cáncer de mama se incrementa el riesgo personal de padecer esta enfermedad a lo largo de la vida. Este riesgo se incrementa con el número de familiares afectos. Sin embargo, el 90% de los casos son esporádicos. La mayor parte de los familiares de personas afectas nunca presentará la enfermedad.

El 10% de los casos de cáncer de mama presenta un patrón de agregación familiar. De ellos sólo en un 30 % se encuentran mutaciones en genes de alta penetrancia (*BRCA 1 y 2, PTEN, TP53, CDH11, STK11*) que codifican proteínas que intervienen en la estabilidad genómica. Estas mutaciones confieren un riesgo de un 80% a lo largo de la vida de padecer un cáncer de mama. Adicionalmente, un 2-4% de los casos se explica por mutaciones en genes de moderada penetrancia *CHECK 2, BRIP, ATM, PALB2*. El resto de los casos se explican por un patrón de herencia poligénico, habiéndose identificado un pequeño número de SNP's (polimorfismos de nucleótido único). Los modelos de predicción sugieren que es poco probable que existan otras mutaciones en genes de alta penetrancia desconocidas hasta el momento.

f) Antecedentes personales. El antecedente de cáncer de mama incrementa el riesgo de presentar cáncer de mama ipsi y contralateral. Así también, las lesiones proliferativas atípicas y el carcinoma *in situ* de mama, incrementan el riesgo de presentar carcinoma infiltrante. Otro tipo de neoplasias como el cáncer de endometrio, ovario y colon, se asocian a mayor riesgo de cáncer de mama. La obesidad y el consumo de alcohol se asocian a incremento del riesgo. La irradiación mamaria antes de los 40 años, como puede ser el tratamiento con radioterapia torácica por un linfoma de Hodgkin, también incrementa el riesgo de neoplasias de mama (Fernández-Cid *et al.*, 2000).



**Figura 3.** Cáncer de mama esporádico y cáncer de mama con agregación familiar indicando el porcentaje de casos atribuible a cada grupo.

El tratamiento con hormonas exógenas en pacientes menopáusicas se ha asociado con mayor riesgo de cáncer de mama. En 2002 el estudio WHI (Women's Health Initiative), un estudio prospectivo, randomizado y placebo controlado realizado en 10.000 mujeres, demostró una mayor incidencia de cáncer de mama en mujeres que usaron durante 4 años o más terapia hormonal sustitutiva con estrógenos y progestágenos (Rossouw *et al.*, 2002).

#### 1.2.4. Histología

En la mama se pueden presentar neoplasias primarias o metastásicas. Las más frecuentes son las primarias, concretamente las de origen epitelial. Así, los adenocarcinomas incluyen más del 99% de las neoplasias mamarias. Otras variedades menos frecuentes son los sarcomas, carcinosarcomas y linfomas.

Las lesiones proliferativas de origen epitelial pueden clasificarse histológicamente en:

- Hiperplasias: son lesiones caracterizadas por una proliferación excesiva del epitelio.

Histológicamente se traduce en la presencia de tres o más capas de células sobre la membrana basal. Se denomina hiperplasia atípica cuando la proliferación es clonal y asocia cambios citológicos y estructurales, como incremento de la relación núcleo-citoplasma, células más redondas y uniformes, y un patrón de crecimiento a veces papilar o cribiforme (Grases, 2003).

- Carcinomas *in situ*: son proliferaciones clonales de células epiteliales atípicas que respetan la membrana basal. Se distinguen dos tipos: ductal y lobulillar. Clásicamente denominados así por el parecido de su patrón de crecimiento a los ductos y lobulillos normales. Los datos científicos indican que ambos tumores se originan en la unidad ductolobulillar terminal y sus patrones de crecimiento reflejan diferencias en las características biológicas de sus células (Kumar *et al.*, 2015).

- Carcinomas infiltrantes: se caracterizan por proliferaciones de células epiteliales que sobrepasan el límite de la membrana basal e infiltran los tejidos circundantes. La mayor parte corresponden a carcinomas infiltrantes sin especificación (NST, “No Special Type”), que representan un grupo de tumores heterogéneos no clasificables. El resto pueden clasificarse en subtipos histológicos según sus características morfológicas. La OMS reconoce al menos quince subtipos (lobulillar, tubular, mucinoso, medular, micropapilar, metaplásico, etc...) (Kumar *et al.*, 2015). A los tumores infiltrantes se les asigna un grado tumoral según sus características morfológicas microscópicas. Se valora la formación de túbulos, pleomorfismo nuclear e índice mitótico y según estas características se asigna un grado histológico 1, 2 o 3 (Elston *et al.* 1991).

### 1.2.5. Estadiaje tumoral

Los tumores de mama se estadifican siguiendo la exploración clínica al diagnóstico y según los hallazgos anatomopatológicos una vez intervenidos quirúrgicamente. La clasificación TNM para los tumores de mama, incluye el tamaño tumoral, la afectación ganglionar axilar y/o cadena mamaria interna y la presencia o no de metástasis a distancia. El tamaño tumoral está relacionado con la presencia de metástasis axilares y a distancia y con la supervivencia. La supervivencia a los 5 años es cerca del 99% para tumores menores

de 1 cm, 89% para tumores entre 1 y 3 cm y 86% para tumores entre 3 y 5 cm (Cianfrocca *et al.*, 2004). En relación con el desarrollo de metástasis ganglionares, los tumores de mama pueden diseminarse a las cadenas linfáticas axilar (principalmente) y cadena mamaria interna. La presencia y número de metástasis axilares es un importante factor pronóstico en cáncer de mama. Así el 82 % de las pacientes sin afectación ganglionar está libre de enfermedad a los 5 años del diagnóstico, frente a un 45 % en caso de presentar entre 4 y 12 ganglios metastásicos (Cianfrocca *et al.*, 2004).

Clásicamente, el tratamiento del cáncer de mama incluía linfadenectomía axilar en todas las pacientes. Hoy en día se realiza biopsia selectiva del ganglio centinela, de modo que se extirpa solamente el ganglio o los ganglios que representan la primera estación de drenaje de la mama. Esta técnica permite estudiar con más precisión los principales ganglios de la axila y adaptar el tratamiento de la axila a los hallazgos en el estudio de estos ganglios. Esto ha permitido evitar la realización de linfadenectomías axilares en un gran porcentaje de mujeres, a las que este procedimiento no proporcionaba un mejor pronóstico, con los indeseables efectos secundarios que puede acarrear (disminución de la movilidad, linfedema, etc.). Finalmente, en relación con el desarrollo de enfermedad metastásica, la supervivencia a los 5 años en presencia de enfermedad metastásica es tan solo del 23,3% (Maugham, *et al.*, 2010).

#### **1.2.6. Subtipos de cáncer de mama**

En las últimas décadas se ha hecho patente que el cáncer de mama no es una sola entidad patológica, sino un grupo de entidades con diversos comportamientos moleculares, genéticos, pronósticos y de respuesta al tratamiento. Por esta razón se han propuesto diversas estrategias de clasificación del cáncer de mama para establecer categorías reproductibles que identifiquen algoritmos eficaces de tratamiento en base a características moleculares. En el año 2000 Perou propuso una clasificación en base a un perfil genético de los tumores de mama con implicaciones pronósticas y terapéuticas (Perou *et al.*, 2000). Aunque los diagnósticos genéticos o moleculares son una herramienta diagnóstica elegante, predictiva y eficaz, tienen un elevado coste económico y no están disponibles en todas las instituciones. Se ha intentado, en la práctica clínica, una aproximación a dicha

clasificación a través de marcadores clínico-patológicos como son la expresión de receptores de estrógenos, progesterona, HER2 y Ki-67. Así, se clasifican los tumores según su perfil inmunohistoquímico en luminal A, luminal B, HER2 o triple negativo (Goldhirsch *et al.*, 2013) (Figura 4). Esta clasificación tiene implicaciones pronósticas y se emplea para la selección del tratamiento óptimo en cada caso individual de cáncer de mama.

Los subtipos luminales A y B expresan genes de un modo similar al epitelio de la mama y representan los tumores que se denominan clínicamente “receptor de estrógenos positivo”. La nomenclatura luminal se refiere a la similitud en el patrón de expresión génica entre estos tumores y el epitelio luminal de la mama. Ambos son los subtipos más frecuentes, se caracterizan por la expresión de receptores de estrógenos, progesterona y genes relacionados con la activación de los receptores de estrógenos. Sin embargo, existen importantes diferencias tanto a nivel molecular como pronósticas entre los tumores luminal A y B.

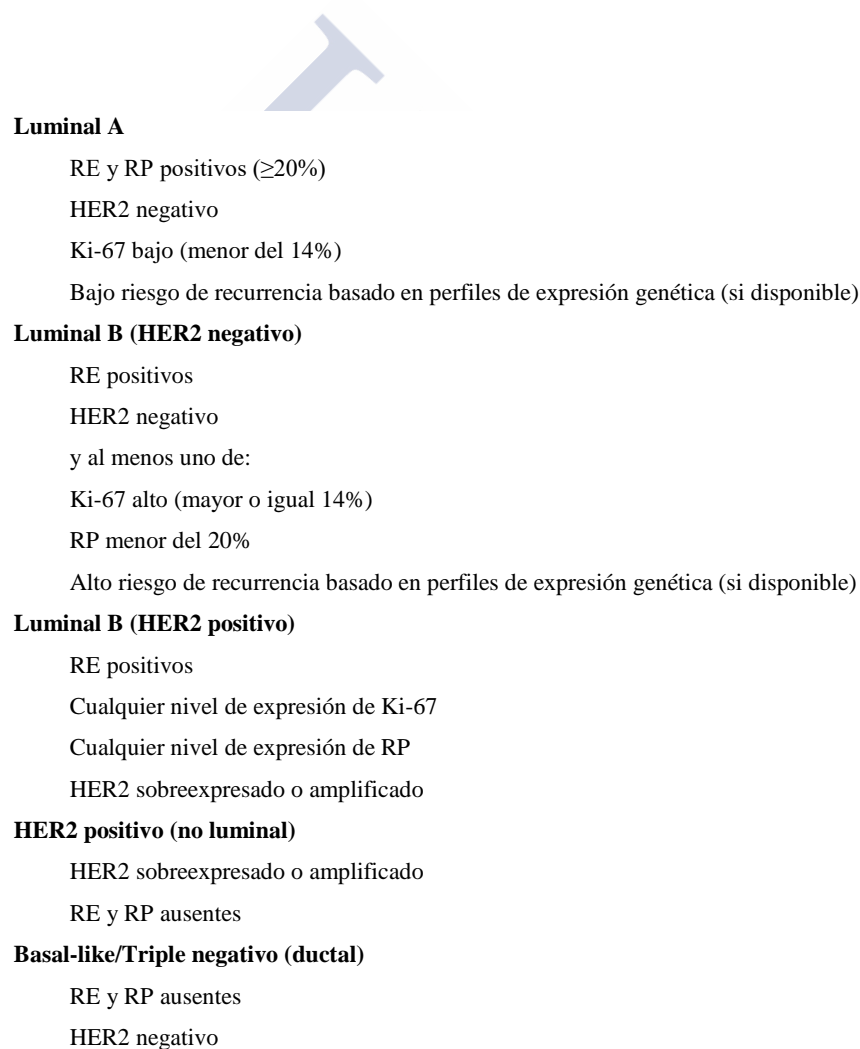
Los tumores del tipo luminal A implican el 40% de los cánceres de mama, tiene alta expresión de genes relacionados con los receptores de estrógenos, baja expresión de genes relacionados con HER2 y baja expresión de genes relacionados con proliferación. Son el subtipo más frecuente y, en general, conllevan el mejor pronóstico de todos los cánceres de mama (Goldhirsch *et al.*, 2013; Prat *et al.*, 2013; Maisonneuve *et al.*, 2014).

Los tumores luminal B presentan una menor expresión de genes relacionados con el receptor de estrógenos, expresión variable de HER2 y mayor expresión de genes relacionados con proliferación celular. Los tumores luminal B tienen peor pronóstico y altas tasas de recurrencia, en relación a los tumores luminal A. Los tumores luminales B se subclasifican según presenten sobreexpresión o no de HER2 como “luminal B HER2 positivo” o “luminal B HER2 negativo”, puesto que los primeros se benefician de tratamientos específicos dirigidos contra esta vía de señalización (Goldhirsch *et al.*, 2013; Prat *et al.*, 2013; Maisonneuve *et al.*, 2014).

Los tumores HER2 positivos son tumores con sobreexpresión de genes relacionados con esta vía de señalización y baja expresión de genes relacionados con los tumores luminales y basales. Por esta razón estos tumores frecuentemente son negativos para receptores de estrógenos y progesterona, y positivos para HER2. Pero el subtipo molecular “enriquecido en HER2” no es sinónimo del subtipo inmunohistoquímico HER2. Mientras

que la mitad de los tumores HER2 son genéticamente tumores HER2 enriquecidos, la otra mitad puede incluir cualquier subtipo molecular, mayoritariamente luminal B HER2 positivo (Goldhirsch *et al.*, 2013; Prat *et al.*, 2013; Maisonneuve *et al.*, 2014).

Los tumores que no expresan receptores de estrógenos, progesterona ni HER2 se denominan triples negativos y se relacionan con carcinomas de alto grado que tienden a tener peor pronóstico que otros subtipos. Carecen de tratamiento específico, pero se caracterizan por su alta sensibilidad a la quimioterapia (Goldhirsch *et al.*, 2013; Prat *et al.*, 2013; Maisonneuve *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Subtipos clínico-patológicos de cáncer de mama (Goldhirsch *et al.*, 2013; Prat *et al.*, 2013; Maisonneuve *et al.*, 2014)

### 1.2.7. Tratamiento del cáncer de mama

El tratamiento del cáncer de mama abarca cirugía, radioterapia, hormonoterapia, quimioterapia y terapias biológicas. La selección de la combinación de estos tratamientos depende de las características del paciente, estadio y tipo tumoral.

#### 1.2.7.1 Cirugía

La cirugía clásica del cáncer de mama era la mastectomía (extirpación total de la mama) si bien en la actualidad se ha demostrado que la cirugía conservadora de la mama (extirpación del tumor con márgenes de tejido sano) seguido de irradiación tiene una supervivencia comparable a la mastectomía. Existen condiciones que indican mastectomía como son enfermedad multicéntrica, antecedente de irradiación sobre la mama (como puede ser radioterapia mediastínica por enfermedad de Hodgkin), mala relación entre el tamaño de la mama y el tumor, presencia en pruebas de imagen de microcalcificaciones en un área muy extensa de la mama o imposibilidad de administrar radioterapia (Maughan *et al.*, 2010).

Clásicamente la extirpación de los ganglios axilares (linfadenectomía axilar) se ha considerado el *gold standard* del manejo de la axila en el cáncer de mama. Este tratamiento permitía un buen control de la recidiva local y ofrecía información sobre el estado de los ganglios axilares, que es un importante factor pronóstico y útil para la selección de tratamientos adyuvantes. Pero la linfadenectomía axilar es un procedimiento con importantes efectos secundarios como linfedema y restricción de la movilidad del hombro. Actualmente la biopsia selectiva del ganglio centinela es el tratamiento estándar de las pacientes sin metástasis ganglionares clínicas. En estas pacientes, el análisis anatomopatológico del ganglio centinela ha demostrado ser capaz de identificar el estado de los ganglios axilares con menos complicaciones que la linfadenectomía axilar. De modo que las pacientes con ganglios centinela negativos no precisan linfadenectomía axilar. Las pacientes con dos o menos ganglios centinela positivos sin afectación extracapsular que recibirán terapia adyuvante sistémica y a las que se le ha realizado cirugía conservadora de la mama no presentan peor supervivencia si se omite la linfadenectomía axilar (estudio

ACOSOG Z0011, Giuliano *et al.*, 2010). Las pacientes con ganglios axilares clínicamente positivos se benefician de la combinación de cirugía y radioterapia axilares. Las pacientes con ganglios clínicamente negativos pero positivos en biopsia de ganglio centinela no incluidos en los criterios del ACOSOG Z0011 se benefician de linfadenectomía axilar o radioterapia axilar (Zhang *et al.*, 2016).

### **1.2.7.2. Radioterapia**

La radioterapia en cáncer de mama se emplea en distintos campos, dosis y esquemas según el tamaño del tumor y la afectación axilar. La cirugía conservadora de la mama se acompaña generalmente de irradiación de toda la mama con sobreimpresión sobre el lecho tumoral. En pacientes mastectomizadas con tumores mayores de 5 cm y/o presencia de metástasis ganglionares axilares puede estar indicada la irradiación del lecho de mastectomía (pared torácica) con o sin irradiación axilar y supraclavicular. La indicación de irradiación de la axila es clara cuando se presentan cuatro o más ganglios axilares metastatizados, y en algunos casos en que los que hay entre uno y tres ganglios afectados (Jagsi, R., 2014).

### **1.2.7.3. Hormonoterapia**

Los tumores con receptores de estrógeno (RE) positivo pueden tratarse con fármacos que inhiben esta vía de señalización. Para ello se dispone de diversos compuestos que actúan por distintos mecanismos:

- Supresión de la actividad ovárica. En pacientes premenopáusicas con tumores RE positivos el bloqueo de la actividad ovárica con análogos de GnRH (también mediante ooforectomía o radioterapia) mejora la supervivencia libre de enfermedad en mujeres menores de 50 años.

- Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos. El tamoxifeno actúa como un agonista no esteroideo parcial en algunos tejidos como hígado, útero y hueso, pero es un inhibidor competitivo del receptor de estrógenos de mama y cerebro. Es el fármaco de este grupo más empleado en cáncer de mama. El tratamiento con tamoxifeno durante 5

años en mujeres con cáncer de mama y RE positivos aporta una reducción de la mortalidad del 20% en la odds ratio anual. El tratamiento extendido durante 10 años ha mostrado una discreta reducción en las tasas de recurrencia y mortalidad a largo plazo, por lo que actualmente se recomienda en mujeres pre- o perimenopáusicas (Lumachi *et al.*, 2015).

- Reguladores selectivos del receptor de estrógenos. Fulvestrant es el principal representante de este grupo de fármacos. Es un regulador de los receptores de estrógenos, de modo que causa regulación a la baja y degradación de estos receptores. Se emplea en cáncer de mama avanzado y en segunda línea de tratamiento para tumores resistentes a tamoxifeno (Lumachi *et al.*, 2015).

- Inhibidores de aromatasa. El enzima aromatasa (CYP 450 19) cataliza la conversión de andrógenos en estrógenos. En ausencia de actividad ovárica (mujeres menopáusicas o tratadas con análogos de GnRH) la principal fuente de estrógenos es la conversión periférica de andrógenos sintetizados en ovario. Así, el boqueo de la actividad aromatasa es una forma de reducir los niveles de estrógenos en estas mujeres. De acuerdo a su mecanismo de acción hay dos tipos de inhibidores de aromatasa: tipo I o inhibidores esteroideos permanentes de la actividad aromatasa (exemestano) y tipo II o inhibidores no esteroideos que inhiben reversiblemente la actividad aromatasa (anastrozol y letrozol)(Lumachi *et al.*, 2015).

Es frecuente que los tumores RE positivos desarrollen resistencia al tratamiento hormonal. Se han estudiado diversos fármacos para tratar de revertir esta situación:

- Inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas 4/6. Palbociclib es una molécula de este grupo farmacológico que mostró disminuir la progresión tumoral cuando se asociaba a letrozol en tumores de mama avanzados. Es un tratamiento aprobado como tercera línea de tratamiento en pacientes seleccionadas con tumores avanzados RE positivos.

- Moduladores epigenéticos de la histona deacetilasa. Han mostrado experimentalmente inducir apoptosis en células de cáncer de mama resistentes a tamoxifeno.

- Inhibidores de mTOR. Es frecuente que mutaciones en la vía PI3K/AKT/mTOR medien la resistencia a hormonoterapia en cáncer de mama. Por ello se han diseñado fármacos que tienen como diana esta vía, como el everolimus. En pacientes con cáncer de

mama avanzado, resistentes a inhibidores de aromatasas y tamoxifeno, everolimus puede retrasar la progresión tumoral cuando se añade a exemestano.

#### 1.2.7.4. Quimioterapia

El tratamiento citotóxico se emplea en tumores de mal pronóstico o en los que se estima ofrecerán un beneficio neto en la supervivencia de la enfermedad. *Adjuvant on line* es un programa informático que pretende ayudar a profesionales y pacientes a estimar el riesgo de recurrencia de la enfermedad según factores clínico-patológicos en ausencia y presencia de tratamiento quimioterápico, el beneficio en cuanto a riesgo de tratamiento de la terapia sistémica, así como la probabilidad de efectos secundarios. La edad del paciente y la presencia de comorbilidades son factores a tener en cuenta en la indicación o selección del tratamiento citotóxico. Son tratamientos no exentos de efectos secundarios, por lo que se trata de evitar el sobretratamiento. Por esto existe mucho interés en el desarrollo de herramientas que permitan conocer la tasa de respuesta de un tumor a quimioterapia o su pronóstico, evitando así tratar a pacientes con bajas tasas de recidiva con tratamientos tóxicos. Las pacientes con tumores HER2 puros generalmente recibirán quimioterapia concomitante al tratamiento anti HER2. Las pacientes con tumores triple negativos generalmente recibirán quimioterapia dado que no disponemos de otros fármacos específicos para su manejo. Son las pacientes con tumores que expresan receptores de estrógenos y que se tratarán con hormonoterapia en las que mayor interés tiene la estimación del beneficio de la quimioterapia. Estas pacientes se tratarán con hormonoterapia, con una tasa de recidiva variable, interesa estratificar por grupos de mujeres que tendrán una tasa de respuesta a hormonoterapia tan buena que la quimioterapia no añade ningún beneficio al tratamiento, mientras que otras tendrán recidiva a pesar del tratamiento hormonal por lo que el tratamiento adyuvante con quimioterapia puede disminuir sustancialmente la tasa de recidiva (Maughan *et al.*, 2010).

Múltiples agentes se emplean en los esquemas de tratamiento del cáncer de mama. Se ha demostrado un ligero beneficio de los regímenes con antraciclinas y taxanos sobre todo en tumores que sobreexpresan HER2 (Maughan *et al.*, 2010).

### 1.2.7.5. Terapias biológicas

Los tumores que expresan HER2 se benefician del tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-HER2 que actualmente se administra en la práctica clínica siempre tras la administración de quimioterapia. El fármaco más conocido y empleado es trastuzumab, ha demostrado mejorar la supervivencia en neoadyuvancia, adyuvancia y cáncer de mama avanzado. La combinación de dos agentes como son trastuzumab y pertuzumab ha mostrado prolongar la supervivencia en cáncer de mama avanzado respecto a un solo agente.

TDM-1 es un conjugado de trastuzumab y emtansina de modo que el anticuerpo guía al fármaco al interior de la célula donde se libera. Se ha aprobado para el tratamiento de enfermedad metastásica en segunda y tercera línea (Vorobiof, 2016).

Neratinib es un inhibidor de tirosín quinasa que tiene la ventaja de administrarse por vía oral. Se ha probado en pacientes previamente tratadas con trastuzumab en las que ha mostrado una reducción del riesgo de 50% (muerte y recurrencia) con una ventaja de dos años libres de enfermedad respecto a placebo. El inconveniente es que presenta una alta tasa de efectos secundarios (diarrea, fatiga, náuseas y vómitos). Se están estudiando formas de evitar estos efectos secundarios conservando sus efectos beneficiosos (Vorobiof, 2016).

Recientemente se ha desarrollado un compuesto biosimilar a trastuzumab, MYL-14010 que ha demostrado similar eficacia en cáncer de mama metastásico, efectos secundarios y biodisponibilidad con un costo económico que permitiría su acceso en países con baja renta per cápita (Vorobiof, 2016).

## 2. FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN HIPOFISARIO-1 (Pit-1)

Pit-1 es un factor de transcripción perteneciente al grupo de proteínas reguladoras del desarrollo. Consta de un dominio compartido con los factores OCT-1 y -2 y UNC-86 con los que forma el subgrupo denominado POU (Herr *et al.*, 1988). Es un factor crucial para el desarrollo embriológico del lóbulo anterior de la hipófisis. Participa en la proliferación, diferenciación y secreción hormonal de células somatotropas y lactotropas (Lefevre *et al.*, 1987, Nelson *et al.*, 1988). Ratones mutantes, en los que no se expresa Pit-1, muestran

hipoplasia de la hipófisis anterior y enanismo (Li *et al.*, 1990), hecho que destaca la importancia de este factor en la ontogénesis hipofisaria. Es, además, necesario para la transcripción de los genes de hormona de crecimiento (GH), prolactina (PRL) y la subunidad alfa de la hormona estimulante del tiroides ( $\alpha$ -TSH) (Haugen *et al.*, 1993, Mangalam *et al.*, 1989). Algunos autores han observado mayor expresión de Pit-1 en tumores hipofisarios respecto a hipófisis normales (Asa *et al.*, 1993, Delhase *et al.*, 1993b, Sanno *et al.*, 1996). Además, se ha asociado específicamente la expresión de esta proteína con mayor índice de proliferación (Castrillo *et al.*, 1991).

Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor

## 2.1. Pit-1 en neoplasias de mama

Se ha demostrado la expresión de Pit-1 en tejidos distintos a la hipófisis, como placenta y tejidos hematopoyéticos (Bamberger *et al.*, 1995, Schanke *et al.*, 1997, Delhase *et al.*, 1993a), en líneas celulares de cáncer de mama (Gil-Puig *et al.*, 2002), mama normal y adenocarcinoma de mama (Gil-Puig *et al.*, 2005). La expresión de Pit-1 está significativamente incrementada en tumores mamarios respecto al tejido normal (Gil-Puig *et al.*, 2002). *In vitro*, la sobreexpresión de Pit-1 en líneas celulares de adenocarcinoma de mama, incrementa la proliferación celular, disminuye la apoptosis e incrementa la invasión y migración celular (Gil-Puig *et al.*, 2005, Ben-Batalla *et al.*, 2010a). *In vivo*, la sobreexpresión de Pit-1 en líneas celulares de cáncer de mama inyectadas en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) favorece significativamente el crecimiento tumoral, así como el desarrollo de metástasis pulmonares (Ben-Batalla *et al.*, 2010b). Además, se ha demostrado que Pit-1 favorece el proceso de transición epitelial-mesenquimal (EMT), aumentando la expresión de Snail y de marcadores mesenquimales, como vimentina, y disminuyendo la expresión de marcadores epiteliales, como citoqueratinas AE1-AE3, 19 y E-cadherina, facilitando así el desarrollo de metástasis a distancia (Ben-Batalla *et al.*, 2010b). Finalmente, en muestras de pacientes con cáncer de mama y metástasis ganglionares axilares, se ha demostrado una relación negativa significativa entre la expresión de Pit-1 y el intervalo de supervivencia libre de enfermedad

(Ben-Batalla *et al.*, 2010b, Gao *et al.*, 2016).

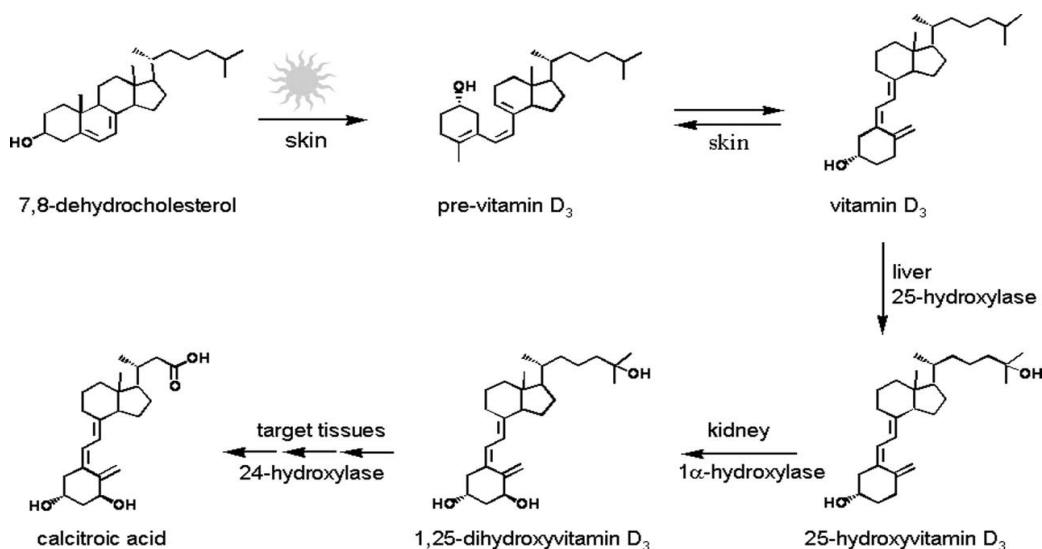
En conjunto, estas observaciones sugieren que Pit-1 pudiera representar un papel significativo, en el desarrollo y progresión de neoplasias de mama.

### 3. VITAMINA D

#### 3.1. Generalidades

La vitamina D es una hormona esteroidea conocida por su actividad reguladora de la homeostasis fosfocálcica, metabolismo óseo y otras funciones fisiológicas. El proceso de síntesis se inicia en la piel con la conversión de 7-dehidrocolesterol a colecalciferol con exposición a la radiación ultravioleta B. El proceso de síntesis y activación de la hormona está estrechamente regulado. El colecalciferol, o su derivado vegetal, el ergocalciferol, pasan a la circulación, bien tras síntesis cutánea o por absorción intestinal del aporte dietético, donde se unen a la proteína de unión de vitamina D (DBP). A nivel hepático, sufre una primera hidroxilación dando lugar a 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (calcidiol), que es la forma de vitamina D más abundante en la circulación. Posteriormente sufrirá una hidroxilación en posición 1 en el riñón, por medio de la 1- $\alpha$ -hidroxilasa, produciéndose 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> [calcitriol, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, a partir de ahora 1,25D], que es el metabolito más activo de la vitamina (Christakos *et al.*, 2016) (Figura 5).

La principal vía de degradación del calcitriol es la hidroxilación a 1 $\alpha$ ,24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> por el citocromo P450 24-hidroxilasa, produciendo ácido calcitriólico. Este enzima está presente en varios de los tejidos diana de la vitamina D y es inducido por la propia hormona. En menor medida, se produce la degradación por oxidación del carbono 23 o 26 (Christakos *et al.*, 2016). Se ha descrito otra forma de degradación que se inicia por epimerización del grupo hidroxilo del carbono 3 del anillo A (Sekimoto *et al.*, 1999). En este manuscrito, de modo general, cuando mencionamos vitamina D, nos referimos a la forma 1,25D.



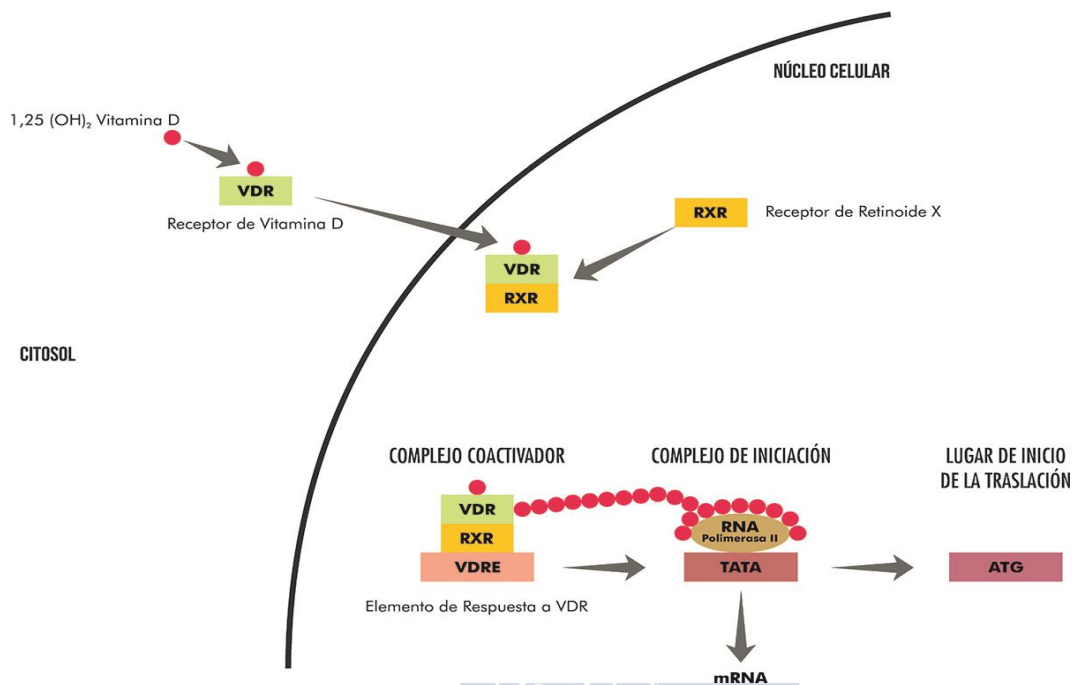
**Figura 5.** Metabolismo de la vitamina D. La vitamina D ingresa en el organismo a través del aporte dietético, o bien a partir de transformación cutánea del 7-dehidrocolesterol. Para ejercer sus funciones es preciso que sea activada, a través de una 25-hidroxilación a nivel hepático y una 1-hidroxilación a nivel renal. Uso permitido por Wikipedia.

Las acciones clásicas de la vitamina D se describen a nivel de la homeostasis del calcio y metabolismo óseo. En condiciones de hipocalcemia se estimula la liberación de paratohormona (PTH), que activa la 1 $\alpha$ -hidroxilasa renal incrementando los niveles de 1,25D. Ésta incrementa la absorción de calcio a nivel intestinal, disminuye su excreción renal y estimula la resorción ósea. La vitamina D mantiene los niveles séricos de calcio y fosfato adecuados para la formación ósea y para el adecuado funcionamiento de la PTH. Si el calcio no está disponible a través de la dieta, los niveles se mantienen a expensas de la pérdida de hueso (Christakos *et al.*, 2016).

El déficit de vitamina D se manifiesta como raquitismo en niños y como osteomalacia en la edad adulta. Aunque la expresión clínica de este déficit es poco común, estudios epidemiológicos han demostrado que la deficiencia subclínica es sorprendentemente frecuente (Tangpricha *et al.*, 2002).

La vitamina D actúa a través de mecanismos genómicos y no-genómicos. Para efectuar sus acciones genómicas, atraviesa la membrana citoplasmática y se une a un receptor nuclear, el receptor de vitamina D (VDR). VDR es un factor de transcripción dependiente de ligando que pertenece a la superfamilia de receptores de hormonas nucleares. VDR consta de tres dominios: un dominio en dedos de zinc de unión al DNA, un dominio de activación transcripcional y un dominio de unión al ligando. Este receptor se encuentra en

el núcleo y en presencia de 1,25D sufre un cambio de conformación que le confiere la capacidad de asociarse con otros factores, preferentemente al receptor X de retinoico (RXR), formando dímeros. De esta forma se unen a secuencias específicas de ADN denominadas elementos de respuesta a vitamina D (VDREs). Estas secuencias se encuentran típicamente en regiones promotoras de genes diana para vitamina D y de este modo se regula la expresión de estos genes (Christakos *et al.*, 2016)(Figura 6).



**Figura 6.** Mecanismo de acción de la vitamina D. La 1,25D penetra en la célula, llega al núcleo y se une a su receptor, VDR. VDR forma un heterodímero con RXR, incrementando la afinidad del complejo por el elemento de respuesta de VDR (VDRE), una secuencia de nucleótidos específica en el promotor del gen regulado por vitamina D. La unión del complejo VDR/RXR a VDRE induce la unión de otras proteínas, denominadas coactivadores, al complejo. De este modo se expande hasta unirse a la ARN polimerasa II y a otras proteínas del complejo de iniciación que se encuentran asociadas a la caja TATA (u otros elementos reguladores de la transcripción). Se inicia la transcripción del gen, para producir el correspondiente ARN mensajero, que abandona el núcleo para ser traducido en la proteína correspondiente.

Por otra parte, la vitamina D también ejerce efectos no genómicos, que son independientes de la interacción receptor-ligando-ADN. Sin embargo, estas acciones pueden afectar indirectamente la transcripción genética al regular vías de señalización celular que a su vez tiene como diana factores de transcripción. Entre las acciones no

genómicas se conocen la absorción rápida intestinal de calcio, la liberación de calcio de los depósitos intracelulares, la apertura de canales de calcio y cloro voltaje-dependientes, la activación de la proteína quinasas A y C, fosfatidilinositol-3 quinasa y fosfolipasa C (Norman *et al.*, 2004).

### 3.2. Vitamina D y cáncer

Además de las funciones clásicas de la vitamina D, descritas en el metabolismo fosfocálcico, diversos estudios bioquímicos, moleculares y genéticos han demostrado su participación en otros procesos biológicos como enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus y cáncer.

En cuanto a carcinogénesis, fue en los años 80 cuando se estableció por primera vez la hipótesis de la relación entre vitamina D y cáncer al observarse que la prevalencia de cáncer colorrectal era mayor en áreas geográficas de Norteamérica que reciben menor radiación solar (Garland *et al.*, 1980). Se estudió la relación en varios tipos de cáncer y se demostró cierto tipo de asociación en cáncer de colon, mama y próstata (Grant, 2012).

El diseño e interpretación de estudios epidemiológicos sobre vitamina D presenta ciertas dificultades dadas las características de los biomarcadores que se emplean para valorar el estatus del individuo y las diferencias interindividuales. El metabolito más activo de la vitamina D es el calcitriol y es el compuesto que habitualmente se emplea para administrar a los sujetos en estudios experimentales, pero sus niveles no son un buen indicador del estatus del individuo dado que sus niveles se encuentran estrechamente regulados y no presenta importantes diferencias interindividuales. El calcidiol es el metabolito más empleado como indicador de los niveles del organismo dado que sus niveles presentan diferencias interindividuales, dependen tanto de la ingesta como de la síntesis endógena, pero se afecta por ciertas características como grasa corporal, tamaño corporal, dieta, actividad física, exposición solar y pigmentación cutánea.

En estudios prospectivos en cáncer de colon se han encontrado una relación inversa entre niveles de calcidiol e incidencia de cáncer de colon, así pacientes con mayores niveles en sangre de vitamina D presentan una reducción del riesgo de cáncer colorrectal del 30-40%. En pacientes diagnosticados de cáncer de colon se ha observado menor mortalidad

en pacientes con mayores niveles de calcidiol, aunque sin diferencia en las tasas de recurrencia (Merchan *et al.*, 2017) (Figura 7)

Lesiones precancerosas		Incidencia	Progresión tumoral	Mortalidad
Incidentes (colon)	Recurrentes (colon)	Cáncer colorrectal	Cáncer colorrectal	Cáncer colorrectal
		Cáncer de mama	Cáncer de mama	
		Cáncer de próstata	Cáncer de próstata	

**Figura 7.** Vitamina D y cáncer. La tabla muestra los contextos en los que se ha demostrado una relación entre vitamina D y distintos tumores. Las casillas coloreadas indican las situaciones en las que se ha demostrado asociación. Modificado de Jacobs *et al.*, 2016. Permitido por Ivyspring International Publisher the (Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License).

Existen estudios en cáncer de próstata en cuanto a incidencia y niveles de calcidiol, aunque las evidencias respecto a esta relación son débiles. Sí existe una evidencia razonablemente fuerte entre niveles de calcidiol y supervivencia en cáncer de próstata (Merchan *et al.*, 2017) (Figura 7).

Se ha evidenciado posible papel regulador de vitamina D en diversas vías relacionadas con desarrollo tumoral, como, por ejemplo:

- La inflamación crónica genera un entorno favorable al desarrollo tumoral. Esto se ha confirmado en cáncer de colon, hígado, pulmón, vejiga y estómago. La vitamina D ayuda a disminuir la inflamación por varios mecanismos como inhibición de NF- $\kappa$ b, inhibición de la ciclooxigenasa 2 (COX2) o disminuyendo los receptores de prostaglandinas (Bandera Merchan *et al.*, 2017).

- El calcitriol suprime BCL-2 y BCL-XL y favorece la expresión de BAX, BAK y BAD, cuyo efecto neto es favorecer la apoptosis (Bandera Merchan *et al.*, 2017).

- El calcitriol promueve la expresión de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas, disminuyendo así la proliferación celular (Bandera Merchan *et al.*, 2017).

- Sobre diferenciación celular, el calcitriol tiene la capacidad de promover diferenciación y maduración celular en algunos tipos de células neoplásicas. En células de cáncer de mama se ha evidenciado inducción de marcadores de diferenciación como ciertas proteínas de adhesión celular o caseína (Bandera Merchan *et al.*, 2017).

- Sobre angiogénesis, las células de estirpe endotelial muestran menos proliferación cuando se exponen a calcitriol, a través de la represión de la transcripción del factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$  (HIF1A) (Bandera Merchan *et al.*, 2017).

- Finalmente en relación con invasión y metástasis, se ha evidenciado una regulación negativa de calcitriol sobre tenascina C, integrina  $\beta$ 4, integrina  $\alpha$ 6, IL-6 e IL-1, NF-K $\beta$  y STAT 3, que son proteínas que facilitan el proceso de metástasis (Bandera Merchan *et al.*, 2017).

### 3.3. Vitamina D y cáncer de mama

El tejido mamario expresa la maquinaria enzimática necesaria para establecer un sistema local de señalización a través de vitamina D. También expresa VDR, que permite la transducción de esta señal. Esto hace biológicamente plausible el efecto biológico de la vitamina D sobre el tejido mamario (de La Puente-Yagüe, M *et al.*, 2018). En células ductales normales vitamina D regula diferenciación celular y lactogénesis (Suetani *et al.*, 2012).

Varios estudios han estudiado *in vitro* e *in vivo* los efectos de vitamina D sobre carcinogénesis mamaria y han encontrado un papel protector de la misma. Ratones deficientes en vitamina D, así como los knockout para VDR muestran tendencia al desarrollo de neoplasias de mama (de La Puente-Yagüe *et al.*, 2018).

El calcidiol es el metabolito de la vitamina D con vida media más larga, por ello es el compuesto que se analiza más frecuentemente como indicador de los niveles de vitamina D en el organismo. Se ha estudiado la relación entre los niveles de calcidiol en suero y la incidencia de cáncer de mama. Los resultados de los estudios disponibles son contradictorios, algunos encuentran una débil relación inversa entre niveles de calcidiol e incidencia de cáncer de mama y otros no encuentran asociación. Un análisis cuidadoso de los estudios realizados indica que la relación está presente en los estudios de casos-

controles mientras que los meta-análisis de estudios prospectivos no se encuentra tal asociación. Puede que el déficit de vitamina D sea común en pacientes obesas y con escasa actividad física que a su vez son factores de riesgo para cáncer de mama, esto explicaría que actuasen como factores de confusión mostrando asociación en los estudios caso-control. El único estudio prospectivo, randomizado y placebo controlado empleando 400UI diarias no ha mostrado reducción del riesgo de cáncer de mama. Un meta-análisis reciente no ha demostrado asociación entre polimorfismos de VDR e incidencia de cáncer de mama. Por todo ello parece poco probable que exista relación causal entre déficit de vitamina D y riesgo de cáncer de mama (Lu *et al.*, 2016).

En el contexto en el que sí hay una asociación sólida con niveles de vitamina D es en pronóstico de pacientes con cáncer de mama. Existe una relación clara y directa entre niveles de calcidiol, mayor supervivencia en pacientes con cáncer de mama y menor tasa de recidiva (Kim *et al.*, 2014, Vrieling *et al.*, 2014). En una revisión retrospectiva el tratamiento con vitamina D (10.000UI semanales) añadido a quimioterapia y trastuzumab en tumores HER2 positivos aumentó el intervalo libre de enfermedad respecto a placebo (Zeichner *et al.*, 2015).

En el contexto de tratamiento de cáncer de mama con vitamina D o sus análogos, existen varias líneas de investigación:

a) En tumores de mama hormono-sensibles calcitriol ha mostrado regular la actividad aromatasa mediante regulación transcripcional. También se ha demostrado regulación a la baja de la expresión de receptor de estrógenos. El análogo de vitamina D EB1089 ha demostrado devolver la sensibilidad a tratamiento hormonal una vez desarrollada la resistencia al mismo (puede ser mediada por la vía NF- $\kappa$ B) (Zhang *et al.*, 2017). Algunos estudios muestran que la expresión de aromatasa disminuye al tratar ratones portadores de xenoinjertos de MCF-7 con calcitriol, esta regulación se establece a nivel transcripcional. Estos efectos también se lograron con el análogo de vitamina D EB1089. Asimismo, se demostró que indirectamente calcitriol disminuye la transcripción del enzima aromatasa disminuyendo los niveles de prostaglandinas. Por otra parte, el calcitriol regula al receptor de estrógenos a la baja de un modo transcripcional. Calcitriol se ha demostrado actuar como un modulador selectivo de aromatasa, disminuyendo selectivamente la expresión de

aromatasa en cáncer de mama, pero permitiendo la síntesis de estrógenos en otros lugares en los que es deseable como es el hueso (Zhang *et al.*, 2017).

b) En tumores con sobreexpresión de HER2. Como se ha mencionado previamente, existen evidencias clínicas que apoyan el beneficio de un suplemento de vitamina D al tratamiento con trastuzumab y quimioterapia (Zeichner *et al.*, 2015). También se ha observado, a nivel experimental que el análogo BXL0124 reduce la señalización de la cascada ErbB-2 en tumores con sobreexpresión de HER2, *in vitro* e *in vivo*.

c) En tumores triple negativos. En mujeres premenopáusicas diagnosticadas de cáncer de mama los tumores triple negativos se asociaron a menores niveles de vitamina D circulante. Hay estudios que muestran respuesta a análogos de vitamina D en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, aunque en otros ensayos no se evidenció este efecto. Se cree que la diferencia está en la funcionalidad de P53, en células con p53 no funcionando la vitamina D puede tener efecto antiapoptótico (Stambolsky *et al.*, 2010). Se ha evidenciado la inducción de expresión de receptor de estrógenos en líneas celulares triples negativas por lo que podríamos estar ante una nueva estrategia de tratamiento de estos tumores, induciendo sensibilidad a tratamiento hormonal (Zhang, X. *et al.*, 2017).

En carcinomas de mama, la expresión del receptor de vitamina D tiene implicaciones pronósticas, de tal modo ha sido propuesto por algunos autores como parte de una clasificación taxonómica de los tumores de mama (Santagata *et al.*, 2014).

### 3.4. Problemas del tratamiento con vitamina D

Con los datos preclínicos disponibles se realizaron varios estudios administrando vitamina D en mielodisplasia y leucemia aguda. Aunque algunos pacientes parecían responder al tratamiento, estos datos no fueron suficientes como para desarrollar ensayos clínicos posteriores, dado que el 20-30% de los pacientes desarrolló hipercalcemia. Por ello surgieron nuevas líneas de investigación con análogos de la vitamina D, que compartan los efectos anti-proliferativos de ésta, pero evitando sus efectos hipercalcémicos (Krishnan *et al.*, 2010).

Las manifestaciones clínicas de la hipercalcemia en humanos dependen del nivel de calcio y de la velocidad de instauración. A partir de 12 mg/dl los síntomas son confusión,

astenia, estreñimiento, anorexia, náuseas y vómitos asociados a poliuria y polidipsia. Si las cifras llegan a 14 mg/dl, aparece letargia, debilidad muscular, hiporreflexia y deshidratación por poliuria intensa que puede desencadenar una crisis hipercalcémica, con shock, insuficiencia renal y coma, encontrándose a partir de estas cifras alteraciones en el electrocardiograma (ensanchamiento de la onda T, acortamiento del intervalo QT, bradicardia, bloqueo auriculoventricular y arritmias malignas) que desembocan en la muerte del paciente por parada cardíaca. Otros síntomas que pueden aparecer son pancreatitis aguda, nefrolitiasis, tubulopatía, miopatía, calcificación distrófica, hipertensión arterial, úlcus péptico, depresión y psicosis (Krishnan *et al.*, 2010).

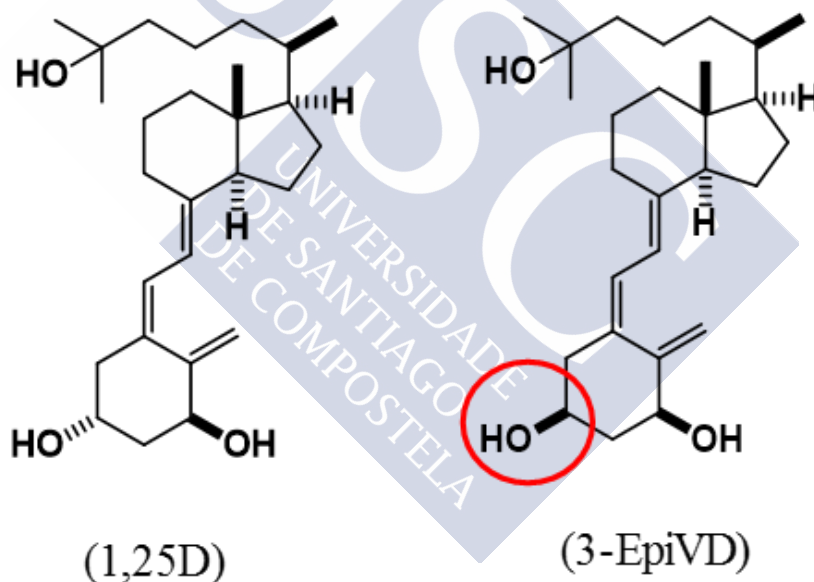
Existen estudios en los que la administración de vitamina D a dosis altas elevó las cifras de calcio en suero, aunque no se observaron efectos secundarios importantes. Se desconoce si la administración sostenida de vitamina D puede causar hipercalcemia de difícil control (Beer *et al.*, 2006).

### **3.5. Análogos de Vitamina D: 1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-3-epi-vitamina D (3-epiVD)**

Se han desarrollado numerosos análogos de la vitamina D, algunos de los cuales parecen ser eficaces en modelos experimentales de cáncer de mama, tanto *in vivo* como *in vitro*. Algunos de estos análogos son: EB1089, 22-Oxa-1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 19-nor-14-epi-23-yne-1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 19-nor-14,20-bisepi-2323-yne-1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 16-ene-23-yne-26,27-hexafluoro-1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y 1 $\alpha$ (OH)D<sub>5</sub> (Leyssens *et al.*, 2014).

