



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

TESIS DOCTORAL EN BIOQUÍMICA

**“Evaluación de la actividad antineoplásica de
un nuevo análogo del calcitriol”**

Bioquímica María Julia Ferronato

Directores

Dra. María Marta Facchinetti - Dr. Alejandro Carlos Curino

LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL CÁNCER - INIBIBB - CONICET- UNS

Bahía Blanca

Argentina

2017

PREFACIO

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctora en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur, y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Biología del Cáncer perteneciente al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), dependiente de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el período comprendido entre el 2 de Octubre de 2012 al 2 de Febrero de 2017, bajo la dirección de la Dra. María Marta Facchinetti y del Dr. Alejandro Carlos Curino, Investigadores Independientes del CONICET.

El presente trabajo de tesis fue financiado con subsidios otorgados por el CONICET (PIP 112-201101-00556), por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-PICT 2012-1595 y ANPCyT-PICT 2012-0966), y por la Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional del Sur (PGI 24/B172).



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el .../.../..... , mereciendo la calificación de(.....)

DEDICATORIA

*A mis padres,
mi principal ejemplo de trabajo firme, voluntad y esfuerzo.*

*A Marcelo,
mi amor y compañero de vida.*

AGRADECIMIENTOS

Si bien los agradecimientos aparecen al principio de esta tesis, son el final de un largo camino recorrido que estuvo acompañado, y lo sigue estando, por muchas personas en todos estos años que permitieron encontrarme hoy en este punto, por lo que sinceramente quisiera agradecer:

Al CONICET por financiar mis estudios de posgrado y a la UNS por brindarme la posibilidad de estudiar una carrera de grado y posgrado de excelencia académica y de manera gratuita.

Al Estado nacional por la gestión y sostenimiento de políticas que permitieron garantizar las condiciones adecuadas para poder transitar todos los niveles de mi educación formal.

Al INIBIBB por el soporte institucional y a todo su personal de apoyo y administrativo que facilitan la tarea diaria.

A mis directores de tesis, María Marta y Alejandro: por haberme ofrecido trabajar con ustedes; por darme la oportunidad de desarrollo científico acompañándome con su capacidad y experiencia. Por su confianza para establecer las colaboraciones con otras disciplinas. También les agradezco por el apoyo y comprensión de aquellos días, tres años atrás, que me permitieron ocuparme, compartir y estar donde lo necesitaba.

A mis compañeros de laboratorio, Eli, Euge, Sil, Ariel y Diego, por su compañía, por las charlas, los mates, las risas, la solidaridad constante y el trabajo en equipo, sobre todo cada vez que “caían” las revisiones de los papers. Le agradezco a Débora, ex –compañera de laboratorio, por haberme enseñado las técnicas cuando comencé, por la paciencia y ayuda.

A Sofi SC, por los mates “en silencio” mientras escribíamos nuestras tesis.

A Juli, patólogo y ex – compañero de laboratorio, y al Dr. Alfredo Quevedo, que con sus aportes de los análisis histopatológicos y bioinformáticos respectivamente, enriquecieron este trabajo.

Al Bioq. Alejandro López Romero, por su buena predisposición para ayudarme con la citometría de flujo.

A mis amigas de siempre, Ale, Checho, Jime, Lu y Ro, por los lindos momentos que pasamos en estos quince años de amistad y por los que vendrán.

A los chicos de la “cuarta”, por hacer de los sábados un día entretenido y distinto.

A mis papás, Susana y Daniel, por todo. Por tratar de darme lo mejor, por preocuparse y ocuparse siempre de nosotros, por brindarnos todo lo que podían, y más, para que podamos crecer sin que nos falte nada, por tratar de que seamos buenas personas, por la educación en libertad...Gracias ma por tratar siempre de alivianar los momentos difíciles, sobre todo los de los recientes años, por estar juntas y acompañarnos. Por tu apoyo constante y sentirte cerca siempre.

A mis hermanos, Nico y Fede, porque sé que puedo contar con ustedes para lo que necesite. A Mercedes y Ana, por cuidar de ellos y ser tan buenas cuñadas. A mi sobrinito Valentino, por transmitirme tanta paz y amor cada vez que lo veo.

A Marcelo, por su amor incondicional. Por escucharme, entenderme, aconsejarme, calmarme, por alentarme a seguir creciendo. Por aguantar mis ausencias y mis enojos. Por tu positivismo y realismo. Por “volar juntos, pero jamás atados”. Por nuestro proyecto “Caldenia”. Porque realmente no hubiese sido lo mismo si no hubieses estado ahí en todos estos años. Sobre todo, por hacerme feliz.

“El todo es más que la suma de las partes”

RESUMEN

El avance logrado en los últimos años en el conocimiento de la biología del cáncer ha permitido el desarrollo de diversas terapias oncológicas. Sin embargo, dada la complejidad de esta patología y la variabilidad de respuestas halladas en los pacientes, es necesario continuar la búsqueda y el desarrollo de terapias dirigidas con el fin de mejorar el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes. El calcitriol, la forma activa de la vitamina D₃, actúa como una hormona reguladora de la homeostasis fosfocálcica y las investigaciones desarrolladas en las últimas tres décadas avalan su potencial uso como agente antineoplásico en la prevención y tratamiento de varios tipos de cáncer. Si bien algunos ensayos clínicos realizados a la fecha han aportado resultados alentadores, en la mayoría de los casos se han evidenciado efectos colaterales, como hipercalcemia, a las dosis necesarias para lograr una respuesta antitumoral efectiva. Tales razones han llevado al diseño y síntesis de análogos del calcitriol con el objeto de hallar compuestos que conserven o superen su actividad antitumoral y carezcan de los efectos hipercalcemiantes. En este trabajo de tesis nos propusimos evaluar las propiedades antitumorales y calcemiantes de un nuevo análogo del calcitriol de tipo gemini que hemos diseñado y sintetizado en colaboración con un laboratorio de Química Orgánica. Demostramos que el nuevo análogo, denominado UVB1, posee efectos antineoplásicos en varias líneas celulares de cáncer. Específicamente, el UVB1 redujo la viabilidad celular mediante un mecanismo de acción que es dependiente del tipo tumoral en cuestión, es decir, el análogo ejerció acciones anti-proliferativas en células de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello y pro-apoptóticas en células de carcinoma colorrectal (CCR). Además, el análogo exhibió propiedades anti-metastásicas, al disminuir la capacidad migratoria e invasiva de líneas tumorales modulando la actividad de metaloproteasas implicadas en estos procesos celulares. También, el UVB1 presentó características pro-diferenciantes al aumentar la expresión de E-cadherina en células tumorales mamarias y de CCR. En relación a estos efectos antitumorales, comenzamos a evaluar los mecanismos moleculares implicados. Posteriormente, realizamos ensayos *in vivo* en distintos modelos