Se han realizado hasta la fecha escasos ensayos clínicos en pacientes con cáncer, utilizando calcipotriol y seocalciferol (EB1089). Calcipotriol se utilizó tópicamente en metástasis de cáncer de mama, sin evidencia de efectividad. Los efectos de seocalciferol (EB1089) se ha estudiado en ensayos fase I y II. En el ensayo de toxicidad se trató a pacientes con cáncer de mama y colon avanzado, evidenciándose estabilización de la enfermedad en seis de 36 pacientes durante tres meses. Los ensayos de fase II se realizaron en pacientes con carcinoma hepatocelular y tumores pancreáticos, sin resultados concluyentes con las dosis empleadas. Se ha estudiado paricalcitol en dosis de entre 2 y 7  $\mu$ g/día en combinación con un régimen quimioterápico basado en taxanos, mostrando buena tolerancia por parte de los pacientes (Leyssens *et al.*, 2014).

La  $1\alpha,25$  dihidroxi-3-epi-vitamina  $D_3$  (3-epiVD) es un isómero óptico de la 1,25D que se forma como consecuencia de un cambio de orientación del grupo hidroxilo del carbono 3, de posición  $\beta$  a  $\alpha$  (Figura 8). Es un compuesto presente en el organismo en condiciones normales (Sekimoto *et al.*, 1999). Su síntesis es específica de tejido, así, se ha evidenciado en queratinocitos humanos (Astecker *et al.*, 2000), líneas celulares de neumocitos tipo II (Rehan *et al.*, 2002), en células paratiroideas bovinas (Brown *et al.*, 1999), células de osteosarcoma de rata (Siu Caldera *et al.*, 1999) y células de carcinoma de colon humanas (Bischoff *et al.*, 1997). La epimerización es un tipo de reacción conocida previamente en otros procesos fisiológicos, como, por ejemplo, en el catabolismo de los ácidos biliares (Hylemon *et al.*, 1985) y en la inactivación metabólica de los andrógenos (Penning *et al.*, 1997).



**Figura 8.** Estructura química de la 1,25D (calcitriol) y la  $1\alpha,2$ -dihidroxi-3-epi-vitamina  $D_3$  (3-epiVD) Nótese la diferencia en la posición del grupo hidroxilo del carbono 3.

3-epiVD tiene capacidad para unirse al receptor de vitamina D (VDR), aunque con menor afinidad que la hormona nativa (Masuda *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 1999; Harant *et al.*, 2000). Estudios realizados en células intestinales de pollo deficiente en 1,25D han demostrado una afinidad de 3-epiVD del 24% respecto a 1,25D (Norman *et al.*, 1993). A

pesar de su menor afinidad por VDR, 3-epiVD mantiene la capacidad de activar a genes regulados por 1,25D por su unión a elementos de respuesta a vitamina D (VDRE) a través de VDR (Rehan *et al.*, 2002; Harant *et al.*, 2000).

3-epiVD se une a la proteína transportadora de vitamina D con mayor afinidad que la propia vitamina D (Masuda *et al.*, 2000, Norman *et al.*, 1993). Hay evidencias de que su metabolismo a nivel celular es más lento que el de 1,25D (Astecker *et al.*, 2000). Tanto la unión estable a la proteína transportadora, como las propiedades cinéticas de su catabolismo, hacen que 3-epiVD tenga una mayor biodisponibilidad que la 1,25D. La actividad biológica de 3-epiVD es significativamente alta a pesar de su menor afinidad por VDR (Astecker *et al.*, 2000).

Se ha observado que 3-epiVD es activa en los tejidos en los que es producida *in vitro*. En neumocitos tipo II estimula la síntesis de surfactante pulmonar (Rehan *et al.*, 2002), inhibe la proliferación de cultivos de queratinocitos (Reddy *et al.*, 2001), inhibe la proliferación de células HL60 (línea celular de leucemia promielocítica humana) (Masuda *et al.*, 2000), induce apoptosis en células HL-60 (Nakagawa *et al.*, 2001), estimula la diferenciación de queratinocitos (Norman *et al.*, 1993), induce la síntesis de osteocalcina en células MG-63 (línea celular de osteosarcoma humano), estimula la absorción rápida de calcio a nivel intestinal (transcalaquia) (Norman *et al.*, 1993), suprime la secreción de hormona paratiroidea en células paratiroideas bovinas (Brown *et al.*, 1999), e inhibe la proliferación de células endoteliales humanas de cordón umbilical con mayor potencia que la 1,25D (Furigay *et al.*, 2004).

La 3-epiVD tiene un impacto sobre la movilización de calcio mucho menor que la 1,25D. Así se ha demostrado que estimula la absorción intestinal de calcio y la movilización de calcio desde hueso con una potencia relativa a 1,25D del 1,5 y del 2,8 %, respectivamente (Norman *et al.*, 1993), por lo que constituye una molécula potencialmente útil en el tratamiento de procesos neoformativos.

#### **4. Relación entre Pit-1 y VDR**

Se han descrito interacciones entre Pit-1 y proteínas nucleares en la regulación de la expresión génica. Por ejemplo, Pit-1 actúa sinérgicamente con el receptor de hormonas

tiroideas y con el receptor de ácido retinoico para incrementar el nivel de expresión de GH (Palomino *et al.*, 1998, Schaufele *et al.*, 1992). Además, la unión VDR/RXR y Pit-1 al promotor de PRL está implicada en la activación transcripcional del gen de PRL en células HeLa (línea celular de carcinoma de cérvix) (Castillo *et al.*, 1999). Al contrario, se ha descrito que las hormonas tiroideas disminuyen la expresión de Pit-1 en células hipofisarias por interferencia con otros reguladores de la transcripción (Sánchez-Pacheco *et al.*, 1995) y que VDR podría actuar como un represor de la señalización de Pit-1 en varias líneas celulares mediante interacciones proteína-proteína entre VDR y Pit-1 (Macias-Gonzalez *et al.*, 2002).

Estudios más recientes han demostrado que la administración de 1,25D a células MCF-7 (línea celular de adenocarcinoma de mama humana) disminuye tanto el nivel de ARNm como de proteína de Pit-1, a través de unión directa de VDR al promotor de Pit-1 (Seoane *et al.*, 2006). Por otro lado, Pit-1 se une, junto con otros factores de transcripción, como CBP (proteína de unión a CREB: proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc), histona H4 acetilada y la ARN polimerasa al promotor de VDR, incrementando la expresión de esta proteína (Seoane *et al.*, 2007). Existe, por lo tanto, un mecanismo de retroalimentación negativo entre VDR y Pit-1, en el cual Pit-1 incrementa la transcripción de VDR, mientras 1,25D a través de VDR inhibe la transcripción de Pit-1. Esta relación entre VDR y Pit-1 pudiera estar implicada en fenómenos fisiológicos y/o patológicos de regulación del desarrollo mamario, dado que la sobreexpresión de Pit-1 en líneas celulares de adenocarcinoma de mama incrementa los niveles de GH y PRL, estimula la proliferación celular y reduce apoptosis. Además, la expresión de Pit-1 es significativamente mayor en carcinomas de mama respecto a tejidos normales. Por el contrario, 1,25D y sus análogos poseen efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos. Podemos hipotetizar que el equilibrio entre VDR (anti-proliferativo y pro-apoptóticos) y Pit-1 (inductor de proliferación y antiapoptótico) podría romperse en algunas circunstancias, prevaleciendo el segundo y por tanto sus efectos proliferativos y antiapoptóticos favorecedores de la progresión neoplásica (Pérez-Fernández *et al.*, 2007).



## OBJETIVOS

---





Los objetivos del presente trabajo serán valorar el efecto del tratamiento de un análogo de la vitamina D con baja actividad hipercalcémica, la  $1\alpha,25$ -dihidroxi-3-epi-vitamina  $D_3$  (3-epiVD) administrada sola o en combinación con quimioterapia en tumores de mama. Además, se valorará si el efecto antitumoral de este compuesto se correlaciona con la expresión del factor de transcripción Pit-1 en células tumorales. Específicamente, los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1. Valorar si 3-epiVD posee efectos antitumorales *in vitro* en líneas celulares de cáncer de mama
2. Valorar si 3-epiVD posee efectos antitumorales en ratones inmunodeficientes inyectados con células tumorales de mama humana *in vivo*.
3. Valorar el efecto del tratamiento de 3-epiVD administrada sola o en combinación con agentes quimioterápicos en cáncer de mama.
4. Correlacionar la actividad antitumoral de 3-epiVD administrada con/sin quimioterapia con la expresión de Pit-1 en células tumorales de mama.



## MATERIAL Y MÉTODOS

---





## 1. Cultivos celulares

Las líneas celulares de adenocarcinoma de mama humana MCF-7, T47D, Hs578T, MDA-MB.231 fueron obtenidas de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC; Port Down, UK). Las líneas celulares BT474, SKBR3, HCC1937 y HCC1187 de obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, USA). La línea celular HBL100 se obtuvo de Cell Lines Service (CLS; Eppelheim, Germany). Las células se cultivaron en placas Petri de 100 mm en medio de cultivo esencial Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero bobino fetal (FBS), 100 UI/ml de penicilina, 100 µg de estreptomina y 2 mM de aminoácidos no esenciales (L-glutamina) (Sigma Aldrich, St Louis, USA) a 37°C en atmósfera O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95/5%).

La rutina de cultivo consiste en el cambio de medio aproximadamente cada 3 días, lavando previamente con tampón fosfato salino (PBS). Una vez las células llegan a un estado de confluencia se recogen con una solución que contiene tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) diluida en PBS (1:4) y se vuelven a sembrar alrededor de 1x 10<sup>6</sup> células por placa de 100 mm.

Los cultivos primarios se obtuvieron de tumores de pacientes tratadas en la Fundación Hospital Jove (Gijón). El estudio fue aprobado por el Comité Ético y de Investigación. Las pacientes fueron previamente informadas y dieron su consentimiento informado. Las muestras se obtuvieron tras la resección tumoral y el análisis anatómo-patológico intraoperatorio. El patólogo proporcionó una muestra representativa del tumor. Las piezas se fragmentaron mecánicamente con tijeras y bisturí hasta 1-2 mm<sup>3</sup> y se colocaron en una placa de seis pocillos. Se someten a digestión enzimática con 1,25 mg/ml de colagenasa A en medio completo DMEM-F12 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) durante 48 horas. Los siete primeros días las células crecieron en medio suplementado con 10% FBS, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), hidrocortisona 0,5 µg/ml e insulina 10 µg/ml (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). A partir de ese momento se cultivaron 1500-2000 células/cm<sup>2</sup> en medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con FBS 10%, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

## 2. Plásmidos y transfecciones

El plásmido de expresión de Pit-1, pRSV-hPit-1, que contiene la secuencia codificante de Pit-1 humano fue obtenido del Dr. J. L. Castrillo (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Madrid). Como plásmido control se utiliza el vector vacío pRc/RSV.

El plásmido de expresión pTRE2-hPit-1, contiene la secuencia codificante de Pit-1. Se obtuvo a partir de pRSV-hPit-1, cortándose con las enzimas de restricción Hind III/Not I y liberando así el fragmento que codifica para Pit-1. Este se insertó en el vector pcDNA3 que contiene una secuencia de corte para el enzima de restricción Xba I (necesaria para insertar el fragmento de Pit-1 en el plásmido pTRE2). Se cortó entonces con este enzima (Xba I) y Hind III para subclonarlo finalmente en el vector pTRE2 (que contiene el elemento de respuesta a tetraciclina). Como plásmido control se utiliza el vector vacío, pTRE2-RSV. El vector de sobreexpresión pTRE-hPit-1 posee un sistema de regulación génica inducible en el que en ausencia de tetraciclina (2 µg/ml) sobreexpresa Pit-1, mientras que en presencia de tetraciclina su expresión se encuentra en niveles basales.

El plásmido que codifica para el gen de la luciferasa pBABE-puro-LUC fue construido cortando el gen luciferasa que se encontraba subclonado en el plásmido pcDNA3-Luc con los enzimas de restricción BamH I y Sal I y subclonado en el pBABE-puro cortado con los mismos enzimas de restricción. El vector pBABE-puro es resistente a puomicina y las células se tratan con una dosis de 2.5 µg/µl para posteriormente seleccionar los clones positivos. Este vector se utilizó para monitorizar el crecimiento tumoral *in vivo*. Tras la inyección de fluoresceína, las células que expresan luciferasa, transforman la fluoresceína en oxifluoresceína que emite fluorescencia que puede ser monitorizada con un dispositivo IVIS (*In Vivo Imaging System*, Caliper Life Sciences, Alameda, USA).

En las transfecciones transitorias, las células MCF-7 se tripsinizan 24 h antes de la transfección y se cuentan en una cámara de Neubauer. Se siembran aproximadamente  $8 \times 10^5$  células en una placa de 90-mm o  $15 \times 10^4$  células en placas de 6 pocillos, o  $5 \times 10^4$  células en placas de 24 pocillos. Para realizar los ensayos de transfección transitoria se utiliza jetPEI (Polyplus transfection, Illkirch, France). Por cada 10 µg de plásmido

transfectado se utilizan 30  $\mu$ l de jetPEI. Las transfecciones se realizaron a 48 horas usando 10  $\mu$ g para las placas de 100-mm.

Para las transfecciones estables de pTRE-Pit-1 en células MCF-7 Tet-off, las células se cuentan y se introducen  $2 \times 10^6$  en la cubeta de electroporación para proceder a la transfección con el plásmido de sobreexpresión de Pit-1 (pTRE2-hPit-1), o con el plásmido vacío control (pTRE-RSV) (2  $\mu$ g de ADN). Se utiliza para realizar la electroporación el aparato *Nucleofector* (Amaxa biosystems, Gaithersburg, USA), y el kit de transfección VCA-1003 (*Cell Line Nucleofector Kit V*, Amaxa biosystems). Una vez electroporadas se vuelven a sembrar en placas de 60-mm y se mantienen en cultivo. Cuando están aproximadamente al 70% de confluencia, una de las placas transfectadas con pTRE2-hPit-1 y pTRE2-RSV, se trata con tetraciclina (2  $\mu$ g/ml) para reprimir la sobreexpresión de Pit-1. Se extrae proteína a las 48 h (de las células sin tratar y tratadas con tetraciclina), y se realiza un Western blot de Pit-1 para comprobar si las células están transfectadas transitoriamente. Comprobada la sobreexpresión de Pit-1, se realizan una serie de diluciones (1:100, 1:250, 1:500, 1:1000 y 1:5000), se siembran en placas de 90-mm y se tratan con geneticina para su selección. Se observan frecuentemente (durante 15-20 días) hasta que se generen clones. Estos clones se tripsinizan, se siembran en placas de 24 pocillos, y se comprueba la expresión de Pit-1 seleccionando dos clones de los más positivos.

Para generar los clones de células MDA-MB-231 “knock-down” para Pit-1, se transfectaron las células con una mezcla de vectores lentivirales pLKO-shPit-1 que contenían tres secuencias de interferencia para Pit-1 (obtenidas de Santa Cruz Biotech). Se empleó como control una mezcla de tres secuencias aleatorias pLKO como control negativo en los experimentos de ARN de interferencia (Santa Cruz Biotech). Para seleccionar los clones se trataron las células con puromicina 2.5  $\mu$ g/ $\mu$ l, durante 48 h.

### **3. Ensayo reportador de luciferasa**

Para evaluar el efecto de la administración de la 3-epiVD sobre genes diana de la 1,25D se utilizaron células MCF-7. En ensayo se comienza sembrando 250.000 células en placas de 6 pocillos. 24 h después se transfectaron de forma transitoria con 1  $\mu$ g del vector

pCYP24A1-luc (cedido por la Dra. Ana Aranda, IIB, Madrid) o su control vacío pGL2B. Este vector contiene el promotor de la 24-hidroxilasa, CYP24A1, este es un gen diana de la vitamina D. Las transfecciones se realizaron utilizando en reactivo JetPEI (PolyPlus Transfection) y 24 h después las células fueron tratadas con diferentes concentraciones ( $11^{-11}$ - $10^{-6}$  M) del análogo 3-epiVD y la 1,25D usada como control positivo durante 24 h. Posteriormente las células se tratan con luciferina (100 mg/L) y se visualiza la bioluminiscencia en un IVIS (Caliper Life Sciences, Alameda, CA, USA). Se determina el EC<sub>50</sub> para el análogo y para la 1,25D.

#### 4. Tratamientos celulares

Para la realización de los tratamientos se emplea medio de cultivo DMEM suplementado con un 10% de suero bovino fetal libre de hormonas esteroideas. Los tratamientos se realizaron con  $1\alpha,25\text{-OH}_2\text{-vitamina D}_3$  (1,25D) (Sigma-Aldrich) y 3-epi-vitamina D (3-epiVD) (sintetizada por el grupo del Dr. Mouriño, Departamento de Química Orgánica, Universidad de Santiago de Compostela). Se emplearon a una concentración de 10, 100, 500 o 1000 nM, o etanol absoluto como vehículo durante 48 horas. La doxorubicina, la gemcitabina, el paclitaxel y el cisplatino (Ferrer Farma, Barcelona, España) se obtuvieron comercialmente y se diluyeron en PBS.

#### 5. Estudios de proliferación celular por incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU)

Las células MCF-7 se sembraron sobre discos colocados en placas de 24 pocillos. Se transfectaron las células con el plásmido de sobreexpresión de Pit-1 o con el plásmido vacío (grupo control). A las 24 h se realizó el tratamiento con 1,25D (100nM), 3-epiVD (100nM) o excipiente como control. Trascorridas 24 h se lavaron con PBS y se incubaron con una solución 10  $\mu$ M de BrdU durante 1 h. Se fijaron las células con formaldehído 4% 22 min, 5 min en PBS y toda la noche en metanol. Las células se permeabilizan en 0,07 M NaOH, y se incuban toda la noche a 4°C con 1:100 anti-BrdU (BD Biosciences, San Diego, USA). Se lavan las muestras 3 veces con PBS y se incuban con el segundo anticuerpo F(ab)IgG FICT (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) en una dilución 1:150 en PBS y DAPI

en una cámara húmeda 45 minutos. Se realiza un lavado con PBS seguido de otro lavado con etanol al 70%. Se colocan los discos en un portaobjetos y se observan en el microscopio de fluorescencia.

## **6. Ensayo de viabilidad/proliferación celular (MTT)**

El ensayo MTT es un método colorimétrico cuantitativo para valorar la capacidad de supervivencia y proliferación celular. Emplea bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio que es reducido enzimáticamente por la succinato-deshidrogenasa mitocondrial a azul de formazán. Mediante espectrofotometría se puede cuantificar el sustrato de la reacción y así inferir la cantidad de células viables presentes en la muestra. Para llevar a cabo el ensayo se siembran 25.000 células en una placa de 24 pocillos. Se cultivan durante 12 h y se añaden los diferentes tratamientos durante 48 horas. Entonces se añade la solución de MTT (Merck, Darmstadt, Alemania) a una concentración de 5 mg/ml y se incuba durante 1 hora. Posteriormente se añaden 500  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) y se realiza la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. El porcentaje de viabilidad se obtiene utilizando como referencia células control tratadas con el vehículo como valor 100% de proliferación. Cuando se emplea una combinación de dos fármacos en el tratamiento, interesa estudiar si dicha combinación presenta un efecto sinérgico, antagonista o simplemente aditivo. Para ello, se calculó el Índice de Combinación (IC), basándonos en el algoritmo descrito por Chou y Talalay (Chou, 2010). Valores de este índice menores de 1 indican sinergismo, mayores de 1 indican antagonismo y valores iguales a 1 indican un efecto aditivo. Los valores se calcularon empleando el programa informático CalcuSyn v2.0 (Biosoft, Ferguson, USA). Se calcularon los índices de combinación de tres experimentos y se calcularon los resultados como la media de los valores obtenidos.

## **7. Extracción de ARN y síntesis de ADNc**

Las células en confluencia se recogen con tripsina-EDTA diluida en PBS en relación 1:4. El precipitado obtenido tras la centrifugación de la suspensión celular durante 5

minutos a 700 rpm, se lava con PBS y se centrifuga de nuevo bajo las mismas condiciones. El precipitado se resuspende en TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, USA). Se precipita con isopropanol, se lava con etanol (75%) y se resuspende en agua destilada a la que se le ha añadido dietilpirocarbonato al 0.1% (DEPC). Una vez disuelto el ARN, su pureza y concentración se determina por absorbancia en un espectrofotómetro Nanodrop (ThermoFisher Scientific, Delaware, USA). Se conserva a -80°C hasta su posterior procesamiento.

El ARN obtenido se retrotranscribe a ADN complementario (ADNc) mediante una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Se lleva a cabo en un volumen total de reacción de 30  $\mu$ l conteniendo 1  $\mu$ g de ARN total, 6  $\mu$ l de tampón (5X First Stand Buffer, Invitrogen) conteniendo 50mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 10 mM Mg Cl<sub>2</sub>, 50 mM DTT, 2 mM de cada deoxinucleótido trifosfato (dNTP) (Invitrogen), 250 ng de random primers (Invitrogen), 20 UI de inhibidor de RNasas (RNasin, Ribonuclease Inhibitors, Promega, Fitchburg, USA) con 200 UI de transcriptasa inversa (MMLV, Invitrogen). Esta mezcla se incuba a 37°C durante 50 min, 15 min a 42°C y 5 min a 95°C.

## **8. PCR y PCR a tiempo real (qPCR)**

Para realizar la PCR se amplifican 5  $\mu$ l de ADNc en un volumen total de 50  $\mu$ l. Se usan 2 unidades de Taq ADN Polimerasa (Invitrogen) en 5  $\mu$ l de tampón, 0.2 mM de cada dNTP (Invitrogen) y 25 pM de cada uno de los 2 oligonucleótidos usados como cebadores. Tras una desnaturalización inicial de 95°C durante 2 min, las muestras se desnaturalizan 1 min a 95°C, hibridan 1 min a 58°C y extienden durante 1 min. Proceso que se repite durante 32 ciclos tanto para Pit-1, VDR o 18S.

La PCR a tiempo real cuantitativa (qPCR) permite medir de forma cuantitativa el ADN amplificado. Para realizarla se utilizaron oligonucleótidos específicos diseñados para amplificar Pit-1, VDR o 18S (usado como gen control normalizador). La qPCR se realiza en un termociclador (Realplex, Eppendorff, Hamburgo, Alemania) utilizando el reactivo Luminaris Color HiGreen qPCR Mastermix (Thermo Fisher Scientific). Tras una desnaturalización inicial de 95°C durante 30 s, las condiciones de amplificación son las

siguientes: desnaturalización 15 s a 95°C, hibridación a 58°C para Pit-1, VDR y 18S durante 15 s, y extensión 15 s a 72°C un total de 35 ciclos. Al término de la PCR obtenemos unas curvas de amplificación a partir de las cuales podemos calcular la cantidad de ADN sintetizado. Los niveles de Pit-1 y VDR se normalizan respecto a los niveles obtenidos de 18S usados como control.

	<b>Secuencia de los oligonucleótidos</b>
Pit-1	Sentido: 5'-GTGTCTACCAGTCTCCAACC-3' Antisentido: 5'-ACTTTTCCGCCTGAGTTCCT-3'
VDR	Sentido: 5'-GACTTTGACCGGAACGTGCC-3' Antisentido: 5'-CATCATGCCGATGTCCACAC-3'
18S	Sentido: 5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3' Antisentido: 5'-CCATCCAATCGCTA GTAGCG-3'

## 9. Extracción de proteína y Western blot

Para realizar la extracción de la proteína se lavan las placas de cultivo tres veces con PBS a 4°C. Se lisan con tampón de lisis RIPA (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 1.5 mM CIMg2, 1% SDS, 10% glicerol, 1% Tritón X-100), al que se le añadió en fresco 10 mM ortovanadato sódico (NaVO<sub>4</sub>), 50 mg/ml aprotinina y 4 mM fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF) que actúan como inhibidores de proteasas. El homogeneizado se mantiene durante 30 min en hielo, y se centrifuga a 14000 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante que contiene el extracto proteico se cuantifica por el método Bradford.

Para los ensayos de Western blot, se toman 60 µg de proteína total a los que se añade tampón de carga (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 2% de β-mercaptoetanol y azul de bromofenol). Se desnaturaliza la proteína calentando la muestra a 95°C durante 5 min. Se someten a electroforesis en gel de SDS-PAGE al 12% durante 2 horas a 120V en tampón de electroforesis (25 mM de trizma Base, 192 mM de glicina y 0,1% SDS). La proteína se transfiere a una membrana de nitrocelulosa en una cubeta de transferencia en tampón de

transferencia (conteniendo 25 mM Tris, 192 mM de glicina y 20% metanol) a un amperaje constante de 0.30 A durante 1 h y 30 min a 4°C. Para evitar uniones inespecíficas entre el anticuerpo primario y las proteínas retenidas en la membrana, se incubó la misma en solución de bloqueo (0,2% I-Block y Tween 20 al 0,1% en PBS) durante una hora, en agitación y a temperatura ambiente. A continuación, se incubó con el anticuerpo correspondiente diluido en solución de bloqueo a 4°C en agitación, durante 12 h. Se emplearon anticuerpos primarios para Pit-1 (X-7) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), VDR (clone 9A7, Millipore Corp., Bedford, USA), GAPDH (clone 6C5, Santa Cruz), Bcl-2 (N-19) (Santa Cruz Biotechnology) Cleaved PARP (46D11) (CellSignaling Danvers, USA) Caspase 3 active (5A1E) (CellSignaling) CDK1/2 (AN21.2) (Santa Cruz Biotechnology), Cyclin A (BDBiosciences), Cyclin B (BDBiosciences), Cyclin D1 (clone 7213G) (Santa Cruz Biotechnology), Cyclin D1 (H-295) (Santa Cruz Biotechnology), Cyclin E (M-20) (Santa Cruz Biotechnology). La dilución empleada fue 1:10000 en el caso de GAPDH, usado como control de carga y 1:1000 para el resto de los anticuerpos. Terminada la incubación se realizaron 3 lavados de 10 min con tween-20 al 1% en PBS. Para la realización de Western blot convencional se continuó el procedimiento incubando con anticuerpo secundario 1:5000, se realizan 3 lavados de 10 min cada uno. Finalmente, las membranas fueron incubadas durante 1 min con Enhanced Chemiluminescence (ECL) (Amersham Biosciences, UK) para luego ser expuesta ante una placa autoradiográfica y revelada.

Para realizar Western blot cuantitativa fluorescente se emplearon como anticuerpo secundario anti-mouse Dylight™ 680-conjugated y anti-rabbit Dylight™ 800-conjugated (Thermo Fisher Scientific). Se realizaron 3 lavados de 10 min y se visualizó y cuantificó Pit-1 empleando Odyssey LI-COR (Hamburgo, Alemania), normalizando sus niveles respecto a GAPDH.

## 10. Análisis del ciclo celular

Para el análisis de ciclo celular, se trataron células MCF-7/Pit-1 durante 24 h con 3-epiVD (100 nM), cisplatino (5 µM) y 3-epiVD (100 nM) + cisplatino (5 µM). se tripsinizaron las células y se fijaron con etanol al 75% en PBS durante 12 h a -20°C. Se

centrifugaron las células y se resuspendieron en una solución con yoduro de propidio 5 $\mu$ g/ml y ribonucleasa (200 $\mu$ g/ml) en PBS, durante 30 min a temperatura ambiente. El yoduro de propidio se une al ADN celular. Cuando se excitan las moléculas de yoduro de propidio con una longitud de onda de 540 nm, emiten fluorescencia con un pico máximo a 610 nm, que puede cuantificarse en un citómetro de flujo y, de este modo cuantificar la cantidad de ADN de cada célula. Para ello se empleó un Guava EasyCyte™ (Merck Millipore).

Según la cantidad de ADN que contiene cada célula, se puede determinar la fase del ciclo celular en que se encuentra. Las células en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> presentan un contenido de DNA de 2n. Las células en fase S tienen un contenido de DNA entre 2n y 4n. Finalmente, en fase G<sub>2</sub>/m disponen de 4n de DNA.

## 11. Cuantificación de apoptosis mediante Anexina V

La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio que se une a los restos de fosfatidilserina. En condiciones normales la membrana interna contiene abundantes fosfolípidos aniónicos como la fosfatidilserina, mientras que la externa se compone fundamentalmente de fosfolípidos neutros. Durante el proceso de apoptosis se producen cambios en la membrana celular, de modo que se produce traslocación de los residuos de fosfatidilserina a la membrana externa, quedando accesibles para su unión a la Anexina V.

Las células necróticas o en apoptosis tardía presentan permeabilización de la membrana celular por lo que se tiñen con yoduro de propidio (IP) que se une al DNA de las células.

De este modo, se distinguen:

Células Anexina V- IP-: células viables.

Células Anexina V+ IP-: células en apoptosis temprana.

Células Anexina V + IP+: células en apoptosis tardía.

Células Anexina V- IP+: células necróticas.

Las células se cultivaron con 3-epiVD (100 nM), cisplatino (5 $\mu$ M) o una combinación de ambas a la misma dosis, durante 24 h y se incubaron en oscuridad con Annexin V-FITC (BD biosciences) y PI durante 48 h y se analizó en un GuayaEasyCyte (Merk Millipore).

## 12. Determinación de la calcemia *in vivo*

Todos los estudios en animales se realizaron de acuerdo con un protocolo aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal (Procedimiento 15010/14/007).

Se emplearon ratones machos adultos de 8 semanas de la cepa CD-1. Se trataron con 1,25D y 3-epiVD por vía intraperitoneal (i.p.) disueltos en aceite de sésamo como vehículo a dosis de 0.1, 0.3, 0.5 o 1  $\mu$ g/kg de peso. Los tratamientos se realizaron cada 48 h durante 3 semanas. El grupo control se trató con excipiente (etanol disuelto en aceite de sésamo). Finalizado en tratamiento se realizó una extracción de suero y se determinaron los niveles de calcio empleando un método colorimétrico con un kit comercial (QuantiCrome Calcium Assay Kit (BioAssay Systems)).

## 13. Experimentos de xenoinjertos en ratones inmunodeficientes

Se emplearon ratones hembra con inmunodeficiencia combinada severa (CB17-Prkdcscid/J, Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) (SCID) de 6-8 semanas de edad. El compromiso del sistema inmune de estos ratones dificulta el rechazo de las células tumorales humanas, facilitando la formación de implantes tumorales.

Se emplearon para cada animal  $10 \times 10^6$  de células MCF-7 Tet-off transfectadas establemente con el plásmido de sobreexpresión de Pit-1 (pTRE2-hPit-19 o con el plásmido vacío (pTRE2-RSV). A cada animal se le inyectaron en un lado del costado las células con sobreexpresión de Pit-1 y en el otro lado las células control. Cada uno de estos ratones fue asignado aleatoriamente a un grupo de tratamiento:

- 1) 1,25D (0,5 $\mu$ g/kg i.p. cada 48 h)
- 2) 3-epiVD (0,5 $\mu$ g/kg día i.p. cada 48 h)
- 3) Excipiente (etanol disuelto en aceite de sésamo) i.p. cada 48 h

Se usó como excipiente aceite de sésamo. El tamaño tumoral y el peso de los ratones se midieron cada 5 días. Se sacrificaron los ratones a los 25 días de tratamiento. Se recogieron muestras de sangre para su posterior análisis.

Para evaluar el crecimiento tumoral en ratones tratados con cisplatino y 3-epiVD se empleó un método de análisis de la bioluminiscencia. Los tumores inducidos en estos animales están formados por células establemente transfectadas con un vector que codifica a la enzima luciferasa. Al inyectar al ratón D-luciferina ésta es oxidada por el enzima luciferasa expresada en las células tumorales, a oxiluciferina. Ésta emite espontáneamente un fotón para volver a su estado original y posteriormente se inactiva. Una cámara de alta sensibilidad puede detectar los fotones emitidos, obteniéndose imágenes representativas de la reacción, que es proporcional al número de células tumorales presentes pudiéndose estimar el volumen tumoral mediante un software.

Para evaluar los diferentes tratamientos solos y combinados sobre el crecimiento tumoral se inyectó en cada flanco de la línea mamaria  $6 \times 10^6$  células MCF-7/Pit-1-luc. Estas células sobreexpresan Pit-1 y luciferasa. A los 15 días de la inyección se randomizaron en 4 grupos de 6 ratones cada uno y se trataron como sigue:

- 1) Controles, tratados con excipiente (aceite de sésamo)
- 2) 3-epiVD (0,5µg/kg i.p. cada 48 h disuelta en aceite de sésamo)
- 3) cisplatino (7 mg/kg i.p. los días 0 y 7 de tratamiento)
- 4) 3-epi (0,5µg/kg i.p. cada 48 h disuelto en aceite de sésamo) + cisplatino (7 mg/kg los días 0 y 7 de tratamiento).

Se monitorizó el crecimiento tumoral cada 7 días desde el día 15 (día 0 de tratamiento) hasta el día 36 (21 días de tratamiento) mediante análisis de la bioluminiscencia *in vivo*. Tras el sacrificio, se recogió suero tras centrifugación de la muestra de sangre para su uso en estudios de calcemia.

Para la obtención de las imágenes se sedó a los animales con isofluorano (2% a 2,5 l/min). Se inyectó D-luciferina (sal de potasio, Regis Technologies, Morton Grove, USA) por vía intraperitoneal a razón de 150 mg/kg de peso, diluida en PBS. Se realizó una determinación de la bioluminiscencia por medio de un IVIS y el software *Living Image* (Caliper Sciences).

### 13. Análisis estadístico

Cada experimento se realizó al menos tres veces. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Las medias fueron comparadas utilizando el “t” test o el análisis de la varianza con el test de múltiples comparaciones de Tukey-Kramer o Mann-Whitney. Los valores de P inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Para la realización de todos los cálculos se utilizó el programa PASW Statistics 18.



# RESULTADOS

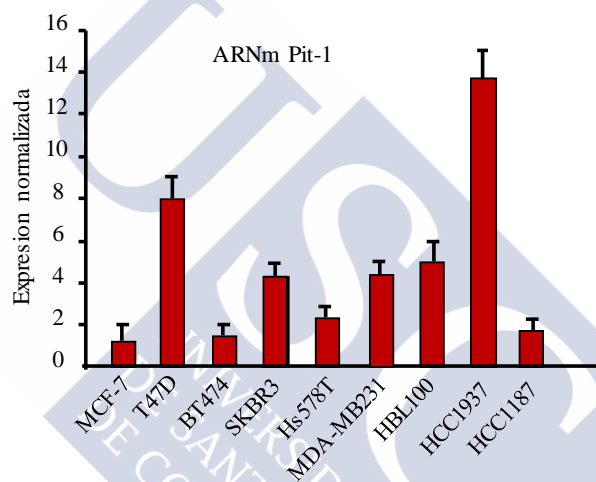
---



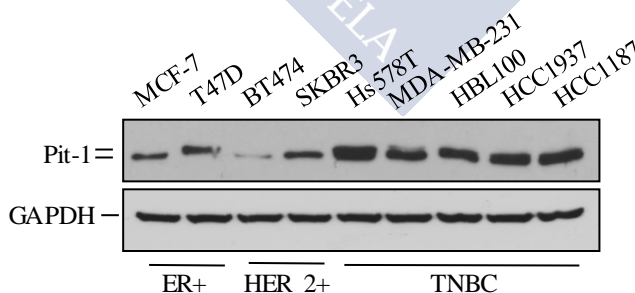


## 1. Expresión de Pit-1 en líneas celulares de adenocarcinoma de mama humana

Estudios previos han demostrado que Pit-1 se expresa en células normales, tumores de mama humana, y líneas celulares tumorales. Sin embargo, el nivel de expresión varía según la línea celular. Se realizó, por tanto, una PCR en tiempo real y un Western blot para valorar la expresión relativa de Pit-1 tanto a nivel de ARNm como de proteína en distintas líneas celulares de adenocarcinoma de mama. En las Figuras 9 y 10 se muestran los niveles de ARNm y proteína de Pit-1 en líneas celulares de cáncer de mama de los subtipos ER+, HER2+ y TN. Como se observa, la expresión de Pit-1 es mayor en líneas celulares TN.



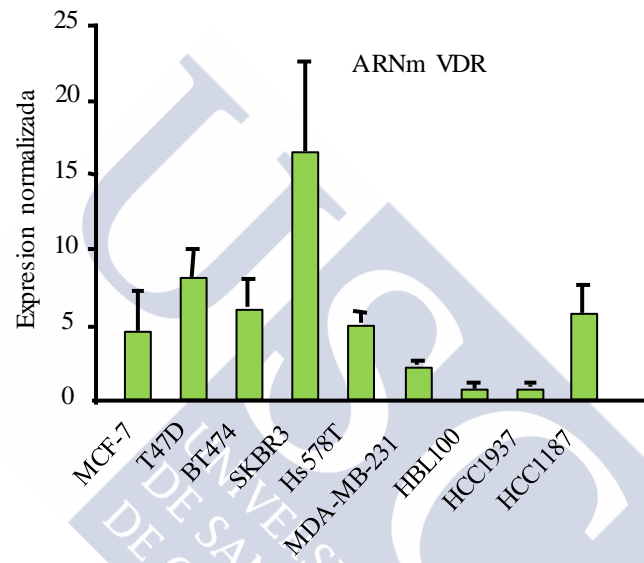
**Figura 9.** Expresión de ARNm de Pit-1 en líneas celulares de adenocarcinoma de mama humana realizada por real-time PCR.



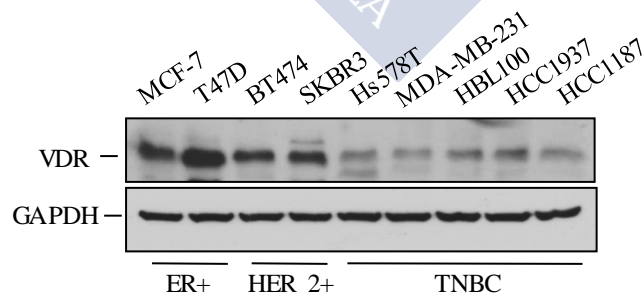
**Figura10.** Expresión proteica de Pit-1 en líneas celulares de adenocarcinoma de mama humana realizada por Western blot. ER+, receptor de estrógenos positivas; HER2+, positivas para el receptor de factor de crecimiento epidérmico HER2/neu; TNBC, líneas celulares de cáncer de mama triple negativo.

## 2. Expresión de VDR en líneas celulares de adenocarcinoma de mama humana

VDR se expresa en numerosos tejidos, entre ellos en glándula mamaria. Para valorar la expresión relativa de ARNm y proteína de VDR en distintas líneas celulares de adenocarcinoma de mama se realizó PCR en tiempo real y Western blot. Como muestran las Figuras 11 y 12, la expresión de VDR es variable, siendo mayor su expresión, al contrario que Pit-1, en líneas tumorales poco agresivas.



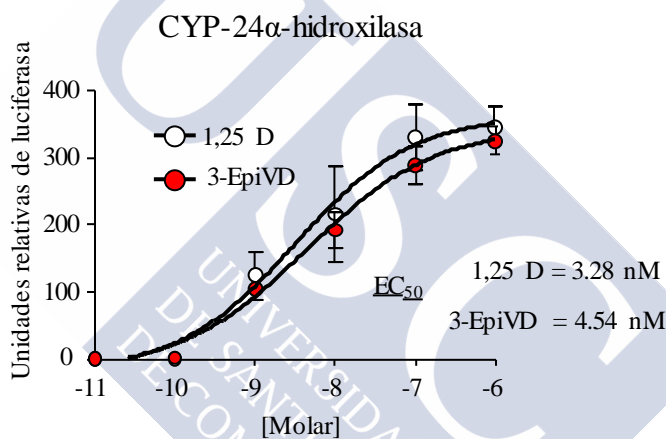
**Figura 11.** Expresión de ARNm de VDR en líneas celulares de adenocarcinoma de mama humana realizada por real-time PCR



**Figura 12.** Expresión proteica de VDR en líneas celulares de adenocarcinoma de mama humana realizada por Western blot. ER+, receptor de estrógenos positivos; HER2+, positivas para el receptor de factor de crecimiento epidérmico HER2/neu; TNBC, líneas celulares de cáncer de mama triple negativo.

### 3. Determinación de la actividad biológica de 3-epiVD en relación a 1,25D

La 3-epiVD es un compuesto presente en el organismo y posee una estructura similar a la 1,25D (Figura 8). Ha sido descrito que su perfil de actividad biológica es similar a la 1,25D (Masuda *et al.*, 2000). Para estudiar si 3-epiVD actúa de forma semejante a la 1,25D en la regulación de genes diana, se realizó un ensayo reportador de luciferasa, utilizando como gen reportador el promotor de la 24 $\alpha$  hidroxilasa (CYP24A1). Tras administración de 1,25D y 3-epiVD a distintas concentraciones se observó que 3-epiVD induce a CYP24A1 y que su concentración efectiva media es de un orden similar a la de 1,25D (Figura 13).

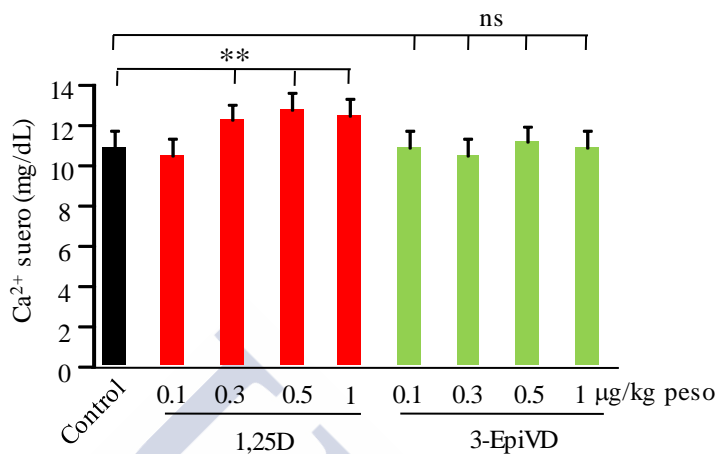


**Figura 13.** curvas dosis-respuesta y concentración media efectiva (EC<sub>50</sub>) de la 3-epiVD y 1,25D en la activación del gen que codifica la 24 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP24A1) realizado por medio de un ensayo reportador de luciferasa.

### 4. Efecto del tratamiento con 1,25D o 3-epiVD sobre los niveles de calcio en sangre

La vitamina D tiene efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos, pero su uso está limitado por sus efectos hipercalcémicos. Por ello, se valoró el efecto que la 3-epiVD tiene sobre la calcemia. Se trataron por vía intraperitoneal (i.p.) ratones CD-1 con 1,25D, 3-epiVD a dosis de 0.1 a 1  $\mu$ g/kg de peso o excipiente cada 48 h durante 3 semanas y se analizaron los niveles de calcio en suero el día 21. La administración de 1,25D aumentó significativamente la calcemia con respecto al grupo control, mientras que el tratamiento

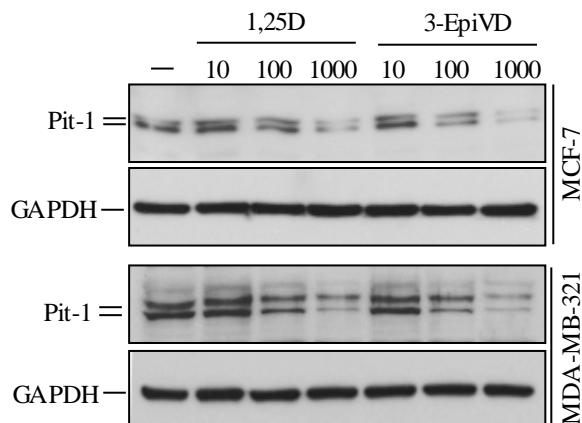
con 3-epiVD no modificó los niveles de calcio en sangre de forma significativa con respecto al grupo control (Figura 14).



**Figura 14.** Niveles de calcio en sangre en ratones controles (n=5) y tratados (n=5 por grupo y dosis) durante 21 días con 1,25D o 3-epiVD (0.1, 0.3, 0.5, y 1 µg/kg peso cada 48h, ip). \*\*=P<0.01, ns= no significativo.

## 5. Expresión de Pit-1 en líneas celulares de adenocarcinoma de mama tras tratamiento con 1,25D y 3-epiVD

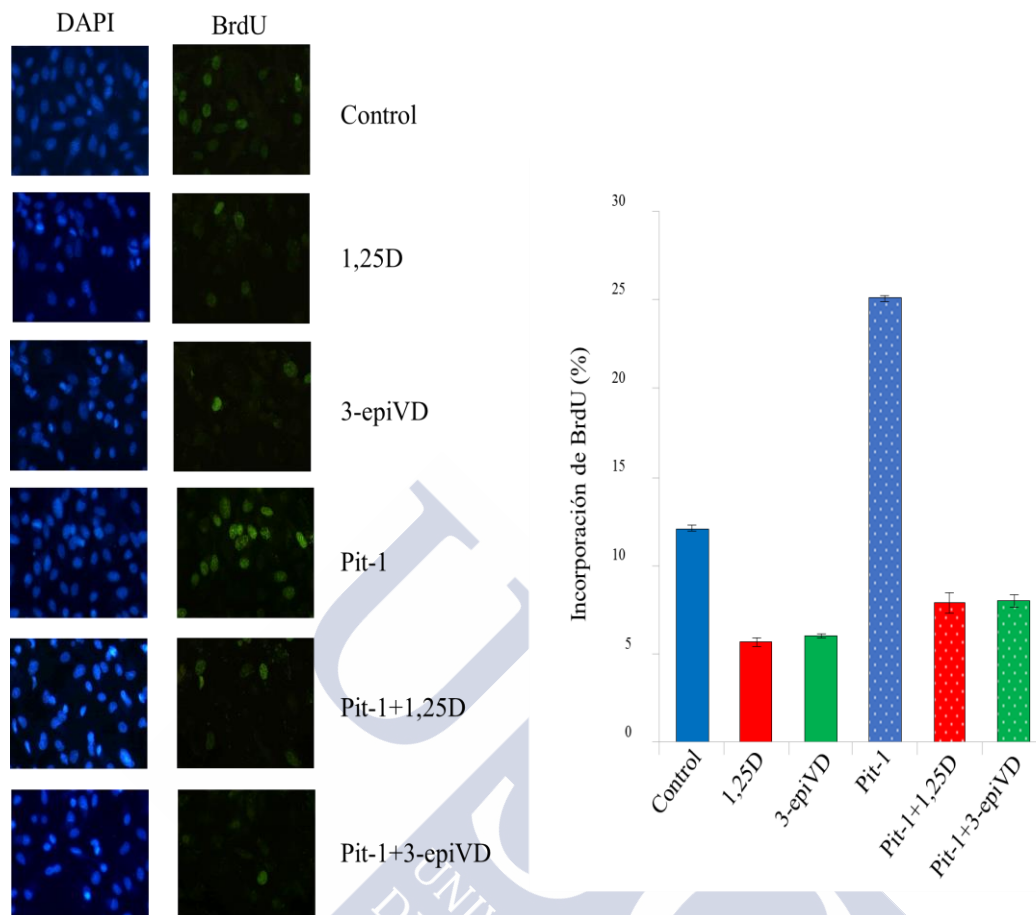
La 1,25D regula la expresión de Pit-1 a nivel transcripcional, inhibiendo su expresión proteica (Seoane *et al.*, 2006). Con el objetivo de valorar el efecto de 3-epiVD sobre Pit-1, se realizó un análisis de expresión proteica mediante Western blot tras tratamientos con distintas dosis de 1,25D y 3-epiVD. Como se observa en la Figura 15, la expresión de Pit-1 se reduce de forma evidente tras el tratamiento con 100 nM de 1,25D, pero también tras el tratamiento con 100 nM de 3-epiVD. Esto sucede tanto en células MCF-7 (receptor de estrógenos positivas, con menores niveles de Pit-1) como en células MDA-MB-321 (línea celular de adenocarcinoma de mama triple negativo, con mayores niveles de expresión de Pit-1).



**Figura 15.** Western blot de Pit-1 y GAPDH (utilizado como control) en células MCF-7 y MDA-MB-231 tras tratamiento con 10, 100 y 1000 nM de 1,25D y 3-epiVD.

## 6. Efecto de 1,25D y 3-epiVD sobre la proliferación celular

Datos previos han demostrado que Pit-1 induce y 1,25D inhibe la proliferación celular (Gil-Puig *et al.*, 2005, Ben-Batalla *et al.*, 2010b). Por tanto, exploramos la proliferación en células MCF-7 con y sin sobreexpresión de Pit-1 tras el tratamiento con 1,25D y 3-epiVD. Tras transfección de las células MCF-7 con el plásmido de sobreexpresión de Pit-1 (pRSV-Pit-1) se realizaron tratamientos con 1,25D (100nM), 3-epiVD (100nM) y excipiente durante 24 h. Posteriormente, las células de los distintos grupos experimentales se incubaron con bromodeoxiuridina (BrdU) que se incorpora en los núcleos de las células que se encuentran en fase S, emitiendo fluorescencia verde. También se tiñen con DAPI (fluorescencia azul) que se une a la totalidad de los núcleos celulares. Se determinó el porcentaje de núcleos que incorporan BrdU en relación al total de células. Las células con sobreexpresión de Pit-1 presentaban mayor proliferación que las células control (Figura 16). El tratamiento, tanto con 1,25D como con 3-epiVD disminuye de forma significativa la proliferación celular, aunque la disminución fue proporcionalmente mayor en células con sobreexpresión de Pit-1 (Figura 16).

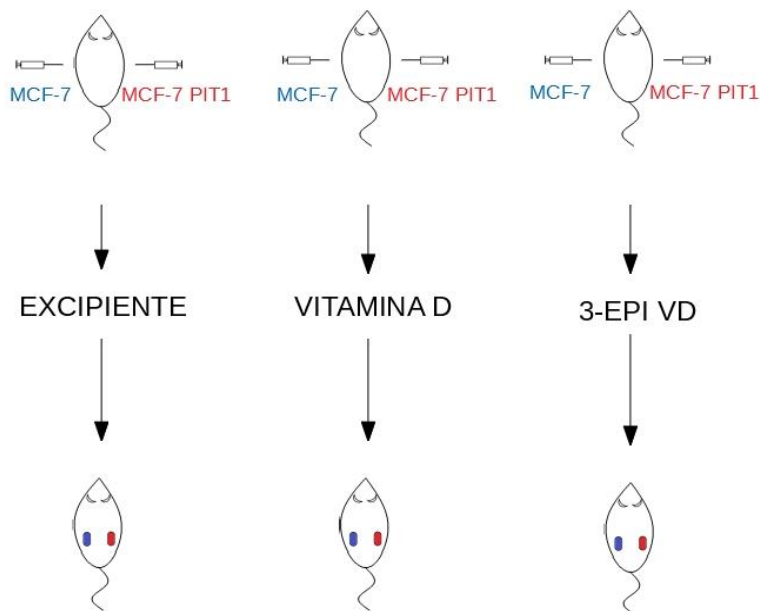


**Figura 16.** Izquierda: imágenes representativas de inmunofluorescencia en el ensayo de proliferación con bromodeoxiuridina (BrdU). Células MCF-7 control y transfectadas con el plásmido de sobreexpresión de Pit-1 se trataron con 1,25D, 3-epiVD o excipiente y se determinó el índice de BrdU incorporada (verde) en relación a las células totales (DAPI, azul). Derecha: porcentaje de incorporación de BrdU en células MCF-7 control (C) y con sobreexpresión de Pit-1 (Pit-1) tratadas con excipiente, con 1,25D y con 3-epiVD.