animales de cáncer, lográndose reproducir los efectos antitumorales del UVB1 obtenidos en células de CCR en el modelo animal correspondiente. La importante inhibición del crecimiento tumoral en los animales tratados con el análogo fue resultado de la inducción de apoptosis, aumento de la expresión de E-cadherina y disminución de la expresión nuclear de β -catenina. En relación a la actividad calcemiente, el análogo no provocó hipercalcemia a las dosis y tiempos evaluados, ni tampoco detectamos signos de toxicidad como disminución del peso corporal de los ratones, cambios en el hematocrito o en la histología de los órganos. Por último, dado que el calcitriol y sus análogos ejercen la mayoría de sus efectos antitumorales a través de su receptor VDR, se realizaron estudios computacionales que permitieron predecir que el UVB1 es capaz de unirse con gran afinidad al receptor VDR, sugiriendo su participación en las acciones biológicas demostradas por el análogo. Los resultados obtenidos en esta tesis aportan evidencia que indica que este nuevo compuesto podría ser, solo o en combinación con otros tratamientos, un posible agente terapéutico contra el cáncer.

ABSTRACT

In recent years, progress in the knowledge of cancer biology has allowed the development of various oncology therapies. However, owing to the complexity of this pathology and the variability of responses found in cancer patients, it is necessary to continue the search and development of targeted drugs in order to improve the prognosis and quality of life of patients. The active form of vitamin D₃, calcitriol, acts as a hormone that regulates phospho-calcium homeostasis, and the research over the last three decades supports its potential use in the prevention and treatment of various types of cancer. So far, some clinical trials have provided encouraging results; however, at the doses necessary to achieve an effective antitumor response, side effects, such as hypercalcemia, occur in most cases. To prevent this particular undesirable effect, our research has focused on the design and synthesis of calcitriol analogs in order to obtain compounds that retain or even increase the antitumor activity but preclude the hypercalcemic effects. In this thesis we have aimed to evaluate the antitumor properties and the calcemic activity of a new gemini calcitriol analog that we have designed and synthesized in collaboration with a laboratory of Organic Chemistry. We demonstrate that the new analog, called UVB1, has antineoplastic effects on several cancer cell lines. In particular, UVB1 reduced cell viability by a mechanism of action that depends on the tumor type; specifically the analog exerted anti-proliferative actions on head and neck squamous cell carcinoma cells and pro-apoptotic effects on colorectal carcinoma (CRC) cells. In addition, the analog exhibited anti-metastatic properties by decreasing the migratory and invasive capacity of tumor cell lines and modulating the activity of metalloproteinases involved in these cellular processes. Also, UVB1 exhibited pro-differentiating features by increasing E-cadherin expression in tumor mammary and CRC cells. In relation to these antitumor effects, we began to evaluate the molecular mechanisms involved. We subsequently performed in vivo assays using different animal models of cancer, and the UVB1 antitumor effects obtained in CRC cells were successfully reproduced in the corresponding animal model. The significant inhibition of tumor growth in animals treated with the analog was a

consequence of the induction of apoptosis, increase in E-cadherin expression, and decrease in nuclear β -catenin expression. In regard to calcemic activity, the analog showed lack of hypercalcemia at the doses and times evaluated, and no toxic effects, such as loss of body weight, changes in the hematocrit and in the histology of the organs of mice were observed. Finally, since calcitriol and its analogs exert their antitumor effects through their receptor VDR, we carried on computational studies that allowed us to predict that UVB1 is able to bind to VDR with high affinity, suggesting its participation in the biological actions demonstrated by the analog. The results obtained in this thesis provide evidence that this new compound could be, alone or in combination with other treatments, a potential therapeutic agent against cancer.

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

Directores de tesis

Dra. María Marta Facchinetti

Dr. Alejandro Carlos Curino

ABREVIATURAS

AB	Avidina biotina
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de la varianza
APS	Amonio persulfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AUC	Área debajo de la curva
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-X _L	<i>B-cell lymphoma extra large</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
BuLi	Butil litio
Ca ²⁺	Calcio
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CaSR	Receptor sensible al calcio
CCECC	Carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello
CCND1	Gen codificante de ciclina D1
CCR	Carcinoma colorrectal
CDKs	Quinasas dependientes de ciclinas
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CICUAE	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación
CKIs	Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas
CO ₂	Dióxido de carbono
col.	Colaboradores
COX-2	Coclooxigenasa-2
CST5	Gen codificante de Cistatina D
CTNNB1	Gen codificante de β-catenina
CYP24A1	24-hidroxilasa
CYP27B1	1α-hidroxilasa
CYP2R1	25-hidroxilasa
DAB	Diaminobencidina
DBD	<i>DNA Binding Domain</i>

DBP	<i>D- binding protein</i> o proteína transportadora de vitamina D
DCDFH-DA	Diclorodihidrofluoresceína diacetato
DCDHF	Diclorodihidrofluoresceína
DCF	Diclorofluoresceína
DHCR7	Gen codificante de la enzima 7-dehidrocolesterol reductasa
Dibal-H	Hidruro de di-isobutil-aluminio
DM	Dinámica Molecular
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
Eag1	Canal de potasio codificado por el gen <i>KCNH1</i>
EDTA	Etilen-diamintetra-ácido acético
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERp57	<i>Endoplasmic reticulum stress protein 57</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter analysis</i>
FGF-23	Factor de crecimiento fibroblástico - 23
fs	Femtosegundo
g	Gramos
h	Horas
H&E	Hematoxilina y eosina
H12	Hélice 12
H ₂	Hidrógeno
H ₂ O ₂	Agua oxigenada
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2
HIF-1	Factor inducible por hipoxia
HO-1	Hemo Oxigenasa-1
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
IARC	<i>Internacional Agency for Research on Cancer</i>
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
IF	Inmunofluorescencia
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
Im	Imidazol
IM	Índice mitótico
IP	Ioduro de propidio
IRS	Score inmunoreactivo
kDa	KiloDalton
LBD	<i>Ligand Binding Domain</i>