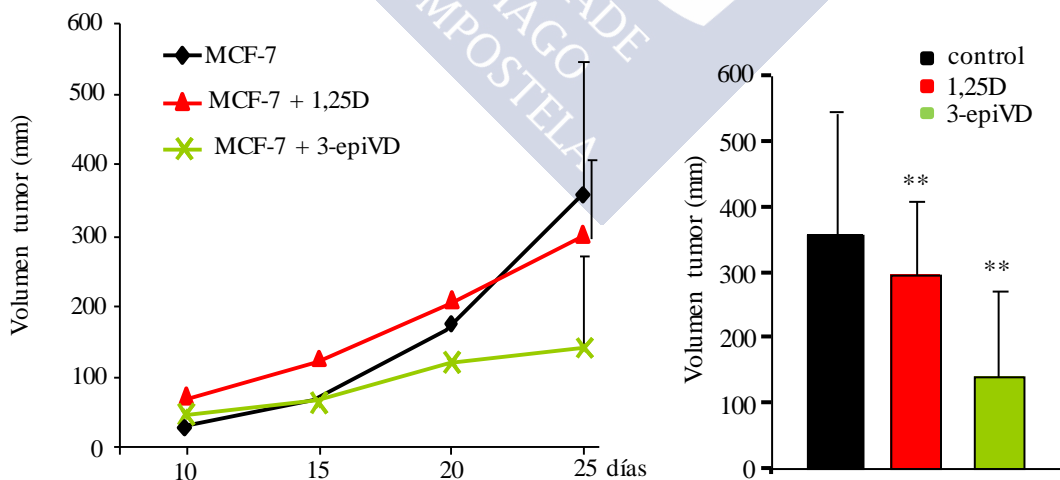
## 7. Efecto del tratamiento con 1,25D y 3-epiVD en células de adenocarcinoma de mama con y sin sobreexpresión de Pit-1 *in vivo*

Para valorar el efecto del tratamiento con 1,25D o 3-epiVD sobre el crecimiento tumoral *in vivo*, se indujeron tumores en ratones SCID mediante la inyección subcutánea en el lomo del animal de células MCF-7 con y sin sobreexpresión de Pit-1. Se trataron con 1,25D, 3-epiVD o excipiente (grupo control) cada 48 h por vía i.p. a dosis de 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso (Figura 17). Los tumores inducidos por células que sobreexpresaban Pit-1 eran significativamente mayores que en los controles. El tratamiento con 1,25D o 3-epiVD

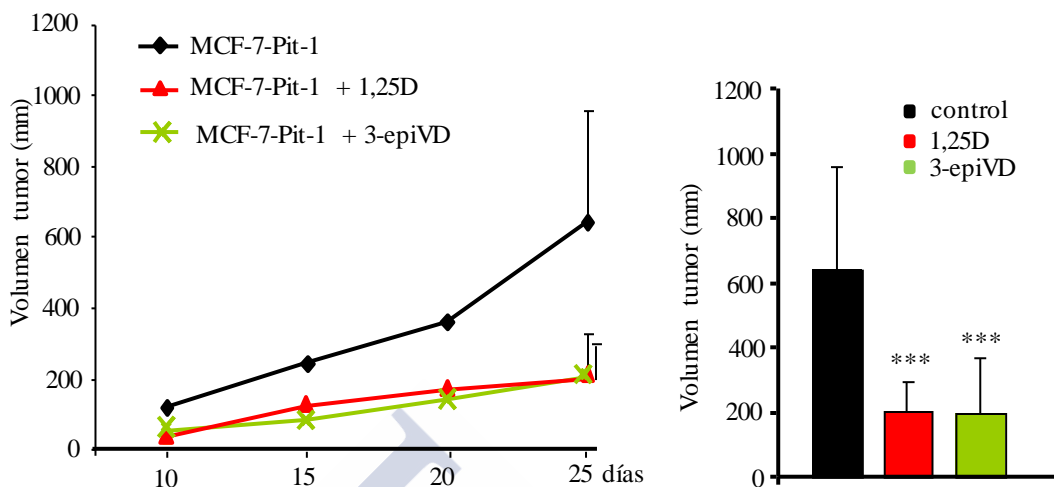
disminuyó el crecimiento tumoral de forma significativa, siendo este efecto más marcado en los tumores que sobreexpresaban Pit-1 (Figuras 18 y 19).



**Figura 17.** Esquema del procedimiento experimental. Se inyectaron ratones SCID con células MCF-7 con y sin sobreexpresión de Pit-1 en el lomo y se trataron por vía i.p. cada 2 días con excipiente (grupo control), 1,25D (0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) y 3-epiVD (0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) durante 25 días, durante los que se determinó el crecimiento tumoral.



**Figura 18.** Izquierda: representación gráfica de la evolución del tamaño de los tumores inducidos en ratones con células MCF-7 sin sobreexpresión de Pit-1. Derecha: representación del volumen tumoral al día 25 en los distintos grupos de tratamiento.

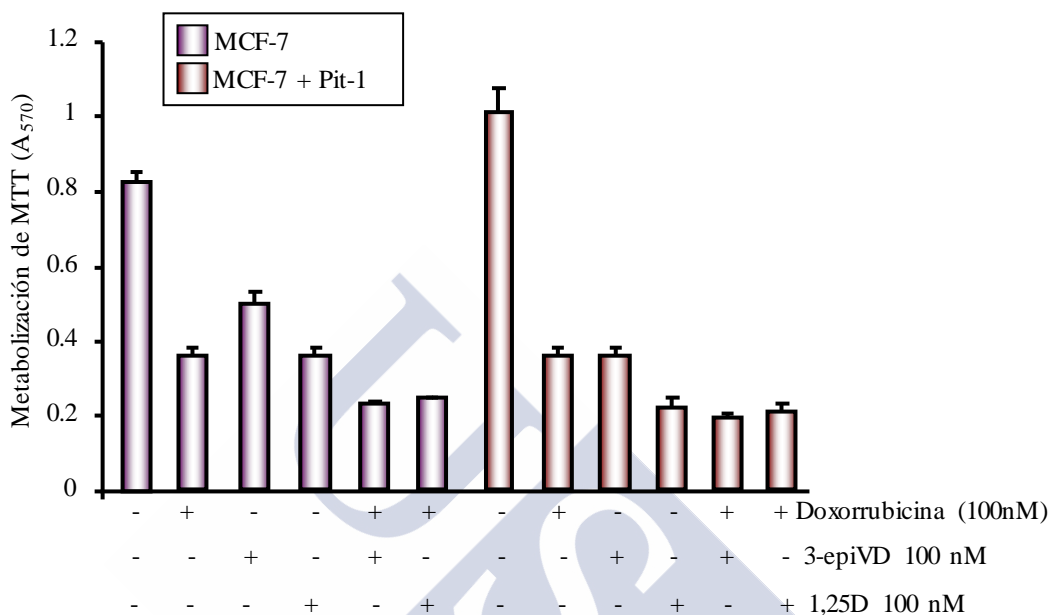


**Figura 19.** Izquierda: representación gráfica de la evolución del tamaño de los tumores inducidos en ratones con células MCF-7 con sobreexpresión de Pit-1. Derecha: representación del volumen tumoral al día 25 en los distintos grupos de tratamiento.

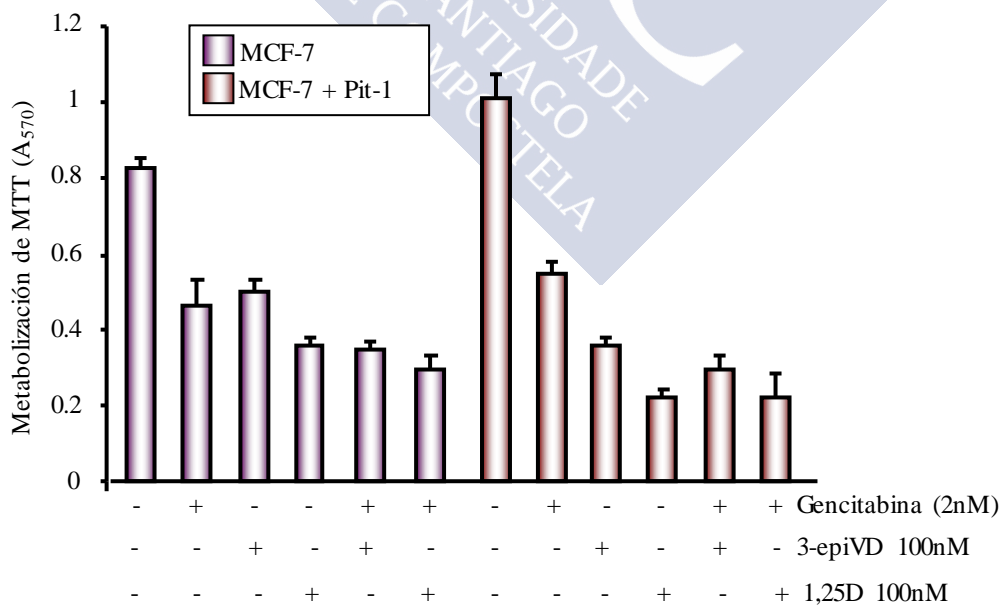
## 8. Efecto del tratamiento con 3-epiVD y quimioterapia sobre viabilidad/proliferación celular *in vitro*

Dado que 3-epiVD tiene un efecto inhibitorio sobre proliferación celular en líneas de adenocarcinoma de mama, nuestro siguiente objetivo fue valorar el efecto que sobre la viabilidad/proliferación celular tiene el tratamiento con 3-epiVD en combinación con tratamientos citotóxicos empleados en la práctica clínica, específicamente con doxorrubicina, gemcitabina, paclitaxel y cisplatino. Se emplearon células MCF-7 como modelo de cáncer de mama hormono-sensible o subtipo luminal. Dado que en los experimentos previos se había observado que 3-epiVD presenta distinta actividad sobre células con y sin sobreexpresión de Pit-1, en este experimento se emplearon células MCF-7 control y con sobreexpresión de Pit-1 (MCF7/Pit-1). Se realizaron ensayos MTT en células tratadas con 3-epiVD (100 nM), 1,25D (100 nM), doxorrubicina (100 nM), gemcitabina (2 nM), paclitaxel (1 nM) y cisplatino (1  $\mu$ M). Estas dosis de quimioterapia

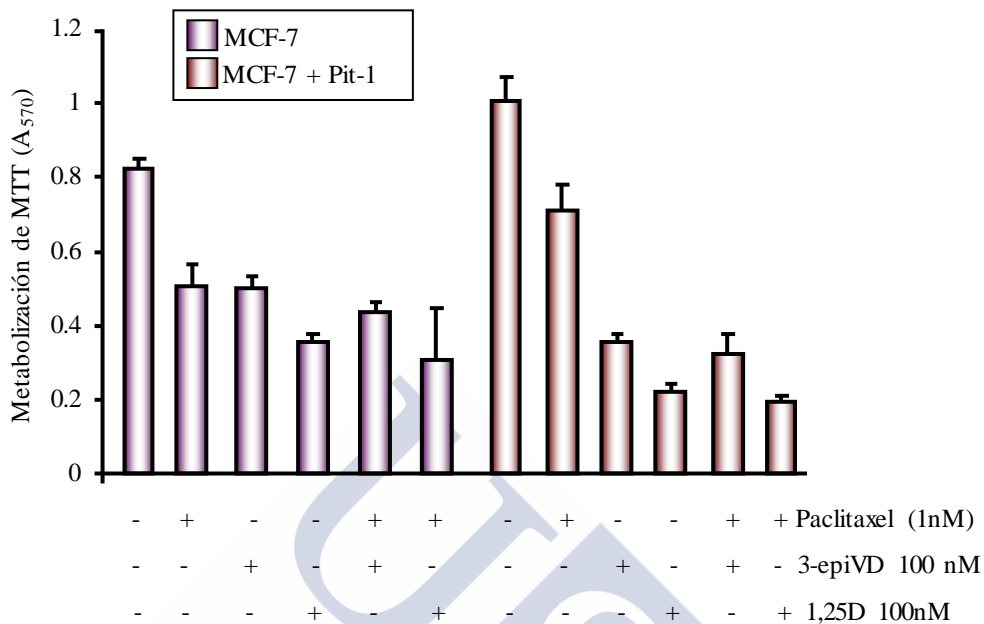
son las utilizadas habitualmente en cultivos *in vitro*. El tratamiento con 1,25D y 3-epiVD potencia la acción de la quimioterapia (placitaxel, doxorubicina, gemcitabina y cisplatino), y este efecto es más acusado en las células que sobreexpresan Pit-1 (Figuras 20- 23).



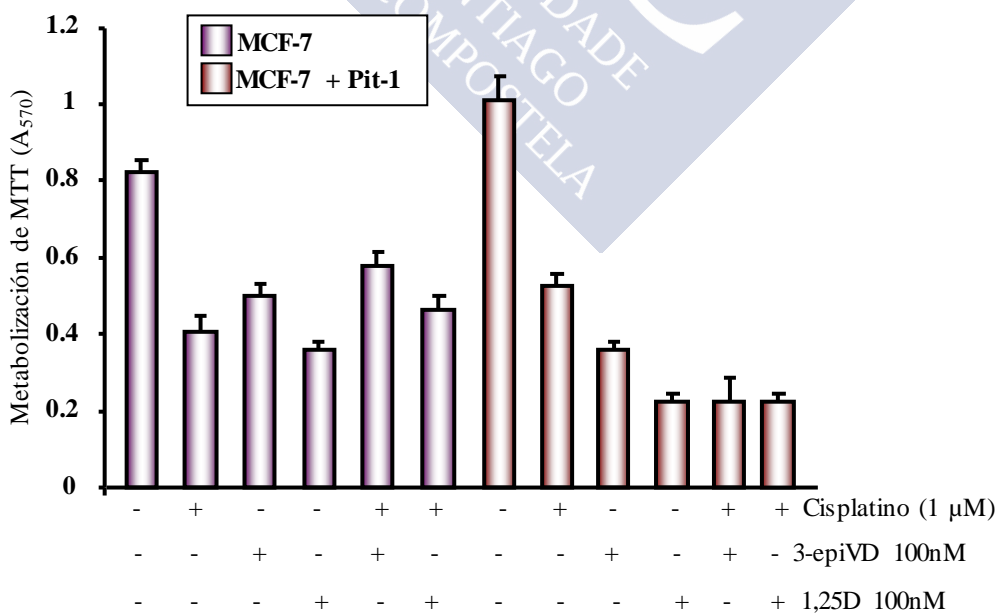
**Figura 20.** Viabilidad/proliferación celular en células MCF-7 control y con sobreexpresión de Pit-1 y tratadas solo con doxorubicina o combinada con 1,25D y 3-epiVD.



**Figura 21.** Viabilidad/proliferación celular en células MCF-7 control y con sobreexpresión de Pit-1 y tratadas solo con gemcitabina o combinada con 1,25D y 3-epiVD.



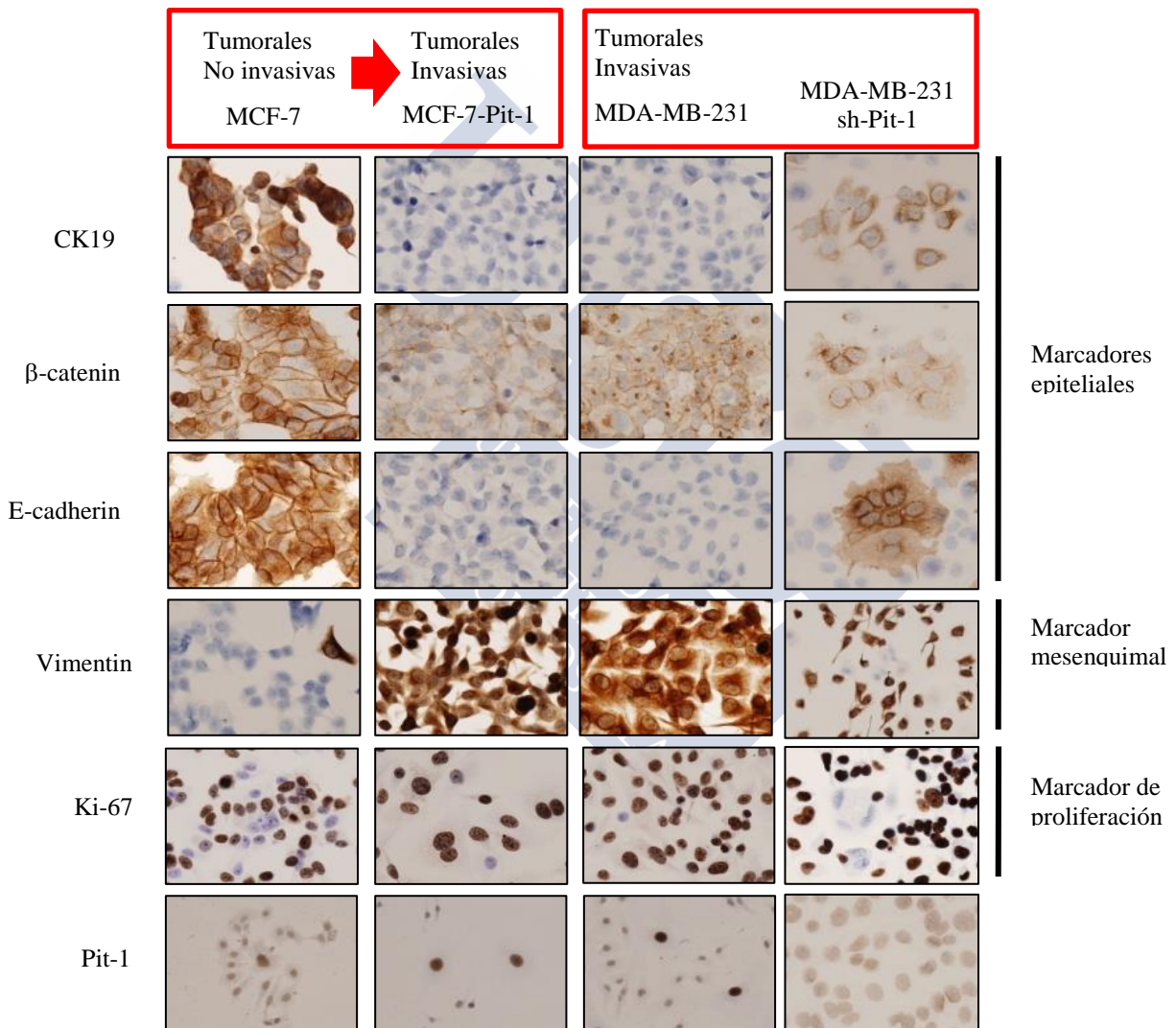
**Figura 22.** Viabilidad/proliferación celular en células MCF-7 control y con sobreexpresión de Pit-1 y tratadas solo con paclitaxel o combinado con 1,25D y 3-epiVD.



**Figura 23.** Viabilidad/proliferación celular en células MCF-7 control y con sobreexpresión de Pit-1 y tratadas solo con cisplatin o combinado con 1,25D y 3-epiVD.

## 9. Efecto del tratamiento con 3-epiVD y cisplatino sobre viabilidad/proliferación celular *in vitro*

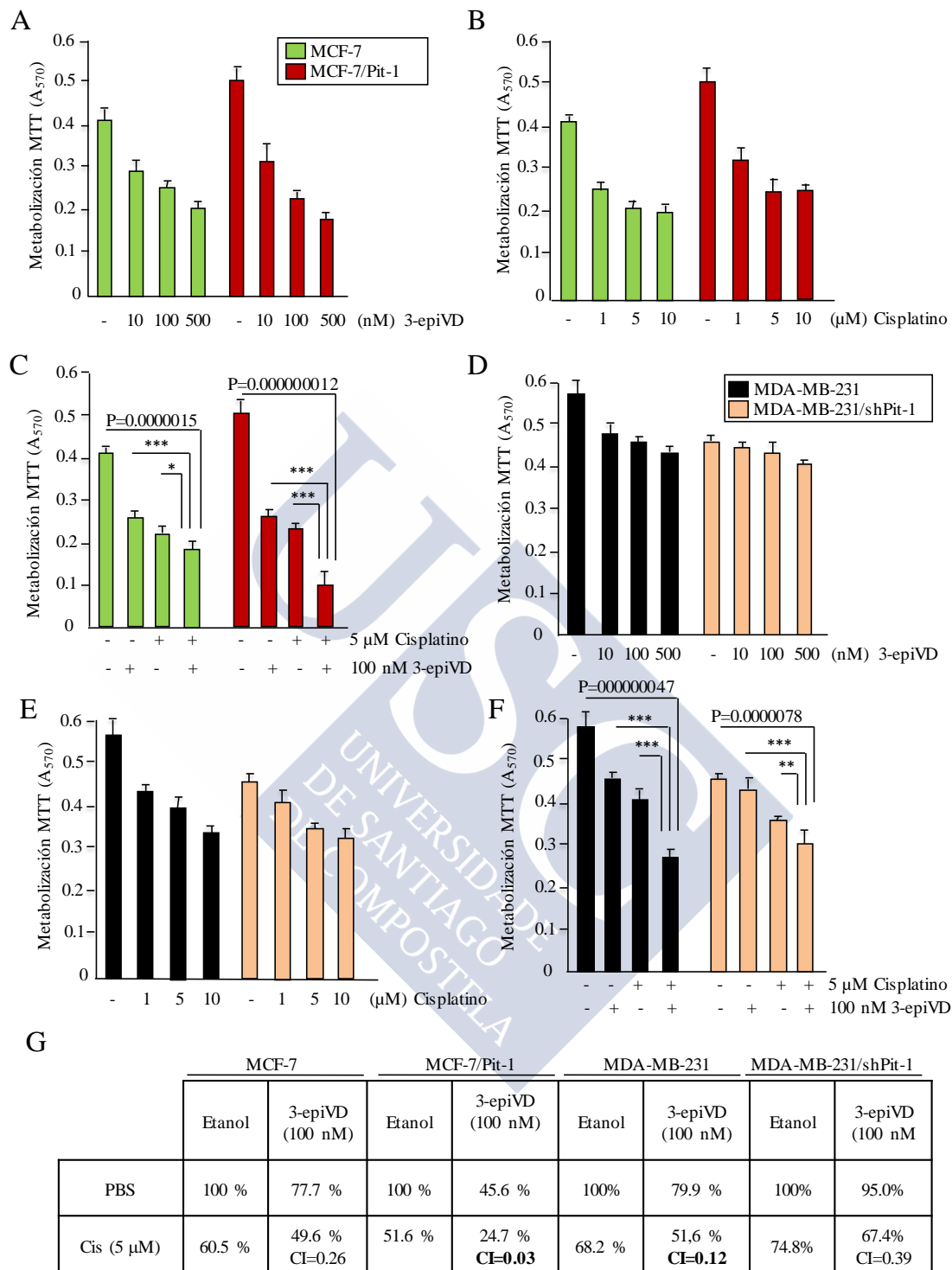
El cisplatino inhibe la síntesis de ADN produciendo enlaces cruzados dentro y entre las cadenas de ADN. Es un agente quimioterápico empleado en el tratamiento del cáncer de mama triple negativo y en tumores de mama asociados a mutaciones de BRCA-1 (Saether *et al.*, 2018). Este tipo de tumores tienen peor pronóstico que los otros subtipos.



**Figura 24.** Immunocitoquímica de células MCF-7 y MDA-MB-231 control y con sobreexpresión (MCF-7-Pit-1) y bloqueo (MDA-MB-231 shPit-1) de Pit-1. Se determinaron marcadores de proteínas epiteliales (CK9,  $\beta$ -catenina y E-cadherina), mesenquimales (vimentina) y de proliferación celular (ki-67).

La sobreexpresión de Pit-1 modifica a las células MCF-7 (modelo de tumor luminal A) hacia un fenotipo similar al triple negativo (Figura 24). Por ello, profundizamos en el estudio de la combinación de 3-epi VD con cisplatino en células con sobreexpresión de Pit-1.