LMA	Leucemia mieloide aguda
$\lambda_{\text{máx}}$	Longitud de onda máxima
MAPK-P5	Proteína quinasa activada por mitógenos fosfatasa 5
MeLi	Metil litio
MeOH	Metanol
MEC	Matriz extracelular
miARN	Micro-ARN
min	Minutos
MMPs	Metaloproteasas
NaCl	Cloruro de sodio
NCX1	Proteína transportadora de sodio y calcio
nm	Nanómetros
NMO	N-óxido de N-metil morfolina
NPT2	Proteína co-transportadora de sodio - fosfato tipo 2
ns	Nanosegundos
p21	p21 ^{Cip1} o Inhibidor 1A de la quinasa dependiente de ciclina
p27	p27 ^{kip1} o Inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Buffer fosfato salino
Pd/C	Paladio sobre carbón
PDB	<i>Protein DataBank</i>
PDC	Dicromato de piridinio
PFA	Paraformaldehído
PGs	Prostaglandinas
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PPh3	Trifenilfosfina
ps	Picosegundo
PTH	Paratohormona u hormona paratiroidea
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RAP	Proteína asociada al receptor
RB	Reactivo de Bradford
RE	Receptor de estrógeno
RMSF	<i>Root Mean Square Fluctuation</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Revoluciones por minuto

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RXR	Receptor retinoide X
SD	Desviación estándar
SDS	Duodecil sulfato de sodio
seg	Segundos
SEM	Desviación estándar de la media
SFB	Suero fetal bovino
SMD	Síndrome mielodisplásico
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphinms</i>
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBS	Tris bufer salino
TCF	<i>T-cell factor</i>
TDEC	Tumores derivados de células endoteliales
MeOH	Metanol
TdT	Transferasa deoxinucleotidil terminal
TEM	Transición epitelio - mesenquimática
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TERT	<i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
THF	Tetrahidrofurano
TIMP-1	Inhibidor tisular de metaloproteasas 1
TME	Transición mesénquima - epitelial
TMS	Trimetilsilil
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TPAP	Perrutenato de tetrapropilamonio
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
TSP-1	Trombospondina-1
UV	Ultravioleta
V	Vehículo
VDR	<i>Vitamin D Receptor</i> o Receptor de vitamina D
VDRE	Elementos de respuesta específicos para el VDR
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
vs	<i>Versus</i>
WB	Western blot
WST-1	4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H- 5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno
1,25D ₃ -MARRS	<i>Calcitriol Membrane Associated Rapid Response Steroid</i>

ÍNDICE

PREFACIO	2
DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	6
ABSTRACT	8
ABREVIATURAS	10
ÍNDICE	14
INTRODUCCIÓN	17
1. CÁNCER.....	18
1.1. Generalidades	18
1.2. Epidemiología	22
2. VITAMINA D	24
2.1. Historia de la vitamina D	25
2.2. Estructuras químicas de las vitaminas D.....	27
2.3. Metabolismo de la vitamina D ₃	28
2.4. Regulación del metabolismo de la vitamina D ₃	32
2.5. Transporte de la vitamina D ₃	34
2.6. Mecanismos de acción del calcitriol	35
2.6.1. Características del VDR.....	36
2.6.2. Acciones genómicas del calcitriol.....	37
2.6.3. Acciones no genómicas del calcitriol.....	39
2.7. Funciones biológicas del calcitriol	41
2.7.1. Funciones clásicas: calcitriol y la homeostasis fosfocálcica	41
3. EL SISTEMA HORMONAL DE LA VITAMINA D ₃ Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER	43
3.1. Epidemiología del cáncer y vitamina D ₃	43
3.2. Efectos del calcitriol sobre los sellos distintivos del cáncer.	44
3.2.1. Calcitriol y sus efectos sobre la proliferación celular.	45
3.2.2. Calcitriol y sus efectos sobre la inmortalización celular. Relación con la telomerasa.....	48
3.2.3. Calcitriol y sus efectos sobre la diferenciación celular.....	48
3.2.4. Calcitriol y sus efectos sobre la muerte celular.....	49

3.2.5. Calcitriol y sus efectos sobre la angiogénesis y la metástasis.....	51
3.2.6. Calcitriol y sus efectos anti-Inflamatorios e inmunomoduladores	53
3.3. Calcitriol y ensayos clínicos	54
4. ANÁLOGOS DEL CALCITRIOL.....	56
4.1. Análogos del calcitriol y ensayos clínicos.....	58
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	61
MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
1. CALCITRIOL Y UVB1	66
1.1. Síntesis del calcitriol	66
1.2. Síntesis del UVB1	66
1.3. Preparación de la solución madre de calcitriol y análogo UVB1.....	68
2. EVALUACIÓN DEL CALCIO PLASMÁTICO EN RATONES	69
3. CULTIVO CELULAR.....	71
4. ENSAYOS CELULARES	73
4.1. Ensayos de viabilidad celular: conteo en cámara de Neubauer y ensayo de WST-1	73
4.2. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.	74
4.3. Análisis de la apoptosis celular	75
4.4. Cuantificación de las especies reactivas de oxígeno	76
4.5. Ensayo de migración celular	77
4.6. Ensayo de invasión celular	77
4.7. Zimografía.....	78
4.8. Inmunofluorescencia	80
4.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida y Western Blot	82
5. MODELOS ANIMALES	86
5.1. Modelo animal de xenotransplante subcutáneo con células de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello HN12.....	86
5.2. Modelo animal de transplante singeneico con células de adenocarcinoma mamario LM3	87
5.3. Modelo animal de xenotransplante subcutáneo con células de carcinoma colorrectal HCT116	89
6. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	89
6.1. Procesamiento de órganos y tumores para histología	89
6.2. Coloración con Hematoxilina - Eosina	90
6.3. Evaluación del índice mitótico.....	91

6.4. Inmunohistoquímica.....	91
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	93
8. ENSAYOS COMPUTACIONALES	93
RESULTADOS.....	96
1. ANÁLISIS DEL EFECTO DEL ANÁLOGO UVB1 SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE CALCIO EN RATONES	97
2. ESTUDIO DE LOS EFECTOS ANTITUMORALES DEL ANÁLOGO UVB1.....	100
2.1. Evaluación de los efectos antitumorales del análogo UVB1 en células de glioblastoma multiforme	103
2.2. Evaluación de los efectos antitumorales del análogo UVB1 en células de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello	108
2.3. Evaluación de los efectos antitumorales del análogo UVB1 en células de adenocarcinoma mamario	118
2.4. Evaluación de los efectos antitumorales del análogo UVB1 en células de carcinoma colorrectal.....	132
3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA INTERACCIÓN MOLECULAR ENTRE EL ANÁLOGO UVB1 Y EL VDR.....	151
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	158
BIBLIOGRAFÍA	178
PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS	208

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

1.1. Generalidades

El término genérico “cáncer” designa un amplio y complejo grupo de enfermedades que pueden originarse prácticamente en cualquier parte del organismo. A grandes rasgos, se puede decir que el cáncer es el crecimiento anormal de células que tienden a proliferar descontroladamente y, en algunos casos, metastatizar (*National Cancer Institute: Comprehensive Cancer Information (on line)*, 2016).

Existen más de 100 tipos diferentes de cáncer, denominados generalmente en función al órgano o tejido en el cual se desarrollan (*National Cancer Institute: Comprehensive Cancer Information (on line)*, 2016). Pese a la diversidad y complejidad de esta enfermedad se han podido establecer los principios generales que gobiernan la transformación de una célula normal en una maligna. La célula va adquiriendo capacidades biológicas distintivas y complementarias, conocidas como sellos o “*hallmarks*” del cáncer, que le permiten establecer un tumor y diseminarse metastásicamente (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011). Originalmente, se describieron seis capacidades adquiridas (**Figura 1**): i) activación y mantenimiento de señales proliferativas, ii) evasión de señales supresoras del crecimiento, iii) resistencia a la muerte celular, iv) inmortalidad replicativa, v) inducción de angiogénesis y vi) activación de mecanismos de invasión y metástasis (Hanahan & Weinberg, 2000). Posteriormente, se propuso la incorporación de dos nuevas capacidades a la lista de los seis sellos del cáncer: vii) la reprogramación del metabolismo energético, necesaria para soportar la continua proliferación celular y, viii) la evasión ante el ataque y destrucción por parte del sistema inmune, mediante la activación de mecanismos de escape inmunológico (Hanahan & Weinberg, 2011). Estas dos últimas capacidades se las reconoce como los *sellos emergentes* del cáncer dado que fueron incorporadas con posterioridad a la lista de los sellos del cáncer (**Figura 1**).

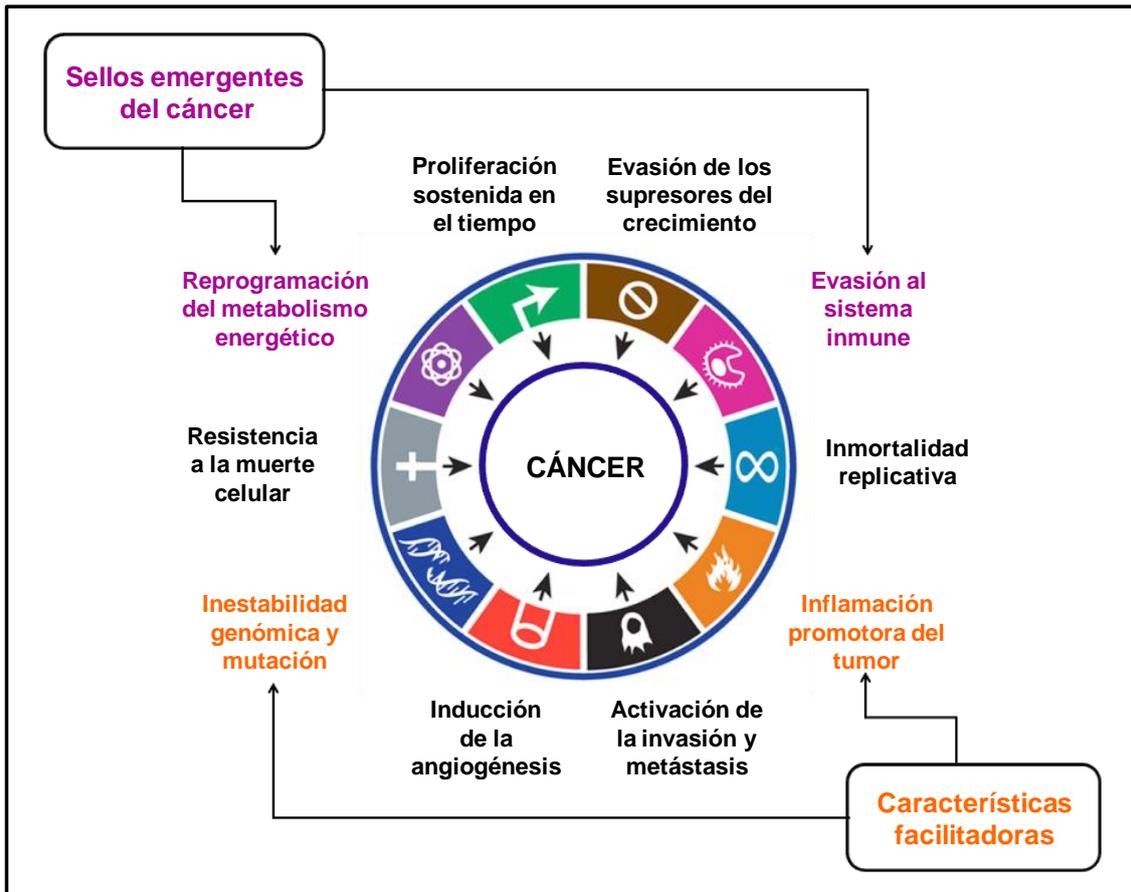


Figura 1. Los “sellos” del cáncer. Las seis capacidades distintivas adquiridas por las células neoplásicas originalmente propuestas en el año 2000, junto a las dos capacidades emergentes y las dos características facilitadoras propuestas en el año 2011. Tomado y adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011.

Adicionalmente, existen dos características *facilitadoras* de la adquisición de los ocho sellos del cáncer (**Figura 1**). Una de ellas es la inestabilidad genómica y la mutación de las células neoplásicas, fuente creadora de las variantes genéticas responsables de producir las distintas capacidades. La segunda característica facilitadora es la inflamación, estado que suplementa al microambiente tumoral con moléculas bioactivas: factores de crecimiento, de supervivencia, pro-angiogénicos, entre otros; que promueven la adquisición de los sellos del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011).