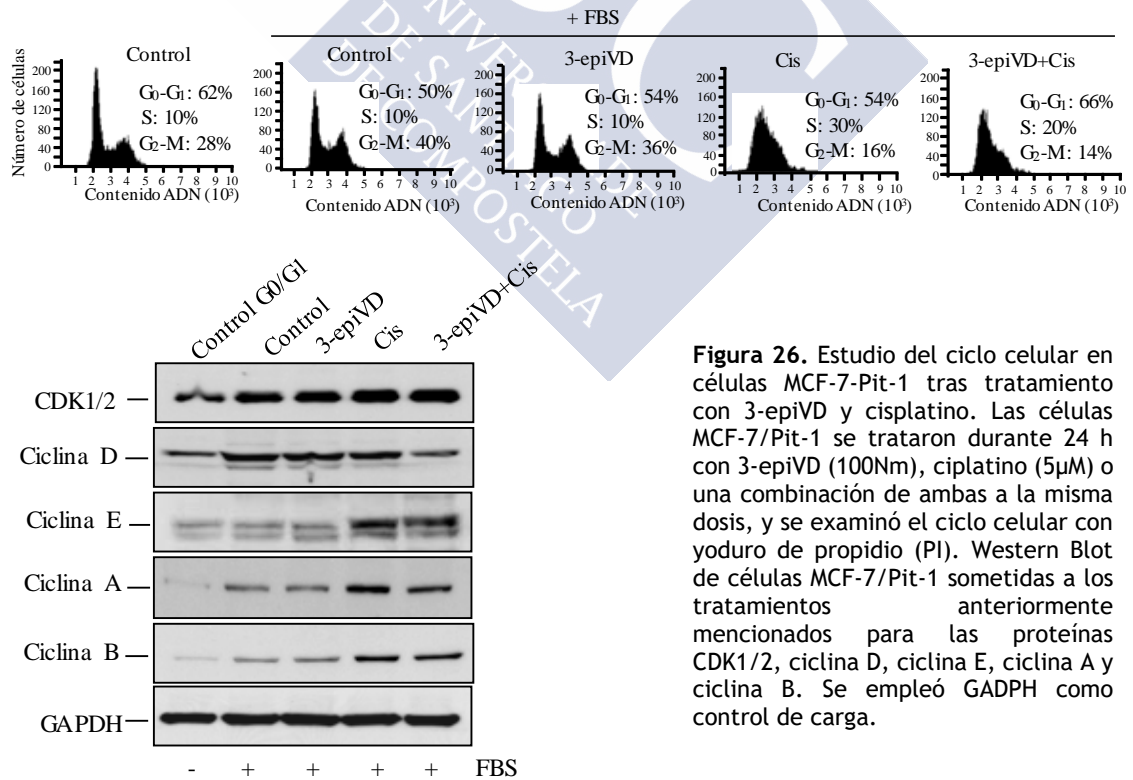
Se realizaron ensayos empleando 3-epiVD (100 nM) y cisplatino (5 $\mu$ M) en combinación en células MCF-7 control y con sobreexpresión de Pit-1 (MCF-7-Pit-1), y se procedió del mismo modo con células MDA-MB-231 control y con bloqueo de la expresión de Pit-1 utilizando un shRNA para Pit-1 (MDA-MB-231 shPit-1) (Figura 25A-F). Se calculó el índice de combinación (CI) para la combinación de cisplatino y 3-epiVD (Figura 25G). Según este índice los valores mayores de 1 indicarían antagonismo farmacológico, los valores menores de 1 indicaría sinergismo y los valores iguales a 1 efecto aditivo. El tratamiento con 3-epiVD disminuyó la viabilidad/proliferación celular en ambos tipos celulares, siendo este efecto proporcionalmente mayor cuando los niveles de Pit-1 expresados por las células eran mayores (Figura 25A y 25D). Como era de esperar, el tratamiento con cisplatino también disminuyó la viabilidad/proliferación celular en ambos tipos celulares (Figura 25B y 25E). La combinación de cisplatino y 3-epiVD indujo un significativo efecto inhibitorio sobre la viabilidad/proliferación celular mayor que el de cada una de las drogas por separado (Figuras 25C y 25F). Los índices de combinación calculados resultaron menores de 1 (Figura 25G) indicando sinergismo en la combinación de ambas drogas. Cabe destacar que estos valores fueron sustancialmente menores (indicando un sinergismo más potente) en células con mayor expresión de Pit-1.



**Figura 25.** Efecto del tratamiento con 3-epiVD y cisplatino sobre viabilidad/proliferación en células MCF-7 (barras verdes) y con sobreexpresión de Pit-1 (barras rojas) y MDA-MB-231 control (barra negra) y transfectadas con shRNA para Pit-1 (barra sepia) y tratadas con 3-epiVD (A y D), cisplatino (B y E) o una combinación de ambos (C y F). La Tabla G muestra los valores de células viables (expresados en porcentaje respecto del control tratado con PBS y etanol) tras tratamiento con cisplatino (5μM), 3-Epi-VD (100nM) o ambos. Se determinó el índice de combinación (CI) para la combinación de fármacos.

## 10. Estudio de ciclo celular en células MCF-7-Pit-1 tras el tratamiento con cisplatino y 3-epiVD

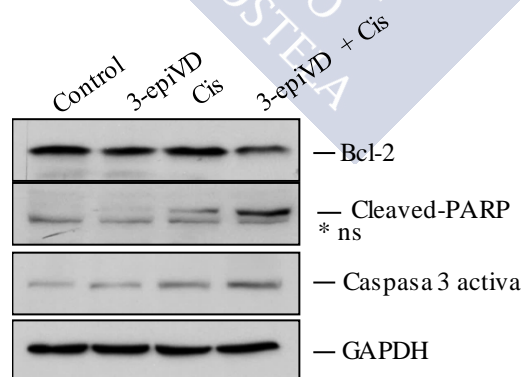
Para investigar por qué la combinación de cisplatino y 3-epiVD reduce la proliferación en células MCF-7 con sobreexpresión de Pit-1, evaluamos en primer lugar el efecto de la administración de 3-epiVD y cisplatino en el ciclo celular. Las células se trataron durante 24 horas con 3-epiVD (100 nM), cisplatino (5  $\mu$ M) y 3-epi (100 nM) + cisplatino (5  $\mu$ M), y luego se sometieron a citometría de flujo utilizando yoduro de propidio (PI). La administración de 3-epiVD no modificó significativamente el ciclo celular, en relación con las células de control. El tratamiento con cisplatino redujo G2-M y aumentó la fase S del ciclo celular con respecto al control y las células tratadas con 3-epiVD. La combinación de ambos fármacos aumentó la fase G0-G1 en comparación con la administración de cisplatino solamente (Figura 26). Para evaluar las proteínas involucradas en el ciclo celular, también se llevó a cabo un Western blot. Los resultados demuestran que el tratamiento con 3-epiVD + cisplatino reduce la expresión de ciclina D en relación con la administración de cisplatino de forma aislada.



## 11. Estudio de apoptosis en células MCF-7-Pit-1 tras el tratamiento con cisplatino y 3-epiVD

Para estudiar el efecto del tratamiento con 3-epiVD y cisplatino sobre la apoptosis, se cultivaron células MCF-7-Pit-1 y se trataron a las mismas dosis que las indicadas anteriormente para ciclo celular durante 48 h, posteriormente se tiñeron con Anexina V-FITC y PI y se cuantificaron en un citómetro de flujo. Nuestros resultados indican tasas significativas ( $P < 0,001$ ) de apoptosis temprana (anexina V+/PI-) en células tratadas con cisplatino + 3-epiVD, en comparación con células tratadas solamente con cisplatino (Figura 27). Además, los niveles de expresión de proteínas involucradas en apoptosis fueron evaluadas por Western blot. Se observaron mayores niveles de PARP escindida, de caspasa 3 activa y niveles disminuidos de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 tras el tratamiento con 3-epiVD + cisplatino, en relación con la administración de cisplatino solamente (Figura 27).

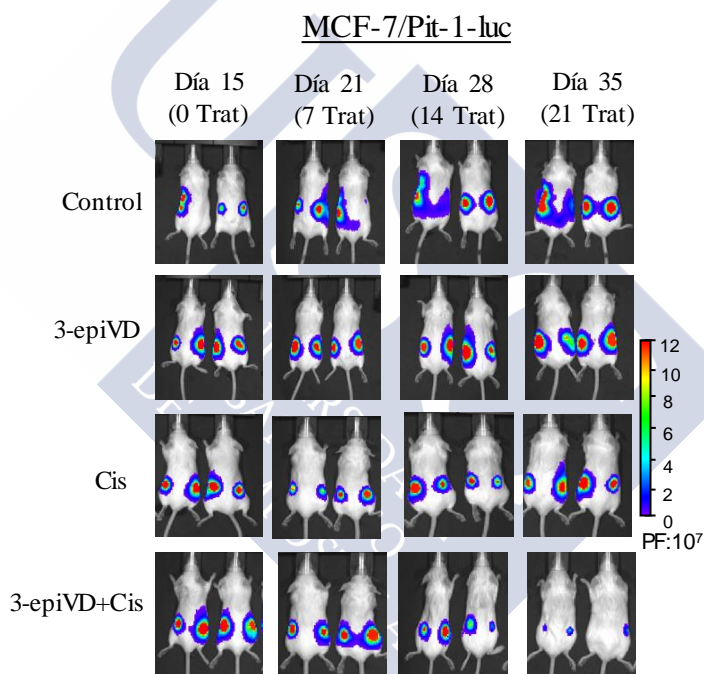
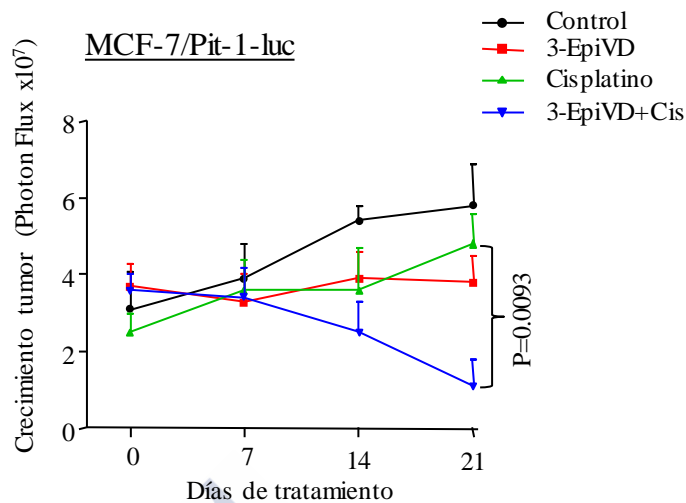
	Control	3-epiVD	Cis	3-epiVD+Cis
AnexinaV-/PI-	80.2 ± 1.1%	78.6 ± 0.9%	65.9 ± 1.6%	56.1 ± 6.7%
AnexinaV+/PI-	3.8 ± 1.9%	4.4 ± 2.1%	8.3 ± 2.4%	17.1 ± 0.1%
AnexinaV+/PI+	10.1 ± 0.2%	13.3 ± 5.1%	20.5 ± 6.3%	20.1 ± 10.1%
AnexinaV-/PI+	2.7 ± 1.4%	3.6 ± 2.1%	4.9 ± 2.1%	6.6 ± 4.5%



**Figura 27.** Análisis de apoptosis tras tratamiento con cisplatino y 3-epiVD en células MCF-7-Pit-1. Citometría de flujo de células MCF-7-Pit-1 tratadas durante 48 h con los fármacos mencionados y teñidos con anexina V y PI. La tabla muestra el porcentaje de celular teñidas con Anexina V y/o PI (media ± desviación estándar). Western blot de células MCF-7-Pit-1 tratadas durante 48 h con los fármacos mencionados en que se determina Bcl2 (antiapoptótica), PARP fraccionada y caspasa 3 activa (marcadores de apoptosis). Se empleó GAPDH como control de carga.

## 12. Efecto *in vivo* de los tratamientos con cisplatino y 3-epiVD

Los experimentos *in vitro* de los tratamientos con 3-epiVD y cisplatino indican que la combinación de 3-epiVD y cisplatino detienen el ciclo celular e incrementan apoptosis de forma significativamente mayor que cada uno de los tratamientos aislados. Por tanto, para valorar la eficacia de esta combinación de fármacos *in vivo*, repetimos la administración de 3-epiVD, cisplatino, o la combinación de ambos fármacos. Se utilizaron ratones SCID a los que se les indujeron tumores en el lomo por inyección subdérmica de células MFC-7/Pit-1-luc. Estas células expresan luciferasa, permitiendo el seguimiento del crecimiento tumoral mediante análisis de la bioluminiscencia con una cámara ultrasensible (IVIS). Los resultados de la evolución del crecimiento tumoral muestran que tanto el tratamiento con 3-epiVD como con cisplatino disminuye el tamaño tumoral respecto al grupo tratado con excipiente, pero cuando se empleaban ambos tratamientos juntos, la reducción era significativamente ( $P=0.009$ ) mayor que el tratamiento con solo cisplatino (Figura 28). Tras el sacrificio de los ratones se determinaron los niveles de calcio en sangre, no presentando diferencias estadísticamente significativas el grupo de ratones tratados con 3-epiVD en relación a los controles.



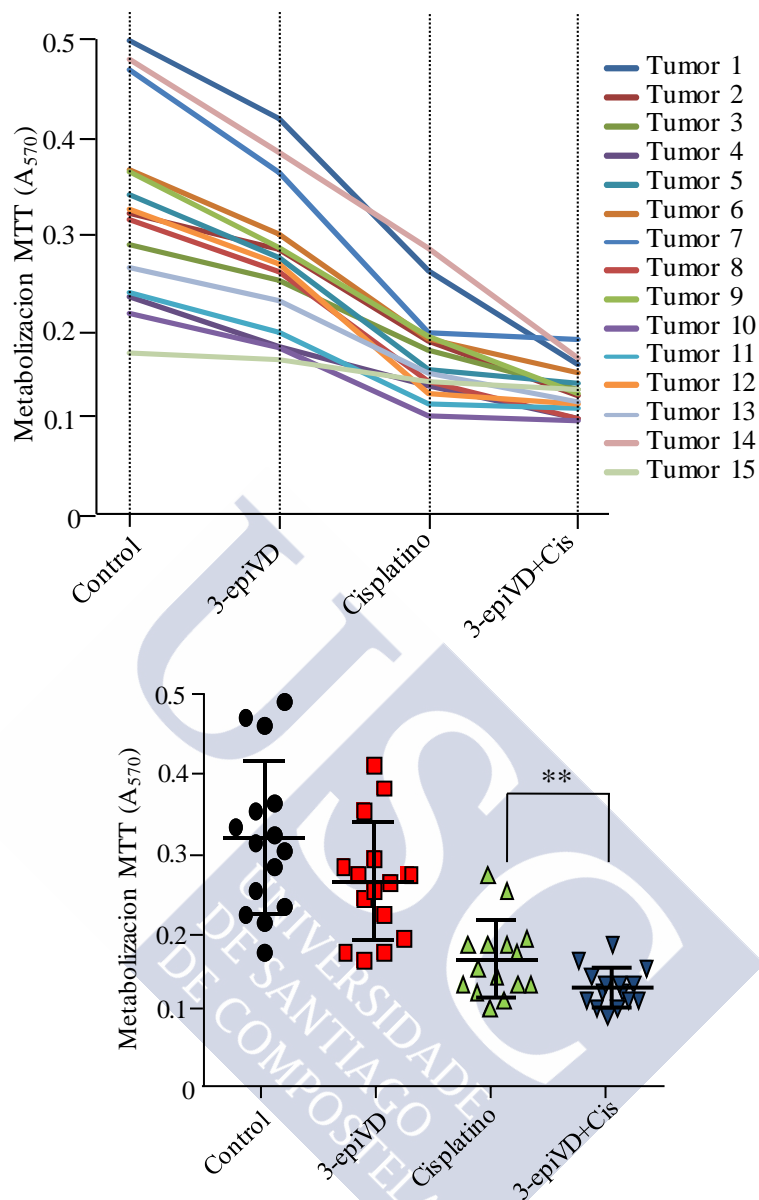
	Calcio en suero (mg/dl)
Control	8.11±0.13
3-epiVD	8.14±0.07
Cisplatin	8.10±0.23
3-epiVD+ Cis	8.19±0.14

**Figura 28.** Ratones SCID fueron inyectados en el lomo con células MCF-7/Pit-1-luc. Se establecieron cuatro grupos: a) controles, b) tratados con 3-epiVD (0,5 µg/kg i.p. cada 48 h), c) tratados con cisplatino (7mg/kg i.p. los días 0 y 7 de tratamiento) y d) combinación de 3-epiVD + cisplatino. Gráfico del crecimiento tumoral con los distintos tratamientos. Imágenes representativas de cada uno de los grupos de tratamiento. Tabla con los valores medios de calcemia de cada uno de los grupos de tratamiento.

### 13. Ensayo MTT en cultivos primarios de tumores de mama tratados *in vitro* con 3-epiVD, cisplatino o una combinación de ambos

Para verificar los resultados obtenidos en líneas celulares, tanto *in vitro* como *in vivo*, se repitieron los tratamientos con 3-epiVD y cisplatino en cultivos primarios de tumores de mama humana. Se utilizaron quince tumores que se trataron con 3-epiVD (100 nM), cisplatino (5  $\mu$ M), una combinación de ambos (3-epi VD 100 nM+ cisplatino 5 $\mu$ M) o excipiente (grupo control) y se realizó un ensayo MTT para valorar viabilidad/proliferación celular. Todas las muestras presentaron una reducción en la proliferación celular cuando se trataron con 3-epiVD, cisplatino y con la combinación de ambos (Figura 29). Sin embargo, el tratamiento con 3-epiVD + cisplatino fue superior al tratamiento con solo cisplatino (Figura 29).





**Figura 29.** Proliferación/viabilidad celular en cultivos primarios de tumores de mama tratados con 3-epiVD + cisplatino. Cultivos primarios de 15 tumores de mama se trataron durante 48 h con etanol (controles), 100 nM de 3-epiVD, 5  $\mu$ M de cisplatino o 100 nM de 3-epiVD + 5  $\mu$ M de cisplatino y se determinó proliferación por MTT. La proliferación celular se redujo significativamente con 3-epiVD+cis en comparación con el cisplatino (\*\*=P = 0.014).







En el presente trabajo ha sido analizado el efecto de un análogo de 1,25D, la 3-epiVD, administrado de forma aislada o en combinación con quimioterapia convencional en el tratamiento de cáncer de mama, tanto en líneas celulares o cultivos primarios de tumores de mama humana *in vitro*, como en ratones inmunodeficientes *in vivo*. Nuestros resultados demuestran que 3-epiVD posee propiedades anti-proliferativas y pro-apoptóticas sobre tumores de mama a dosis en las que no produce hipercalcemia. Además, posee un efecto sinérgico cuando se combina con cisplatino en tumores con alta expresión del factor de transcripción Pit-1 en las células tumorales, sugiriendo que esta combinación farmacológica (cisplatino + 3-epiVD) podría ser útil en mujeres con tumores de mama con elevada expresión de Pit-1.

Ha sido demostrado que el factor de transcripción Pit-1 está asociado con aumento de la proliferación, invasividad y disminución de la apoptosis en cáncer de mama *in vitro* (Gil-Puig *et al.*, 2005, Ben-Batalla *et al.*, 2010a) y con crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis pulmonares *in vivo* (Ben-Batalla *et al.*, 2010b). En una muestra de 110 tumores de mama humana, el 80% mostró expresión de Pit-1 mediante inmunohistoquímica (Ben-Batalla *et al.*, 2010b). Asimismo, en estudios clínicos en muestras de pacientes con cáncer de mama y metástasis ganglionares axilares, ha sido demostrada una relación significativamente inversa entre la expresión de Pit-1 en células tumorales y el intervalo de supervivencia libre de enfermedad (Ben-Batalla *et al.*, 2010, Gao *et al.*, 2016). Por ello, nuestro primer objetivo fue analizar la expresión de Pit-1 en líneas celulares de adenocarcinoma de mama humana. Se utilizaron líneas celulares con distinta agresividad, representativas de los distintos subtipos de cáncer de mama, es decir, positivas para receptores de estrógenos y en general menos agresivas (MCF-7, T47D), positivas para HER2 (BT474, SKBR3) y triples negativas, que, en general, son las más agresivas (HS578T, MDA-MB-231, HBL100, HCC1937, HCC1187) (Dai *et al.*, 2017). Todas las líneas celulares expresan Pit-1, siendo las líneas triples negativas, es decir, las más agresivas, las de mayores niveles de Pit-1, tanto a nivel de ARNm, como a nivel proteico.

Para intentar relacionar a Pit-1 como factor pro-oncogénico, con un conocido factor antitumoral como es la 1,25D (Feldman *et al.*, 2014), analizamos la expresión de ARNm y proteína del receptor de 1,25D (VDR) en las mismas líneas celulares de cáncer de mama. Nuestros resultados demuestran que VDR se expresa en todas las líneas celulares

evaluadas. La expresión de VDR ya había sido previamente demostrada por otros autores en líneas celulares de tumores de mama, los cuales señalaban que VDR se expresa en niveles relativamente elevados en células bien diferenciadas (por ejemplo en MCF-7), y en bajos niveles en líneas celulares poco diferenciadas (por ejemplo en MDA-MB-231), sugiriendo que el nivel de inhibición del crecimiento o proliferación celular tras tratamiento con 1,25D es dependiente de los niveles de expresión de VDR (Buras *et al.*, 1994). De hecho, ha sido demostrado que los niveles de expresión de VDR son más elevados en mama normal, disminuyen progresivamente en las lesiones benignas de mama, en el carcinoma ductal *in situ* y alcanzan su menor expresión en el carcinoma invasivo, lo cual a su vez se correlaciona con la mayor expresión del enzima encargado del catabolismo de la 1,25D, la CYP24A1, en el carcinoma invasivo (Lopes *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2012). Nuestros datos concuerdan con los ya publicados, indicando además, y por primera vez, que la expresión de VDR está en relación inversa con la expresión de Pit-1 en líneas celulares de cáncer de mama.

1,25D tiene actividad antiproliferativa y pro-apoptótica tanto *in vitro* como *in vivo* sobre células de cáncer de mama (Feldman *et al.*, 2014). Sin embargo, dosis altas de 1,25D pueden producir hipercalcemia que se manifiesta clínicamente por letargia, debilidad, insuficiencia renal, alteraciones cardíacas como bloqueo auriculo-ventricular, ensanchamiento de la onda T, acortamiento del intervalo QT y arritmias malignas, que pueden ocasionar paro cardíaco. Así, algunos ensayos clínicos en los que se empleó la 1,25D a dosis elevadas tuvieron que interrumpirse antes de su conclusión, al desarrollar los pacientes hipercalcemia. En otros estudios se emplearon a dosis muy inferiores a las que se cree podría generar un efecto anti-tumoral clínicamente significativo (Beer *et al.*, 2006). La 3-epiVD es un compuesto presente en el organismo en condiciones normales. Su estructura química es un isómero óptico de la 1,25D que se forma como consecuencia de un cambio de orientación del grupo hidroxilo del carbono 3, de posición  $\beta$  a  $\alpha$  (Sekimoto *et al.*, 1999). Nuestra primera aproximación experimental fue para determinar si 3-epiVD tenía capacidad para regular genes diana de la 1,25D. Nuestros resultados demuestran que 3-epiVD regula al gen que codifica a 24 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP24A1), un conocido gen diana de 1,25D, que interviene de forma clave en el catabolismo de la 1,25D, y lo hace a concentraciones un poco mayores, pero del mismo orden de magnitud que 1,25D. Nuestros

resultados son similares a estudios previos, en los que se demuestra que 3-epiVD es ligeramente, pero no significativamente, menos activa que 1,25D en la regulación transcripcional de genes diana de 1,25D, como los implicados en la inhibición de la proliferación, regulación de la hormona paratiroidea (PTH), osteopontina, o genes relacionados con la movilización de calcio (Masuda *et al.*, 2000, Brown *et al.*, 1999, Harant *et al.*, 2000, Norman *et al.*, 1993).

Dado que 3-epiVD activa a genes también regulados por 1,25D, nuestro siguiente objetivo fue determinar el efecto de la administración de 3-epiVD *in vivo* sobre los niveles de calcio en sangre. Mientras que la administración de 1,25D incrementó la calcemia a dosis de 0,3 µg/kg en relación a los controles, no se observó un incremento significativo con 3-epiVD incluso a dosis tres veces superiores. Nuestros resultados sugieren que 3-epiVD podría emplearse como agente terapéutico *in vivo* evitando (o reduciendo) la hipercalcemia como efecto secundario no deseado.

Nuestro siguiente objetivo fue evaluar si 3-epiVD reduce la expresión de Pit-1. Para ello, se determinaron los niveles de expresión proteica de Pit-1 tras tratamiento con 3-epiVD o con 1,25D. Tanto en células MCF-7 (que expresan niveles bajos de Pit-1) como MDA-MB-231 (con elevados niveles de Pit-1), el tratamiento con 3-epiVD disminuyó los niveles de Pit-1. Estudios previos ya habían demostrado que la administración de 1,25D disminuye la expresión de Pit-1. Esta regulación se realiza a nivel transcripcional, uniéndose el complejo 1,25D-VDR al promotor de Pit-1 y reclutando a la histona deacetilasa1 (HDAC1) (Seoane *et al.*, 2007). En este trabajo no se ha evaluado la regulación transcripcional de Pit-1 por 3-epiVD, pero dado que 3-epiVD y 1,25D parecen regular a los mismos genes, no es aventurado hipotetizar que 3-epiVD también regularía a Pit-1 a nivel transcripcional.

Con el objetivo de determinar si 3-epiVD posee actividad antitumoral similar a la 1,25D, se evaluó la proliferación celular con bromodeoxiuridina en líneas tumorales de mama no invasivas (MCF-7). Dado que, tanto 3-epiVD como 1,25D inhiben a Pit-1, se utilizaron también líneas celulares con sobreexpresión de Pit-1 (MCF-7-Pit-1). Nuestros resultados demuestran que las células con sobreexpresión de Pit-1 proliferan significativamente más que las células control, datos que corroboran otros ya publicados previamente (Gil-Puig *et al.*, 2005, Ben-Batalla *et al.*, 2010b). El tratamiento con 3-epiVD

disminuye la proliferación celular tanto en células MCF-7 como en MCF-7-Pit-1 de un modo similar a la 1,25D, mostrando ambos tratamientos un mayor efecto sobre las células con sobreexpresión de Pit-1.