Es importante tener en cuenta que si bien las ocho capacidades mencionadas anteriormente son adquiridas durante el proceso tumorigénico de prácticamente todo tipo de tumor, la diversidad y complejidad se presenta en relación a los mecanismos moleculares que promueven las capacidades adquiridas y al momento en que ocurre dicha adquisición (Hanahan &

Weinberg, 2011). Más aún, para comprender correctamente la biología del cáncer es necesario incorporar una nueva dimensión de complejidad. Para esto, los tumores no deben ser vistos simplemente como un grupo relativamente homogéneo de células cancerosas (visión reduccionista), sino deben ser considerados como tejidos complejos, compuestos por diferentes tipos de células que interaccionan heterotípicamente dentro del microambiente tumoral (**Figura 2**) (Hanahan & Weinberg, 2011).

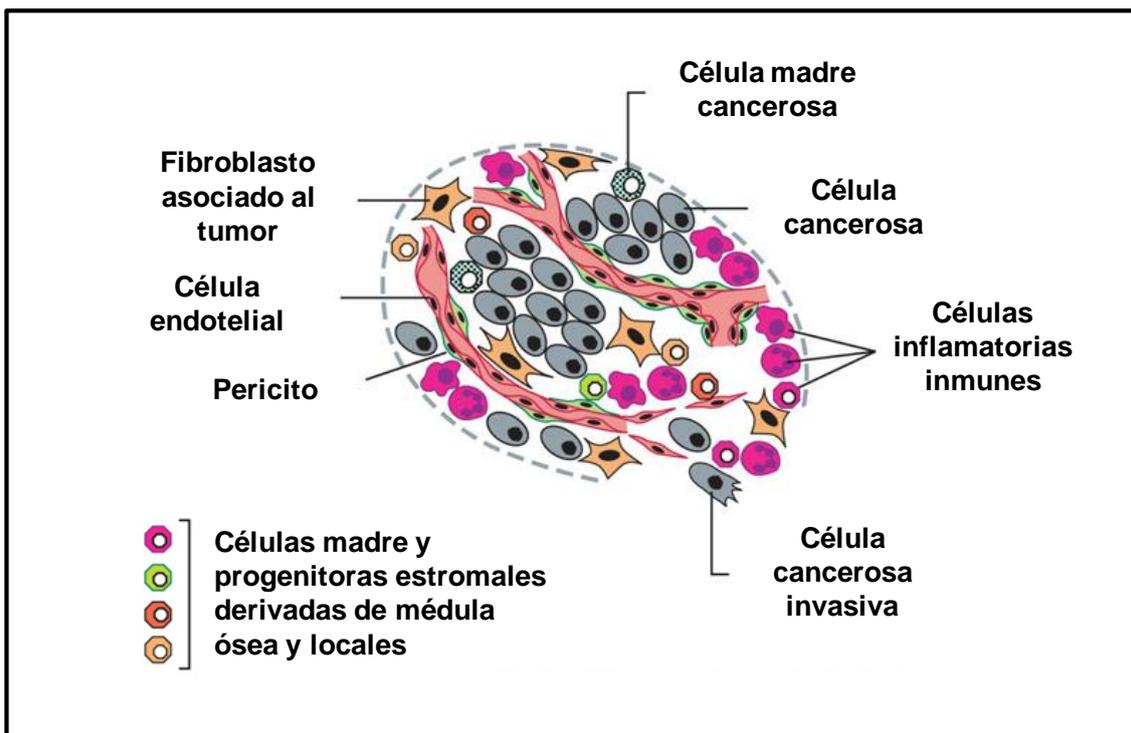


Figura 2. Células del microambiente tumoral. Distintos tipos de células presentes en el parénquima y en el estroma tumoral que colectivamente cooperan con el desarrollo y la progresión del tumor. Tomado y adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011.

Es así que actualmente se plantea que las células tumorales no actúan solas y que el crecimiento tumoral y la metástasis son el resultado de la subsistencia tumoral en un microambiente enriquecido por células estromales que cooperan con la “sociedad de células que se encuentra fuera de la ley”. Las células del estroma tumoral se convierten en activos miembros colaboradores de las células cancerosas, contribuyendo con prácticamente las ocho capacidades adquiridas e influyendo sobre el fenotipo tumoral (Hanahan & Coussens, 2012). Por lo tanto, en la última década, el microambiente tumoral

ha adquirido cada vez mayor relevancia siendo actualmente un nuevo y complejo campo de investigación en el cáncer.

La aparición de metástasis es la principal responsable de la mortalidad asociada al cáncer. En el caso de los carcinomas, el proceso biológico que sigue la célula epitelial para llevar a cabo la diseminación metastásica se denomina *transición epitelio - mesenquimática* (TEM) (**Figura 3**). En ella una célula epitelial polarizada, que se encuentra fuertemente adherida a las células vecinas y que normalmente interactúa con la membrana basal a través de su superficie basal, sufre múltiples cambios bioquímicos que la conducen a un fenotipo mesenquimal. De esta manera las células tumorales adquieren una mayor capacidad migratoria e invasiva, siendo capaces de degradar la matriz extracelular (MEC) mediante la secreción de diferentes proteasas y abrirse paso a través de ella hasta alcanzar la microvasculatura de los sistemas linfático y sanguíneo (intravasación), sobrevivir en los vasos y llegar a las venas pequeñas de tejidos distantes. Al salir de la circulación (extravasación) son capaces de adaptarse al microambiente de los tejidos diana formando un tumor secundario (colonización). En el último paso ocurre la transformación *mesénquima - epitelial* (TME) donde las células revierten a un fenotipo epitelial (Kalluri & Weinberg, 2009; Chaffer & Weinberg, 2011).

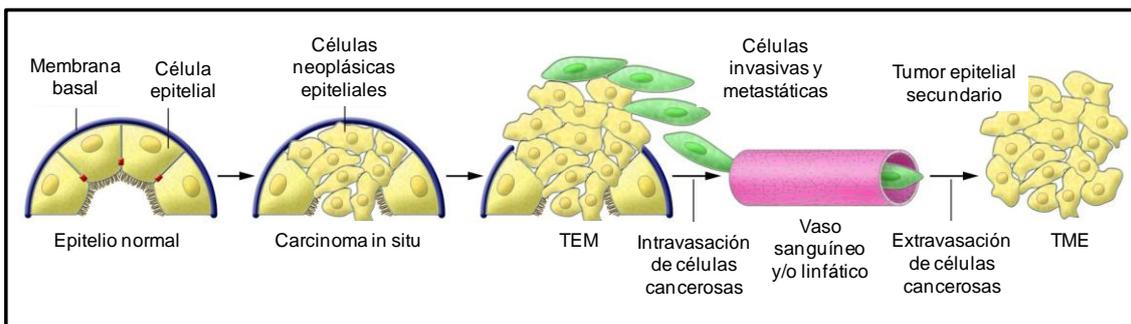


Figura 3. Contribución de la TEM a la progresión tumoral. Secuencia de pasos que conducen a la metástasis. Progresión de un epitelio normal a un carcinoma invasor, donde se pierde la polaridad celular y la unión a la membrana basal facilitando la adquisición de características que conducen a la célula a realizar la intravasación y extravasación para formar micro y macro metástasis con la consecuente reversión a un fenotipo epitelial. Tomado y adaptado de Kalluri & Weinberg, 2009.

1.2. Epidemiología

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, del inglés *International Agency for Research on Cancer*) en su proyecto GLOBOCAN 2012 (IARC, GLOBOCAN 2012), estima que a nivel mundial durante el año 2012 se han producido 14,1 millones de casos nuevos de cáncer; 8,2 millones de muertes por cáncer y que 32,4 millones de personas viven con cáncer (dentro de los 5 años del diagnóstico).

Los datos de incidencia y mortalidad que se poseen para realizar las estadísticas dependen de la disponibilidad y de la calidad de la información recogida o aportada por los diferentes países a los registros de cáncer poblacionales. Así, al evaluar la incidencia y mortalidad mundial en función a los distintos tipos de cáncer (**Figura 4**) se observa que en las mujeres, el tipo de cáncer que se diagnostica con mayor frecuencia, y que a su vez es la principal causa de muerte por cáncer, es el cáncer de mama. En el caso de los hombres, el cáncer de pulmón es el que presenta la mayor incidencia y mortalidad (IARC, GLOBOCAN 2012).

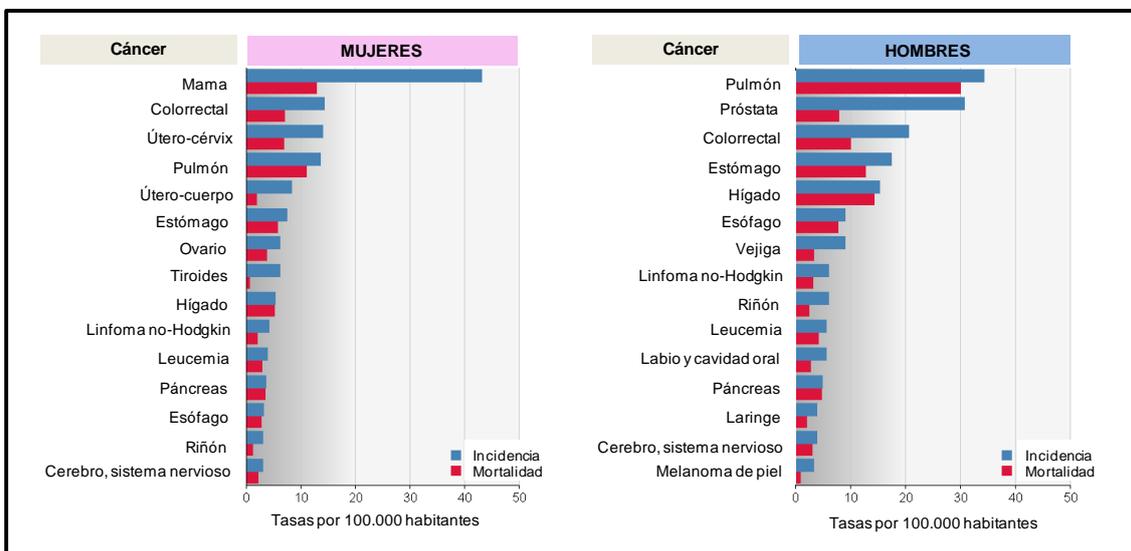


Figura 4. Tasas mundiales estimadas por la IARC de incidencia y mortalidad de cáncer en mujeres y hombres ajustadas por edad. Número de nuevos casos o muertes estimadas por cada 100.000 habitantes durante el año 2012. Proyecto GLOBOCAN 2012. Tomado y adaptado de <http://globocan.iarc.fr/>.

La Argentina se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media - alta (172,3 - 242,9 x 100.000 habitantes), de acuerdo a las estimaciones obtenidas por la IARC para el año 2012 (**Figura 5**).

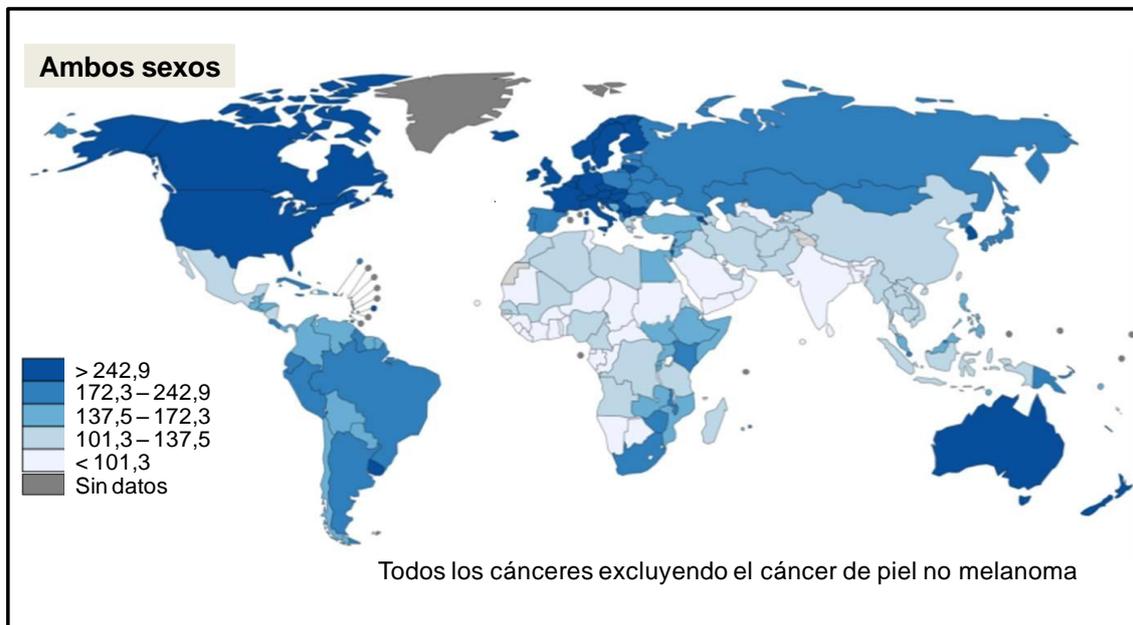


Figura 5. Incidencia de cáncer mundial en el año 2012. Tasas estandarizadas por cada 100.000 habitantes durante el año 2012. Proyecto GLOBOCAN 2012. Tomado y adaptado de <http://globocan.iarc.fr/>.