Para confirmar los resultados obtenidos en líneas celulares, repetimos los tratamientos en ratones SCID *in vivo* a los que se inyectaron células MCF7 o células MCF-7-Pit-1 en el lomo. El tratamiento con 3-epiVD ralentiza el crecimiento tumoral de forma significativa a los 25 días, en comparación con los animales tratados con excipiente. Los tumores inducidos por células con sobreexpresión de Pit-1 alcanzaron mayores volúmenes, de modo similar a experimentos previamente publicados (Ben-Batalla *et al.*, 2010b). En estos tumores, tanto 3-epiVD como 1,25D lograron una mayor reducción del tamaño tumoral que en aquellos inyectados con células MCF-7 sin sobreexpresión de Pit-1.

Existen datos previos sobre la actividad antitumoral de 1,25D combinada con agentes quimioterápicos (Ma *et al.*, 2010a). La doxorrubicina es un agente que produce daño en el ADN. Ha sido demostrado que 1,25D sensibiliza a las células de cáncer de mama al tratamiento con este fármaco a través de la inhibición de la expresión y de la actividad del enzima antioxidante Cu/Zn superóxido dismutasa, incrementando de este modo el daño oxidativo ocasionado por el quimioterápico (Ravid *et al.*, 1999). La gemcitabina es un análogo de los nucleósidos. Sobre líneas celulares de carcinoma vesical, 1,25D, administrado junto con gemcitabina, provoca un efecto sinérgico anti-proliferativo (Ma *et al.*, 2010b). Paclitaxel es un fármaco que inhibe la función del microtúbulo, impidiendo por tanto la división celular. La adición de 1,25D a paclitaxel provoca un efecto aditivo *in vitro* (Wang *et al.*, 2000). El cisplatino inhibe la síntesis de ADN produciendo enlaces cruzados dentro y entre las cadenas de ADN. Se ha demostrado un efecto sensibilizador al añadir 1,25D al tratamiento con cisplatino *in vitro* en líneas celulares de cáncer de mama (Cho *et al.*, 1991). En este trabajo, evaluamos el efecto del tratamiento con 3-epiVD y 1,25D combinadas con doxorrubicina, gemcitabina, paclitaxel y cisplatino. La 1,25D en combinación con la quimioterapia mostró actividad inhibitoria sobre viabilidad/proliferación celular similar a la ya descrita en las publicaciones mencionadas. Esta actividad inhibitoria fue mayor en células con sobreexpresión de Pit-1. 3-epiVD disminuyó también de forma significativa la viabilidad/proliferación celular cuando se asoció a estos agentes quimioterápicos, siendo su efecto mayor, al igual que ocurre con la

1,25D, cuando se empleaba como tratamiento en células con sobreexpresión de Pit-1. La combinación más efectiva de 3-epiVD con quimioterapia sobre la disminución de la proliferación celular se produce con cisplatino. Por ello nos centramos en una evaluación más detallada en este compuesto.

El cisplatino es un agente quimioterápico que ha suscitado interés en los últimos años en el tratamiento del cáncer de mama triple negativo y en tumores de mama asociados a mutaciones de BRCA-1 por el incremento en la supervivencia de las pacientes tratadas con este fármaco (Saether *et al.*, 2018). Los carcinomas de mama triple negativos representan aproximadamente el 15% del total de cánceres de mama, presentando peor pronóstico, dado que tienen mayor tendencia a la recidiva local, al desarrollo de metástasis y menor supervivencia (Goldhirsch *et al.*, 2013, Prat *et al.*, 2013, Maisonneuve *et al.*, 2014). Los tumores triple negativos, al contrario que los tumores luminales que pueden tratarse con hormonoterapia y los tumores HER-2 con anticuerpos monoclonales, carecen de tratamiento específico y la quimioterapia es el único tratamiento sistémico aprobado, tanto como tratamiento adyuvante como en el tratamiento de la enfermedad metastásica, con los conocidos efectos indeseables que acarrea. En este escenario, un objetivo prioritario es el encontrar terapias que mejoren el efecto de la quimioterapia o puedan emplearse como tratamiento de mantenimiento.

Dado que: a) la sobreexpresión de Pit-1 modifica a las células MCF-7 (modelo de tumor luminal A) hacia un fenotipo similar al triple negativo (Figura 25), b) que los tumores de mama con mayores niveles de Pit-1 presentan un peor pronóstico (Ben Batalla *et al.*, 2010b, Gao *et al.*, 2016), y c) que las líneas celulares que se emplean como modelo de cáncer de mama triple negativo (Dai *et al.*, 2017) sobreexpresan Pit-1, decidimos investigar si la combinación de cisplatino con 3-epiVD en células con sobreexpresión de Pit-1 era más efectiva que el tratamiento con cisplatino solamente. Los ensayos de proliferación celular demostraron que, tanto en células MCF-7 como en MCF-7-Pit-1, al añadir 3-epiVD a cisplatino se disminuía de forma sinérgica la proliferación celular. El cisplatino se une a las bases de purina del ADN, interfiriendo los mecanismos de reparación, produciendo daño del ADN y subsecuentemente induciendo apoptosis en las células tumorales. Nuestros datos están en relación con los obtenidos por Cho y col. (1991), en líneas celulares de cáncer de mama, demostrando que la combinación de cisplatino y 1,25D tiene un efecto

sinérgico, reduciendo la proliferación celular. También *in vitro*, los análogos de vitamina D, PRI-2191 y PRI-1906 en células T47D (Luminal A) mostraron un efecto sinérgico con cisplatino sobre la proliferación celular (Pelzynska, *et al.*, 2006). En líneas celulares de cáncer de mama triple negativo tratadas con 1,25D y el análogo EB1089 en combinación con cisplatino, también se observó un sinergismo sobre proliferación celular (Thakkar *et al.*, 2016), siendo el análogo EB1089 todavía más activo que 1,25D.

Como cisplatino y 3-epiVD tienen un efecto sinérgico sobre viabilidad/proliferación celular, nos planteamos analizar su mecanismo de acción. Las causas más probables de disminución de la proliferación celular son a nivel del ciclo celular (parada del ciclo celular) y sobre la muerte celular (aumento de la apoptosis). Demostramos que la combinación 3-epiVD y cisplatino actúa sobre ambas. En relación al ciclo celular, esta combinación de fármacos, respecto a la administración de cisplatino solamente, aumentó significativamente el porcentaje de células en fase G0-G1 y disminuyó el porcentaje de células en fase S y en fase G2-M, provocando una clara disminución de los niveles de la proteína ciclina D, que es clave en el inicio del ciclo celular, lo cual indica que las células tratadas con 3-epiVD+ cisplatino se acumulan en la fase G0-G1, es decir, se detiene el ciclo celular. En relación con la apoptosis, nuestros datos demuestran que cuando añadimos 3-epiVD a cisplatino aumentan las células en apoptosis temprana (annexinaV+ y PI-), disminuye Bcl-2 (proteína anti-apoptótica), y aumentan *cleaved* PARP y caspasa 3 activa (marcadores de daño apoptótico), indicando que esta combinación incrementa la apoptosis celular.

La parada de ciclo celular en G0-G1 tras combinación de 1,25D o un análogo de 1,25D (Ro23-7553) y cisplatino ya había sido observada previamente por el grupo de Johnson y col. utilizando líneas de carcinoma de células escamosas de ratón, demostrando además un claro efecto antitumoral *in vivo* (Light *et al.*, 1997). Posteriormente, este mismo grupo demostró en el mismo modelo celular, un incremento de la apoptosis tras administración de 1,25D con cisplatino, en relación a la administración de cisplatino solamente, a través de la vía de caspasas 8/10-caspasa 3 (Ma *et al.*, 2008). Otros investigadores han demostrado también que 1,25D aumenta la citotoxicidad del cisplatino a través de una regulación positiva de MEKK-1, lo que genera señales pro-apoptóticas a través de la vía (SEK1)-JNK-Jun y las vías de estrés MKK3/MKK6-p38 MAPK y también a través de efectos

inhibitorios sobre la reparación del ADN celular (Hershberger *et al.* 2002). Aunque en nuestro estudio no hemos valorado la expresión de MEEK-1, no es descartable que 3-epiVD combinada con cisplatino actúe también a través de este mecanismo.

Dado que los resultados *in vitro* muestran un efecto antiproliferativo, de parada de ciclo celular y pro-apoptótico tras el tratamiento combinado de cisplatino y 3-epiVD, se valoró si se reproducían estos efectos *in vivo* en ratones inmunodeficientes (SCID) inyectados subcutáneamente con células MCF-7-Pit-1 marcadas con luciferasa. Demostramos que el tratamiento con 3-epiVD y cisplatino disminuyó el crecimiento tumoral de forma significativa en relación con el tratamiento con cisplatino solamente. Además, no se evidenció alteración en las cifras de calcio en sangre. Finalmente, y con el fin de comprobar si los resultados obtenidos utilizando líneas celulares eran trasladables a tumores de pacientes, se trataron 15 tumores de mama humana (cultivos primarios) con la misma combinación de fármacos. Nuestros resultados confirmaron, nuevamente, la eficacia de la combinación cisplatino + 3-epiVD para disminuir la proliferación celular en comparación con la administración de cisplatino de forma aislada.

Dentro de la célula, el átomo de platino de la molécula de cisplatino forma enlaces covalentes con los átomos de nitrógeno de las bases de purina formando enlaces dentro de la cadena y, en menor medida, entre cadenas de ADN. Estas alteraciones interfieren la replicación y transcripción del ADN. La estructura de la cadena se altera, lo que reconocen las proteínas reparadoras. En este punto la célula puede detener la progresión del ciclo celular y e intentar reparar el daño inducido por el cisplatino, si no lo consigue la célula entra en apoptosis (Basu *et al.*, 2010). BRCA1 y MRE11 son unas de las proteínas implicadas en la reparación del daño al ADN originado por el cisplatino.

La proteína BRCA1 está implicada en la reparación de roturas de la doble hebra del ADN, mediante el proceso de recombinación homóloga. Este mecanismo de reparación emplea la secuencia de ADN homóloga en la cromátida hermana como patrón para corregir el daño del ADN. Se realiza durante las fases S y G2, cuando la cromátida hermana está disponible. La recombinación homóloga, al emplear la secuencia como patrón para la reparación, es un proceso conservador y eventualmente libre de errores. Cuando existe una deficiencia de BRCA1, no se puede efectuar este proceso, entonces se emplean otras formas de reparación del daño de la doble hebra de ADN. Uno de estos mecanismos es la

unión de extremos no homólogos, que corrige el defecto de la cadena ligando los extremos rotos del ADN, pero, dado que no emplea ningún patrón para la reparación, es proclive a generar errores en la secuencia, lo que conlleva inestabilidad genómica y favorece la tumorigénesis. Además de las portadoras de mutaciones en BRCA1, pacientes sin mutaciones somáticas pueden presentar tumores con defectos en el proceso de recombinación homóloga, fenotípica y biológicamente similares a los de las portadoras de mutaciones en BRCA 1 y que, eventualmente, se beneficien de terapias similares (Nicolas *et al.*, 2018). Por ejemplo, se ha observado una mejor tasa de respuesta al tratamiento con derivados del platino en pacientes con cáncer de mama con niveles bajos de BRCA1 (Byrski *et al.* 2012; Byrski *et al.*, 2014; Tutt *et al.*, 2018). Por otra parte, el tratamiento con 1,25D o análogos de vitamina D incrementa la expresión de BRCA1 en líneas celulares de cáncer de mama (Campbell *et al.*, 1997; Campbell *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la asociación entre BRCA1 y VDR activa genes implicados en las acciones antitumorales de la vitamina D y que la supresión de BRCA1 anula los efectos de los análogos de vitamina D (Pickholtz *et al.*, 2014). Aunque en este trabajo no hemos determinado los niveles de BRCA1, estos datos apoyan la eficacia de cisplatino+3-epiVD en este tipo de tumores.

Otra proteína implicada en la reparación del ADN es MRE11. Se ha demostrado que Pit-1 se une e inhibe la expresión de *MRE11*, sensibilizando las células de cáncer de mama a los tratamientos quimioterápicos (Huang *et al.*, 2015). Aunque en nuestro trabajo no hemos valorado los niveles de MRE11, sí hemos evidenciado que los niveles de expresión de Pit-1 en las células tumorales de cáncer de mama son predictores de respuesta a tratamiento con 3-epi y cisplatino, y por tanto nuestros resultados son concordantes con las publicaciones previas en este sentido.

Como resumen, nuestros resultados indican que el análogo 3-epiVD comparte acciones antiproliferativas de la 1,25D *in vitro*, e *in vivo* posee actividad antitumoral sin producir hipercalcemia. Cisplatino y 3-epiVD es una combinación sinérgica que reduce la proliferación celular, deteniendo el ciclo e incrementando apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama. Asimismo, reduce el crecimiento tumoral en xenoinjertos de líneas celulares y la proliferación celular en cultivos primarios de cáncer de mama. El efecto antitumoral de 3-epiVD es significativamente mayor en células con sobreexpresión de Pit-1,

por lo que Pit-1 pudiera emplearse como predictor de respuesta a tratamiento con 3-epiVD, sola o en combinación con cisplatino.





## CONCLUSIONES

---





Las conclusiones de este estudio son:

1. El análogo 3-epiVD tiene propiedades anti-tumorales en líneas celulares de cáncer de mama y en cultivos primarios de tumores de mama humana.
2. El análogo 3-epiVD tiene propiedades anti-tumorales *in vivo* en xenoinjertos de tumores de mama humana en ratones inmunodeficientes sin inducir hipercalcemia a las dosis empleadas.
3. La combinación de 3-epiVD con gemcitabina, doxorrubicina, paclitaxel, o cisplatino disminuye la proliferación en líneas celulares de cáncer de mama en relación al tratamiento quimioterápico de forma aislada.
4. La combinación de 3-epiVD y cisplatino disminuye sinérgicamente la proliferación en líneas celulares de cáncer de mama, tanto *in vivo* como *in vitro*. Este efecto se presenta también en cultivos primarios de tumores de mama *in vitro*.
5. Los efectos anti-tumorales de 3-epiVD tanto administrada de forma aislada como combinada con cisplatino son mayores en células tumorales con sobreexpresión del factor de transcripción Pit-1 y por tanto la determinación de Pit-1 podría emplearse en pacientes como predictor de la respuesta a este tratamiento



## BIBLIOGRAFÍA

---





AIHW (Australian Institute of Health and Welfare) (2009). Breast cancer in Australia: an overview, 2009. Cat. no. CAN 46. Canberra: AIHW. Revisado el 11 de junio de 2015. <<http://www.aihw.gov.au/publication-detail/?id=6442468297>>.

Amir, E., Simmons, C.E., Freedman, O.C., Dranitsaris, G., Cole, D.E.C., Vieth, R., Ooi, W.S., Clemons, M. (2010) A phase 2 trial exploring the effects of high-dose (10.000 UI/day) vitamin D (3) in breast cancer patients with bone metastases. *Cancer*, 116: 284-291.

Asa, S.L., Puy, L.A., Lew, A.M., Sundmark, V.C., Elsholtz, H.P. (1993) Cell type-specific expression of the pituitary transcription activator Pit-1 in the human pituitary and pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 77: 1275–1280.

Astecker, N., Reddy, G.S., Herzig, G., Vorisek, G., Schuster, I. (2000) 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D<sub>3</sub> a physiological metabolite of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: its production and metabolism in primary human keratinocytes. *Mol Cell Endocrinol*, 170: 91-101.

Bamberger, A.M., Bamberger, C.M., Pu, L.P., Puy, L.A., Loh, Y.P., Asa, S.L. (1995) Expression of Pit-1 messenger ribonucleic acid and protein in the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, 80: 2021-2026.

Bandera Merchan, J., Morcillo, S., Martín-Nuñez, G., Tinahones, F.J., Macías-González, M. (2017) The role of vitamin D and VDR in carcinogénesis: Through epidemiology and basic sciences. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 167: 203-218.

Basu, A., Krishnamurthy, S. (2010) Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids*, 2010: 201367.

Beer, T.M., Myrthue, A. (2006) Calcitriol in the treatment of prostate cancer. *Anticancer Res*, 26: 2647-2651.

Ben-Batalla, I., Seoane, S., Macia, M., Garcia-Caballero, T., Gonzalez, L.O., Vizoso, F., Perez-Fernandez, R. (2010a) The Pit-1/Pou1f1 transcription factor regulates and correlates with prolactin expression in human breast cell lines and tumors. *Endocr Relat Cancer*, 17: 73-85.

Ben-Batalla, I., Seoane, S., Garcia-Caballero, T., Gallego, R., Macia, M., Gonzalez, L.O., Vizoso, F., Pérez-Fernández, R. (2010b) Dereglulation of the Pit-1 transcription factor

in human breast cancer cells promotes tumor growth and metastasis. *J Clin Invest*, 120: 4289-4302.

Bischof, M.G., Siu-Caldera, M.L., Weiskopf, A., Vouros, P., Cross, H.S., Peterlik, M., Reddy, G.S. (1998) Differentiation-related pathways of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol metabolism in human colon adenocarcinoma-derived Caco-2 cells: Production of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-3 $\epsilon$ -epi-cholecalciferol. *Exp Cell Res*, 241: 194–201.

Brown, A.J., Ritter, C., Slatopolsky, E., Muralidharan, K.R., Okamura, W.H., Reddy, G.S. (1999) 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D<sub>3</sub>, a natural metabolite of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, is a potent suppressor of parathyroid hormone secretion. *J Cell Biochem*, 73: 106-113.

Buras, R.R., Schumaker, L.M., Davoodi, F., Brenner, R.V., Shabahang, M. Nauta, R.J., Evans, S.R.T. (1994) Vitamin D receptors in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 31: 191-202.

Byrski, T., Dent, R., Blecharz, P., Foszczynska-Kloda, M., Gronwald, J., Huzarski, T., Cybulski, C., Marczyk, E., Chrzan, R., Eisen, A., Lubinski, J., Narod, S.A. (2012) Results of a phase II open-label, non-randomized trial of cisplatin chemotherapy in patients with BRCA1-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*, 14: R110.

Byrski, T., Huzarski, T., Dent, R., Marczyk, E., Jasiowka, M., Gronwald, J., Jakubowicz, J., Cybulski, C., Wisniowski, R., Godlewski, D., Lubinski, J., Narod, S.A. (2014) Pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 147: 401–405.

Campbell, M.J., Reddy, S.G., Koeffler, H.P. (1997) Vitamin D<sub>3</sub> analogs and their 24-oxo metabolites equally inhibit clonal proliferation of a variety of cancer cells but have differing molecular effects. *J Cell Biochem*, 66: 413–425.

Campbell, M.J., Gombart, A.F., Kwok, S.H., Park, S., Koeffler, H.P. (2000) The antiproliferative effects of 1 $\alpha$ , (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on breast and prostate cancer cells are associated with induction of BRCA1 gene expression. *Oncogene*, 19: 5091–5097.

Cardoso, F., Van 't Veer, L.J., Bogaerts, J., Slaets, L., Viale, G., Delalogue, S., Pierga, J. Y., Brain, E., Causeret, S., DeLorenzi, M., Glas, A.M, Goulinopoulos, V., Goulioti, T., Knox, S.; Matos, E., Meulemans, B., Neijenhuis, P.A., Nitz, U., Passalacqua, R., Radvin, P., Rubio, I.T., Saghatchian, M., Smilde, T.J., Sotiriou, C., Stork, L., Strahle, C., Thomas,

G., Thompson, A.M., van der Hoeven, J.M., Vuylsteke, P., Bernardis, R., Tryfonidis, K., Rutgers, E., Piccart, M; MINDACT Investigators. (2016) 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med*, 375: 717-729.

Castillo, A.I., Jimenez-Lara, A.M., Tolon, R.M., Aranda, A. (1999) Synergistic activation of the prolactin promoter by vitamin D receptor and GHF-1: role of the coactivators, CREB-binding protein and steroid hormone receptor coactivator-1 (SRC-1). *Mol Endocrinol*, 13: 1141-1154.

Castrillo, J.L., Theill, L.E., Karin, M. (1991) Function of the homeodomain protein GHF1 in pituitary cell proliferation. *Science*, 253: 197-199.

Cho, Y.L., Christensen, C., Saunders, D.E., Lawrence, W.D.; Deppe, G., Malviya, V.K., Malone, J.M. (1991) Combined Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and Platinum Drugs on the Growth of MCF-7 Cells. *Cancer Res*, 51: 2848-2853.

Chou, T.C. (2010) Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*, 70: 440-446.

Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., Verlinden, L., Carmeliet, G. (2016) Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev*, 96: 365-408.

Chung, M., Lee, J., Terasawa, T., Lau, J., Trikalinos, T.A. (2011) Vitamin D with or without calcium supplementation for prevention of cancer and fractures: an updated meta-analysis for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*, 155: 827-838.

Cianfrocca, M., Goldstein, L.J. (2004) Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *The Oncologist*, 9: 606-616.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2002) Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet*, 360: 187-195.

Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., Li, J. (2017) Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *J Cancer*, 8: 3131-3141.

De La Puente-Yagüe, M., Cuadrado-Cenzual, M.A., Ciudad-Cabañas, M. J., Hernández-Cabria, M., Collado-Yurrita, L. (2018) Vitamin D: And its role in breast cancer. *Kaohsiung J Med Sci*, 34; 423-427.

Delhase, M., Vergani, P., Malur, A., Hooghe-Peters, E.L., Hooghe, R.J. (1993a) The transcription factor Pit-1/GHF-1 is expressed in hemopoietic and lymphoid tissues. *Eur J Immunol*, 23: 951-955.

Delhase, M., Vergani, P., Malur, A., Velkeniers, B., Tengels, E., Trouillas, J., Hooghe-Peters, E.L. (1993b) Pit-1/GHF-1 expression in pituitary adenomas: further analogy between human adenomas and rat SMtTW tumours. *J Mol Endocrinol*, 11: 129-139.

Elston C.W., Ellis I.O. (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer: I. The value of histologic grade in breast cancer—Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 403: 1991-410.

Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, A. J., Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*, 38: 698-707.

Feldman, D, Krishnan, A.V., Swami, S., Giovannucci, E, Feldman, B.J. (2014) The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer*, 14: 342-357.

Ferlay, J., Steliarova-Focher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W.W., Comber, H., Forman, D., Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, 49: 1374-1403.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D. and Bray, F. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136: E359–E386.

Fernández-Cid, A. *Mastología*, 2ª Edición. Masson. Barcelona 2000.

Furigay, P., Swamy, N. (2004). Anti-endothelial properties of 1,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D3, a natural metabolite of calcitriol. 2004. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 89-90: 427-431.

Gandini S., Boniol, M., Haukk, J., Byrnes, G., Cox, B., Sneyd, M.J., Mullie, P., Autier, P. (2011) Meta-analysis of observational studies of serum 25-hydroxyvitamin D levels and colorectal, breast and prostate cancer and colorectal adenoma. *Int J Canc*, 128: 1414-1424.

Gao, Z., Xue, K., Zhang, L., Wei, M. (2016) Over-expression of POU class 1 Homeobox 1 Transcription Factor 1 (Pit-1) predicts poor prognosis for breast cancer patients. *Med Sci Monit*, 22: 4121-4125.

Garland, C.F., Garland, F.C. (1980) Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *Int J Epidemiol*, 9: 227-223.

Garland, C.F., Garland, F.C., Gorham, E.D., Lipkin, M., Newmark, H., Mohr, S.B., Holick, M. F. (2006) The role of vitamin D in cancer prevention. *Am J Publ Health*, 96: 252-261.

Gil-Puig, C., Blanco, M., García-Caballero, T., Segura, C., Pérez-Fernández R. (2002) Pit-1/GHF-1 and GH expression in the MCF-7 human breast adenocarcinoma line. *J Endocrinol*, 173: 161-167.

Gil-Puig, C., Seoane, S., Blanco, M., Macia, M., Garcia-Caballero, T., Segura, C., Perez-Fernandez, R. (2005) Pit-1 is expressed in normal and tumorous human breast and regulates GH secretion and cell proliferation. *Eur J Endocrinol*, 153: 335-344.

Giuliano, A.E, McCall, L.M., Beitsch, P.D., Whitworth, P.W., Morrow, M., Blumencranz, P.W., Leitch, A.M., Saha, S., Hunt, K., Ballman, K.V. (2010) Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 randomized trial. *Ann Surg*, 252: 426-432.

Goldhirsch, A., Winer, E.P., Coates, A.S., Gelber, R.D., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., Senn, H.-J. and pannel members. (2013) Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*, 24: 2206-2223.

Grant, W.B. (2002) An ecologic study of dietary and solar ultraviolet-B links to breast carcinoma mortality rates. *Cancer*, 94: 272-281.

Grant W.B. (2012) Ecological studies of the UVB-Vitamin D-cancer hypotesis. *Anticancer Res*, 32: 223-236.

Grases, P.J. (2003). *Patología Ginecológica. Bases para el diagnóstico Morfológico*. 1ª Edición. Masson. Barcelona.

Hanahan, D., Wienberg, R.A. (2011). *Hallmarks of cancer: The Next Generation*. *Cell*, 144: 646-674.

Harant, H., Spinner, D., Reddy, G.S., Lindley, I.J. (2000) Natural metabolites of  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> retain biologic activity mediated through the vitamin D receptor. *J Cell Biochem*, 78: 112-120.

Haugen, B.R., Wood, W.M., Gordon, D.F., and Ridgeway, E.C. (1993) A thyrotropespecific variant of Pit-1 transactivates the thyrotropin promoter. *J Biol Chem*, 268: 20818-20824.