Al igual que a nivel mundial, en la población femenina de Argentina el tipo de cáncer que presenta la mayor incidencia (alejándose notablemente del resto) es el cáncer de mama, con una tasa estimada de 71,2 casos nuevos por cada 100.000 mujeres durante el año 2012 (**Figura 6**). El cáncer de mama también es el principal responsable de muerte por cáncer entre las mujeres de nuestro país (19,9 / 100.000 habitantes). En cuanto a la incidencia, en segundo y tercer lugar lo ocupan el cáncer de cuello de útero (20,9 / 100.000 habitantes) y el cáncer colorrectal (19,1 / 100.000 habitantes), respectivamente. En relación a la mortalidad, el segundo lugar lo ocupan el cáncer colorrectal junto con el de pulmón (10,0 / 100.000 habitantes) y el tercer lugar el cáncer de cérvix (8,4 / 100.000 habitantes).

En la población masculina de Argentina, la mayor tasa de incidencia corresponde al cáncer de próstata (44,1 / 100.000), luego le siguen el cáncer

de pulmón (32,5 / 100.000) y en tercer lugar el cáncer colorrectal (29,9 / 100.000). En cuanto a las tasas de mortalidad, el cáncer de pulmón es el de mayor mortalidad (30,9 / 100.000), luego se encuentra el cáncer colorrectal (17,0 / 100.000) y en tercer lugar el cáncer de próstata (15,7 / 100.000) (IARC, GLOBOCAN 2012) (**Figura 6**).

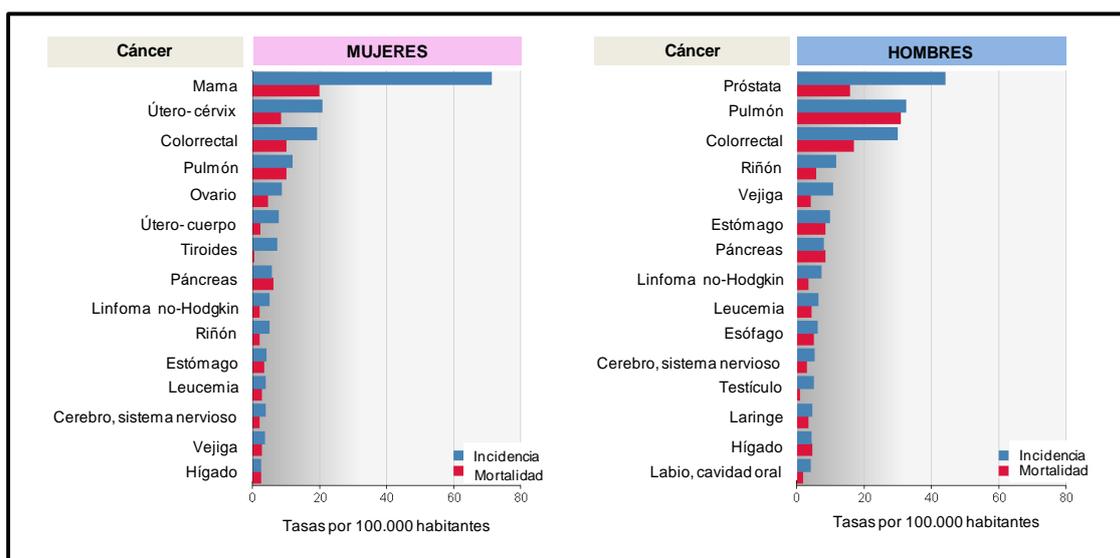


Figura 6. Tasas de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad para mujeres y hombres en Argentina estimadas por la IARC. Número de nuevos casos o muertes estimadas por cada 100.000 habitantes durante el año 2012. Proyecto GLOBOCAN 2012. Tomado y adaptado de <http://globocan.iarc.fr/>.

Para las tasas nombradas de incidencia y mortalidad de Argentina hay que tomar en consideración la calidad de los registros disponibles. Nuestro país presenta registros de una calidad alta para el cálculo de las tasas de incidencia, mientras que los registros de datos de mortalidad de la Argentina son de baja calidad debido a falta o errores en el completamiento de los mismos, por lo tanto las estadísticas surgidas a partir de estos datos deben ser tomadas con la precaución pertinente (Ferlay *et al.*, 2014).