Herr, W., Sturm, R.A., Clerc, R.G., Corcoran, L.M., Baltimore, D., Sharp, P.A., Ingraham, H.A., Rosenfeld, M.G., Finney, M., and Ruvkin, G. (1988) The POU domain: A large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2 and *C. elegans* unc-86 gene products. *Genes Dev*, 2: 1513-1516.

Hershberger, P.A., McGuire, T.F., Yu, W.D., Zuhowski, E.G., Schellens, J.H.M., Egorin, M.J., Trump, D.L., Johnson, C.S. (2002) Cisplatin Potentiates 1,25-Dihydroxyvitamin D3-induced Apoptosis in Association with Increased Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase 1 (MEKK-1) Expression. *Mol Cancer Ther*, 1: 821-829.

Huang, Y.L., Chou, W.C., Hsiung, C.N., Hu, L.Y., Chu, H.W., Shen, C.Y. (2015) FGFR2 regulates Mre11 expression and double-strand break repair via the MEK-ERK-POU1F1 pathway in breast tumorigenesis. *Hum Mol Genet*, 12: 3506–3517.

Hylemon, P.B., Sjövall, H.D.A.J. (1985). Metabolism of bile acids in intestinal microflora. *New Comprehensive Biochemistry Sterols and Bile Acids*. Elsevier. Pags 331–343.

Jacobs, E.T., Kohler, L.N., Kunihiro, A.G., Jurutka, P.W. (2016) Vitamin D and colorrectal, breast, and prostate cancers: a review of the epidemiological evidence. *J Cancer*, 7: 232-240.

Jagsi, R. (2014) Progress and Controversies: Radiation Therapy for Invasive Breast Cancer. *Cancer J Clin*, 64: 135–152.

Kalluri, R., Weinberg, R. A. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119: 1420-1428.

Karsli-Ceppioglu, S., Dagdemir, A., Judes, G., Ngollo, M., Penault-Loorca, F., Pajon, A., Bignon, Y.J., Bernard-Gallon, D. (2014) Epigenetic mechanisms of breast cancer: an update of the current knowledge. *Epigenomics*, 6: 651-664.

Kim, Y., Je, Y. (2014) Vitamin D intake, blood 25(OH)D levels, and breast cancer risk or mortality: a meta-analysis. *Br J Cancer*, 110: 2772–2784.

Kittaneh, M., Montero, A.J., Glück, S. (2013) Molecular Profiling for Breast Cancer: A comprehensive Review. *Biomark Cancer*, 5: 61-70.

Krishnan, A.V., Trump, D.L., Johnson, C.S., Feldman, D. (2010) The role of vitamin D in cancer prevention and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 39: 401–418.

Kumar, V., Abbas, A.K., Aster, J.C. (2015) *Robbins y Cotran. Patología Estructural y funcional*. 9ª Edición. Elsevier. Capítulo 23.

Lefevre, C., Imagawa, M, Dana, S., Grindlay, J., Bodner, M., Karin, M. (1987) Tissue-specific expression of the human growth hormone gene is conferred in part by the binding of a specific trans-acting factor, *EMBO J*, 6: 971-981.

Leysens, C., Verlinden, L., Verstuyf, A. (2014) The future of vitamin D analogs. *Front Physiol*, 5: 1-18.

Li, S., Crenshaw, E.B., Rawson, E.J., Simmons, D.M., Swanson, L.W., Rosenfeld, M.G. (1990) Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene *pit-1*. *Nature*, 347: 528-533.

Light, B.W., Yu, W.D., McElwain, M.C., Russell, D.M., Trump, D.L., Johnson, C.S. (1997) Potentiation of cisplatin antitumor activity using a vitamin D analogue in a murine squamous cell carcinoma model system. *Cancer Res*, 57: 528-533.

Lopes, N., Sousa, B., Martins, D., Gomes, M., Vieira, D., Veronese, L.A., Milanezi, F., Paredes, J., Costa, J.L., Schmitt, F. (2010) Alterations in Vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions Vitamin D pathways unbalanced in breast lesions. *BMC Cancer*, 10: 483.

Lopes, N., Paredes, J., Costa, J.L., Ylstra, B., Schmitt, F. (2012) Vitamin D and the mammary gland: a review on its role in normal development and breast cancer. *Breast Cancer Res*, 14: 211.

Lu, D., Jing, L., Zahng, S. (2016) Vitamin D Receptor Polimosfism an breast cancer risk: a meta-analysis. *Medicine*, 95: e3535.

Lumachi, F., Santeufemia, D.A., Basso, S.M. (2015) Current Medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *World J Biol Chem*, 6: 231-239.

Ma, Y., Trump, D.L., Johnson, C.S. (2010a) Vitamin D in combination cancer treatment. *J Cancer*, 1: 101-107.

Ma, Y., Yu, W. D., Trump, D. L., Johnson, C.S. (2010b) 1,25D(3) Enhances antitumor activity of gemcitabine and cisplatin in human bladder cancer models. *Cancer*, 116: 3294-3303.

Macias-Gonzalez, M. & Carlberg, C. (2002) Cross-repression, a functional Consequence of the Physical Interaction of Non-liganded Nuclear Receptors and POU Domain Transcription Factors. *J Biol Chem*, 277: 18501-18509.

Maisonneuve, P., Disalvatore, D., Rotmensz, N., Giuseppeurigliano, G., Colleoni, M., Dellapasqua, S., Pruneri, G., Mastropasqua, M. G., Luini, A., Bassi, F., Pagani, G., Viale, G., Goldhirsch, A. (2014) Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and luminal B (HER2-negative) intrinsic breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res*, 16: R65.

Mangalam, H.J., Albert, V.R., Ingraham, H.A., Kapiloff, M., Wilson, L., Nelson, C., Elsholtz, H., and Rosenfeld, M.G. (1989) A pituitary POU domain protein, Pit-1, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally. *Genes Dev*, 3: 946-958.

Maughan, K.L., Lutterbie, M.A., Ham, P.S. (2010) Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician*, 81: 1339-1346.

Masuda, S., Kamao, M., Schroeder, N.J., Makin, H.L., Jones, G., Kremer, R., Rhim, J., Okano, T. (2000) Characterization of 3-epi-1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 involved in 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 metabolic pathway in cultured cell lines. *Biol Pharm Bull*, 23:133-139.

McCormack, V. A., Dos Santos Silva, I. (2006). Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*,15: 1159-1169.

Merchan, B.B, Morcillo, S., Martin-Nuñez, G., Tinahones, F.J., Macías-González, M. (2017) The role of vitamin D and VDR in carcinogenesis: Through epidemiology and basic sciences. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 167: 203-218.

Nakagawa, K., Sowa, Y., Kurobe, M., Ozono, K., Siu-Caldera, M.L., Reddy, G.S., Uskokovic, M.R., Okano, T. (2001) Differential activities of 1alpha,25-dihydroxy-16-ene-vitamin D(3) analogs and their 3-epimers on human promyelocytic leukemia (HL-60) cell differentiation and apoptosis. *Steroids*, 66: 327-337.

Nelson, C., Albert, V.R., Elsholtz, H.P., Lu, L.I., Rosenfeld M.G. (1988) Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor. *Science*, 239: 1400-1405.

Nicolas, E., Bertucci, F., Sabatier, R., Gonçalves. (2018) Targeting *BRCA* Deficiency in Breast Cancer: What are the Clinical Evidences and the Next Perspectives? *Cancers (Basel)*, 10: 506.

Norman, A.W., Bouillon, R., Farach-Carson, M.C., Bishop, J.E., Zhou, L.X., Nemere I., Zhao, J., Muralidharan, K. R., Okamura, W.H. (1993) Demonstration that 1 beta,25-dihydroxyvitamin D3 is an antagonist of the nongenomic but not genomic biological responses and biological profile of the three A-ring diastereomers of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *J Biol Chem*, 268: 20022-20030.

Norman, A.W., Mizwicki, M.T., Norman, D.P. (2004) Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov*, 3: 27-41.

Palomino, T., Sanchez-Pacheco, A., Pena, P., Aranda, A. (1998) A direct protein-protein interaction is involved in the cooperation between thyroid hormone and retinoic acid receptors and the transcription factor GHF-1. *FASEB J*, 12: 1201-1209.

Pedro J. Grases. *Patología Ginecológica*. (2003) Ed Masson. Capítulo 8.

Pelczynska, M., Maciejewska, M., Jaroszewicz, I., Kutner, A., Opolski, A. (2006) Antiproliferative activity of vitamin D compounds in combination with cytostatics. *Anticancer Res*, 26: 2701-2705.

Penning, T.M., Bennett, M.J., Smith-Hoog, S., Schlegel, B.P., Jez, J.M., Lewis, M. (1997) Structure and function of 3a-hydroxysteroid dehydrogenase. *Steroids*, 62: 101-111.

Perez-Fernandez, R., Seoane, S., Garcia-Caballero, T., Segura, C., Macia, M. (2007) Vitamin D, Pit-1, GH, and PRL: possible roles in breast cancer development. *Current Med Chem*, 14: 3051-3058.

Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslén, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.L., Brown, P.O., Botstein, D. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406: 747-752.

Pickholtz, I., Saadyan, S., Keshet, G.I., Wang, V.S., Cohen, R., Bouwman, P., Jonkers, J., Byers, S.W., Papa, M.Z., Yarden, R.I. (2014) Cooperation between BRCA1 and vitamin D is critical for histone acetylation of the p21waf1 promoter and for growth inhibition of breast cancer cells and cancer stem-like cells. *Oncotarget*, 5: 11827–11846.

Prat, A., Cheang, M. C. U., Martín, M., Parker, J. S., Carrasco, E., Caballero, R., Tyldesley, S., Gelmon, K., Bernarde, P.S., Nielsen, T.O., Perou, C. M. (2013) Prognostic Significance of progesterone receptor–positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol*, 31: 203–209.

Ravid, A., Rocker, D., Machlenkin, A., Rotem, C., Hochman, A., Kessler-Icekson, G., Liberman, U., A., Koren, R. (1999) 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> enhances the susceptibility of breast cancer cells to doxorubicin-induced oxidative damage. *Cancer Res*, 59: 862-867.

Reddy, G.S., Rao, D.S., Siu-Caldera, M.L., Astecker, N., Weiskopf, A., Vouros, P., Sasso, G.J., Manchland, P.S., Uskokovic, M.R. (2000) 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-16-ene-23-yne-vitamin D<sub>3</sub> and 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-16-ene-23-yne-20-epi-vitamin D<sub>3</sub>: analogs of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> that resist metabolism through the C-24 oxidation pathway are metabolized through the C-3 epimerization pathway. *Arch Biochem Biophys*, 383: 197–205.

Reddy, G.S., Muralidharan, K.R., Okamura, W.H., Tserng, K.Y., McLane, J.A. (2001) Metabolism of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its C-3 epimer 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D<sub>3</sub> in neonatal human keratinocytes. *Steroids*, 66: 441–450.

Rehan, V.K., Torday, J.S., Peleg, S., Gennaro, L., Vouros, P., Padbury, J., Rao, D.S., Reddy, G.S. (2002) 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D<sub>3</sub>, a natural metabolite of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub>: production and biological activity studies in pulmonary alveolar type II cells. *Mol Genet Metab*, 76: 46-56.

Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L.: Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. (2002) Risk and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *JAMA*, 288: 321-333.

Saether, N.H., Skuja, E., Irmejs, A., Maksimenko, J., Miklasevics, E., Purkalne, G., Gardovskis, J. (2018) Platinum-based neoadjuvant chemotherapy in BRCA1-positive breast cancer: a retrospective cohort análisis and literatura review. *Hered Cancer Clin Pract*, 16: 9.

Sanchez-Pacheco, A., Palomino, T., Aranda, A. (1995) Negative regulation of expression of the pituitary-specific transcription factor GHF-1/Pit-1 by thyroid hormones through interference with promoter enhancer elements. *Mol Cell Biol*, 15: 6322-6330.

Sanno, N., Teramoto, A., Matsuno, A., Osamura, Y. (1996) Expression of human Pit-1 product in the human pituitary and pituitary adenomas. *Arch Pathol Lab Med*, 120: 73-77.

Santagata, S., Thakkar, A., Ergonul, A., Wang, B., Woo, T., Hu, R., Harrell, J.C., McNamara, G., Schwede, M., Culhane, A.C., Kindelberger, D., Rodig, S., Richardson, A., Schnitt, S.J., Tamimi, R. M., Ince, T.A. (2014) Taxonomy of breast cancer based on normal cell phenotype predicts outcome. *J Clin Invest*, 124: 859-870.

Schanke, J.T., Conwell, C.M., Durning, M., Fisher, J.M., Golos, T.G. (1997) Pit-1/growth hormone factor 1 splice variant expression in the rhesus monkey pituitary gland and the rhesus and human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 800-807.

Schaufele, F., West, B.L., Baxter, J.D. (1992) Synergistic activation of the rat growth hormone promoter by Pit-1 and the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol*, 6: 656-665.

Sekimoto, H., Siu-Caldera, M.L., Weiskopf, A., Vouros, P., Muralidharan, K.R., Okamura, W.H., Uskokovic, M.R., Reddy, G.S. (1999) 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D<sub>3</sub>: in vivo metabolite of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in rats. *FEBS Lett*, 448: 278-82.

Seoane, S., Perez-Fernandez R. (2006) The vitamin D receptor represses transcription of the pituitary transcription factor Pit-1 gene without involvement of the retinoid X receptor. *Mol Endocrinol*, 20: 735-748.

Seoane, S., Ben, I., Centeno, V., Pérez-Fernández R. (2007) Cellular expression levels of the vitamin D receptor are critical to its transcriptional regulation by the pituitary transcription factor Pit-1. *Mol Endocrinol*, 21: 1513-25.

Shan, N.L., Wahler, J., Lee, H.J., Bak, M.J, Gupta, S.D. (2017) Vitamin D compounds inhibit cancer stem-like cells and induce differentiation in triple negative breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 173: 122-129.

Shiovitz, S & Korde, L.A. (2015) Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann Oncol*, 26: 1291-1299.

Siu-Caldera, M.L., Sekimoto, H., Weiskopf, A., Vouros, P., Muralidharan, K.R., Okamura, W.H., Bishop, J., Norman, A.W., Uskokovic, M.R. Schuster, I., Reddy, G.S. (1999) Production of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D<sub>3</sub> in two rat osteosarcoma cell lines (UMR 106 and ROS 17/2.8): existence of the C-3 epimerization pathway in ROS 17/2.8 cells in which the C-24 oxidation pathway is not expressed. *Bone*, 24: 457-463.

Smith, D.C., Johnson, C.S., Freeman, C.C., Muindi, J., Wilson, J.W., Trump, D.L. (1999) A phase I trial of calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol) in patients with advanced malignancy. *Clin Cancer Res*, 5: 1339-1345.

Stambolsky, P., Tabach, Y., Fontemaggi, G., Weisz, L., Maor-Aloni, R., Siegfried, Z., Shiff, I., Kogan, I., Shay, M., Kalo, E., Blandino, G., Simon, I., Oren, M., Rotter, V. (2010) Modulation of the vitamin D<sub>3</sub> response by cancer-associated mutant p53. *Cancer Cell*, 17: 273-285.

Suetani, R.J., Ho, K., Jindal, S., Manavis, J., Neilsen P.M., Pishas, K.I., Rippy E, Bochner, M., Kollias, J., Gill, P.G., Morris, H.A., Callen, D.F. (2012) A comparison of vitamin D activity in paired non-malignant and malignant human breast tissues. *Mol Cell Endocrinol*, 362: 202-210.

Sunita Rao, D., Campbell, M.J., Koeffler, H.P., Ishizuka, S., Uskokovic, M.R., Spagnuolo, P., Reddy, G.S. (2001) Metabolism of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human promyelocytic leukemia [HL-60] cells: In vitro biological activities of the natural metabolites of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> produced in HL-60 cells. *Steroids*, 66: 423–429.

Swami, S., Raghavachari, N., Muller, U. R., Bao, Y. P., Feldman, D. (2003) Vitamin D growth inhibition of breast cancer cells: gene expression patterns assessed by cDNA microarray. *Breast Cancer Res Treat*, 80: 49-62.

Tangpricha, V., Pearce, E., Chen, T., Holick, M. (2002) Vitamin D insufficiency among free-living healthy young adults. *Am J Med*, 112: 659–662.

Thakkar, A., Wang, B., Picon-Ruiz, M., Buchwald, P., Ince, T. A. (2016) Vitamin D and androgen receptor-targeted therapy for triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 157: 77–90.

Tutt, A., Tovey, H., Cheang, M.C.U., Kernaghan, S., Kilburn, L., Gazinska, P., Owen, J., Abraham, J., Barrett, S., Barrett-Lee, P., Brown, R., Chan, S., Dowsett, M., Flanagan,

J.M., Fox, L., Grigoriadis, A., Gutin, A., Harper-Wynne, C., Hatton, M.Q., Hoadley, K.A., Parikh, J., Parker, P., Perou, C.M., Roylance, R., Shah, V., Shaw, A., Smith, I.E., Timms, K.M., Wardley, A.M., Wilson, G., Gillett, C., Lanchbury, J.S., Ashworth, A., Rahman, N., Harries, M., Ellis, P., Pinder, S.E., Bliss, J.M., TNT Trialists. (2018) Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: The TNT Trial. *Nat Med*, 24: 628–637.

Viala, M., Chiba, A., Thezenas, S., Delmond, L., Lamy, P.J., Mott, S.L., Schroeder, M.C., Thomas, A., Jacot, W. (2018) Impact of vitamin D on pathological complete response and survival following neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: a retrospective study. *BMC Cancer*, 18: 770.

Vorobiof, D.A. (2016) Recent advances in the medical treatment of breast cancer. *F1000Res*, 5: 2786.

Vrieling, A., Hein, R., Abbas, S., Schneeweiss, A., Flesch-Janys, D., Chang-Claude, J. (2014) Serum 25-hydroxyvitamin D and postmenopausal breast cancer survival: a prospective patient cohort study. *Breast Cancer Res*, 13: R14.

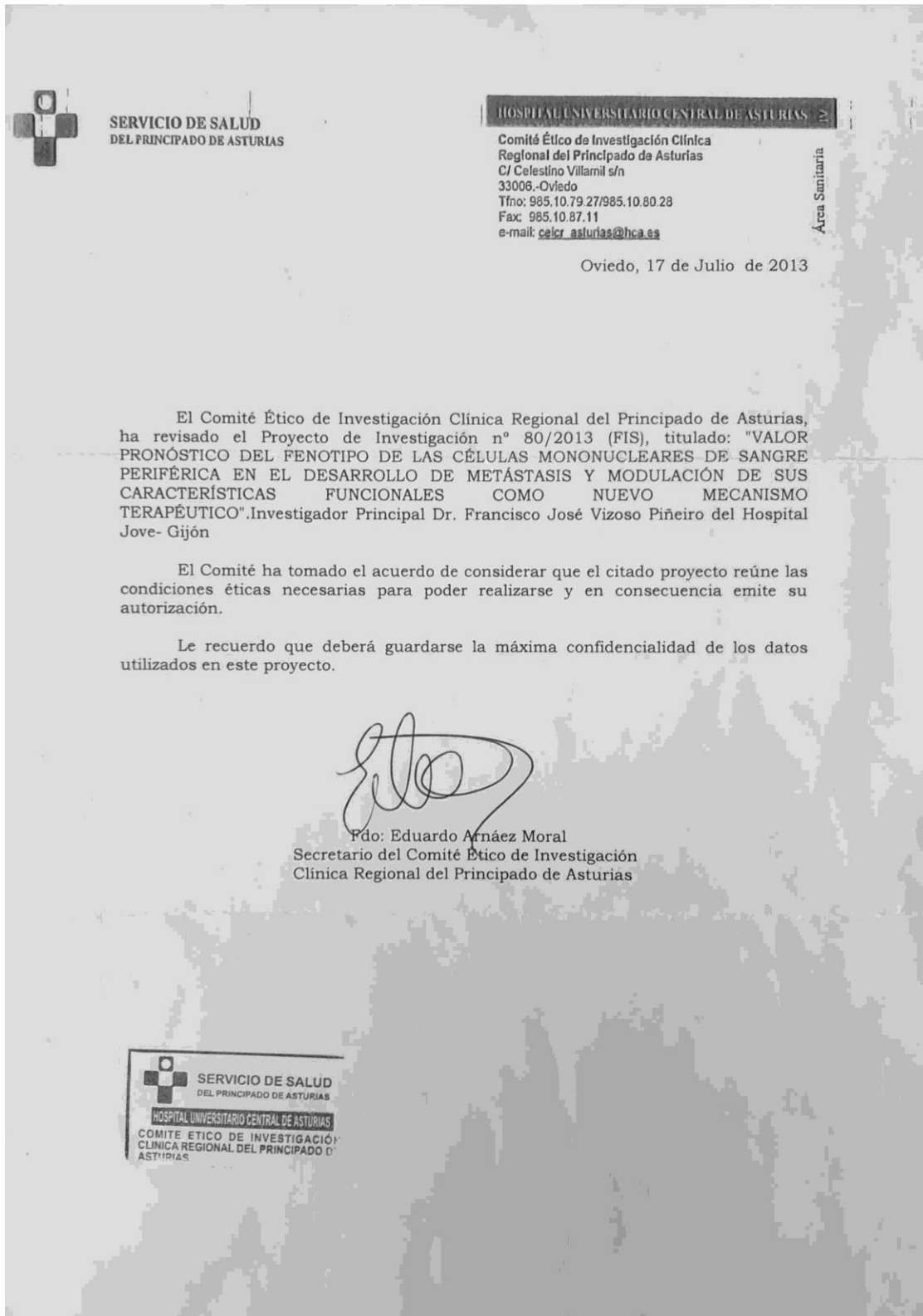
Wang, Q., Yang, W., Uytingco, M. S., Chritakos, S., Wieder, R. (2000) 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and all-trans-retinoic acid sensitize breast cancer cells to chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res*, 60: 2040-2048.

Zeichner, S.B., Koru-Segul, T., Shah, N., Liu, Q., Markward, N.J., Montero, A.J., Glück, S., Silva, O. Ahn, E.R. (2015) Improved clinical outcomes associated with vitamin D supplementation during adjuvant chemotherapy in patients with HER2+ nonmetastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 15: e1-11.

Zhang, J., Wang, C. (2016) Axillary radiotherapy: an alternative treatment option for adjuvant axillary management of breast cancer. *Sci Rep*, 6: 26304.

Zhang, X., Harbeck, N., Jeschke, U., Doisneau-Sixou, S. (2017) Influence of vitamin D signaling on hormone receptor status and HER2 expression in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 143: 1107-1112





**Anexo I:** copia autorización Comité Ético de Investigación Clínica.





Edificio administrativo Monelos  
Vicente Ferrer, 2  
15071 A Coruña



Román Pérez Fernández  
Centro de Investigación en Medicina  
Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS)  
Avda. Barcelona, 22  
15782 Santiago de Compostela (A Coruña)

Ref.: JLPV/IIId

NOTIFICACIÓN DE RESOLUCIÓN DUNHA AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

**Expediente núm.:** 15010/14/007      **Data de inicio:** 01-05-2014  
**Interesado:** Román Pérez Fernández      **Forma de inicio:** solicitude do interesado  
**Procedemento:** resolución de autorización

Notifícolle que con data 17 de xullo de 2014, o xefe territorial da Consellería do Medio Rural e do Mar emitiu unha resolución de autorización de proxectos de experimentación animal, cuxo texto íntegro é o seguinte:

ANTECEDENTES

O interesado, como representante do centro CIMUS (Universidade de Santiago de Compostela), presentou con data 19-06-2014 e rexistro de entrada 72152 RX 660955, unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal, cuxos datos se detallan a continuación:

**Denominación do proxecto:** Análogos de vitamina D en cancro  
**Nome do centro usuario:** CIMUS (USC)  
**Persoa responsable do proxecto:** Román Pérez Fernández  
**Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo):** CIMUS (USC)  
**Clasificación do proxecto:** Tipo I  Tipo II  Tipo III

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1. O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE núm. 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.
2. O artigo 89 da Lei 30/1992, de 26 de novembro, do réxime xurídico das administracións públicas e do procedemento administrativo común (BOE núm. 285, 27 de novembro de 1992), modificada pola Lei 4/1999, de 14 de xaneiro, establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.



Anexo II: copia autorización proxecto de investigación animal.

3. O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto, realizada polo órgano habilitado Sección de Experimentación animal do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co artigo 11 do Decreto 245/2009 de 3 de abril, polo que se regulan as delegacións territoriais da Xunta de Galicia e o Decreto 46/2012, de 19 de xaneiro, polo que establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural e do Mar e do Fondo Galego de Garantía Agraria.

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

1. Autorizar o proxecto solicitado.
2. Notificarlle esta resolución ao interesado.

O mencionado proxecto deberá someterse a unha avaliación retrospectiva que deberá realizarse no prazo de dous anos.

A autorización deste proxecto terá unha duración de 5 anos, transcorridos os cales, deberá ser renovada esta autorización.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida, no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirada, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpor recurso de alzada ante a conselleira de Medio Rural e do Mar da Xunta de Galicia no prazo dun mes contado a partir da recepción da notificación da presente resolución, conforme coa Lei 30/1992, do 26 de novembro, (BOE núm.: 285, 27 de novembro de 1992), de réxime xurídico das administracións públicas e do procedemento administrativo común na súa redacción dada pola Lei 4/1999, do 13 de xaneiro.

A Coruña, 17 de xullo de 2014  
 O xefe do Servizo de Gandaría

  
 Eugenio Romero Senande  
 SERVICIO DE  
 GANDARÍA