2. Vitamina D

2.1. Historia de la vitamina D

La historia de la vitamina D es paralela a la historia del raquitismo y de la osteomalacia. En 1650 Francis Glisson (Glisson, 1650), profesor de la Universidad de Cambridge, fue el primero en escribir un tratado sobre el raquitismo realizando una descripción de la enfermedad. Glisson pensaba que era una patología nueva pues en esa época era común en varias regiones de Inglaterra. Durante el siglo XX el conocimiento sobre las características clínicas y los detalles moleculares del raquitismo y de la osteomalacia fue evolucionando. Hopkins en 1906 incluía a los pacientes con raquitismo en las enfermedades relacionadas con la dieta por la carencia de un factor en los alimentos. En 1919 Huldschinsky en Berlín, analizó los posibles “efectos curativos” de las radiaciones solares, la luz ultravioleta (UV) artificial y el aceite de hígado de bacalao en el tratamiento del raquitismo (Huldschinsky, 1919). Este autor realizó un experimento innovador, ya que logró mejorar el raquitismo en niños utilizando la luz UV producida artificialmente. Casi simultáneamente Edward Mellanby en Londres, utilizando cachorros de perro, estableció 4 tipos de dietas y, mediante el estudio de los huesos por rayos X, correlacionó el contenido de calcio en los alimentos después de revisar la histología de los huesos (Mellanby, 1919). Chick y sus colaboradores (col.) en Viena en 1922 también documentaron en un estudio epidemiológico la importancia de la exposición a los rayos solares y el aceite de hígado de bacalao en el tratamiento del raquitismo (Chick *et al.*, 1922). En el mismo año, Dick plantea los factores relacionados con la etiología del raquitismo: la ausencia de las radiaciones solares, la privación del aire fresco y la falta de ejercicio (Dick, 1922). En 1918, McCollum y sus col. alimentaron a ratas con diferentes dietas, ricas en cereales pero deficientes en vitamina A liposoluble y en calcio, y observaron cambios esqueléticos y aspectos clínicos similares a los presentes en los niños con raquitismo. Posteriormente, estudiaron el aceite de hígado de bacalao usado para el tratamiento de la enfermedad desde el año 1789 en estas ratas raquílicas y consiguieron revertir el cuadro. Así, McCollum postuló la existencia de una nueva vitamina presente en el aceite de hígado de bacalao (McCollum *et al.*, 1922), la cual posteriormente se conocería con el nombre de vitamina D.

Por lo tanto, las dos formas de adquirir el compuesto eran a través de la dieta, como es típico de los compuestos vitamínicos, o por exposición de la piel a la radiación UV proveniente del sol. Estos hallazgos estimularon la búsqueda del precursor de la vitamina D, detectándose en primer lugar al ergosterol o provitamina D₂ en levaduras y luego en otras especies de hongos y en plantas. Más tarde se aisló la vitamina D en forma pura y se la denominó ergocalciferol o vitamina D₂. Sin embargo, varios investigadores observaron que este compuesto no era tan efectivo como la vitamina D obtenida a partir de la piel de los mamíferos. Estas observaciones llevaron a Windaus y Bock en el año 1936 a obtener un nuevo precursor a partir de la piel de cerdo denominado 7-dehidrocolesterol o provitamina D₃ (Windaus & Bock, 1936), el cual al ser irradiado producía otra forma de la vitamina D: el colecalciferol o vitamina D₃ (Figura 7).

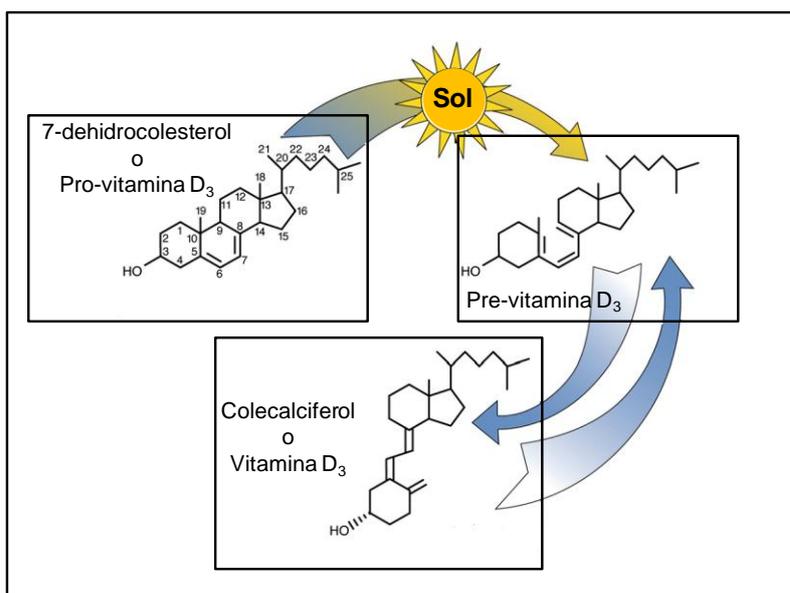


Figura 7. Conversión del 7-dehidrocolesterol en pre-vitamina D₃ por acción de la luz UV y posterior isomerización a colecalciferol por acción de la temperatura corporal. Tomado y adaptado de DeLuca, 2014.

Con el tiempo se fueron dilucidando las estructuras químicas y mecanismos que conducían a la obtención de la vitamina D₃ en el organismo; Holick y col. proporcionaron evidencia de la formación de la pre-vitamina D₃ por irradiación solar (Holick *et al.*, 1977) y en 1978 el grupo de Esvelt aisló e identificó al colecalciferol por espectroscopía de masa (Esvelt *et al.*, 1978).

Desde entonces se ha pensado que el ergosterol y ergocalciferol son típicos de vegetales y hongos, mientras que el 7-dehidrocolesterol y el colecalciferol lo son de los vertebrados.

2.2. Estructuras químicas de las vitaminas D

Químicamente, las vitaminas D₂ y D₃, son β -secoesteroides que contienen un núcleo estructural básico de 4 anillos fusionados conocidos como sistema ciclopentanoperhidrofenantreno (**Figura 8A**). La apertura de un anillo del esqueleto esteroideal da origen al prefijo “seco”, en este caso en el anillo B. El ergosterol posee, a diferencia del 7-dehidrocolesterol, un doble enlace entre los carbonos 22 y 23 y un grupo metilo en el carbono 24 de la cadena lateral (**Figura 8B**), diferencias que se mantienen entre el ergocalciferol y el colecalciferol.

La forma activa de la vitamina D₃, el calcitriol (en el apartado 2.3 se detallará su síntesis), incluye un anillo A, un seco anillo B, un biciclo CD y una cadena lateral flexible. Teniendo en cuenta la estructura, activación y el modo de acción, el metabolito activo pertenece a la misma familia que las hormonas esteroideas clásicas tales como la aldosterona, testosterona, estradiol, progesterona, cortisol, entre otras. Sin embargo, sus características estructurales particulares hacen que el colecalciferol y sus metabolitos se diferencien del resto de los esteroideos. Estas particularidades son: ser un seco-esteroide, es decir presentar uno de los anillos de la estructura cicloperhidrofenantrénica abierto (enlace C9 - C10) y disponer de una flexibilidad conformacional dinámica comparada con la rigidez de otras hormonas esteroideas (**Figura 8 C y D**). El motivo por el cual los metabolitos de la vitamina D₃ son considerados como “vitaminas” es en base a la historia de su descubrimiento y al hecho de que un precursor, el colecalciferol, puede ser obtenido a partir de la dieta.

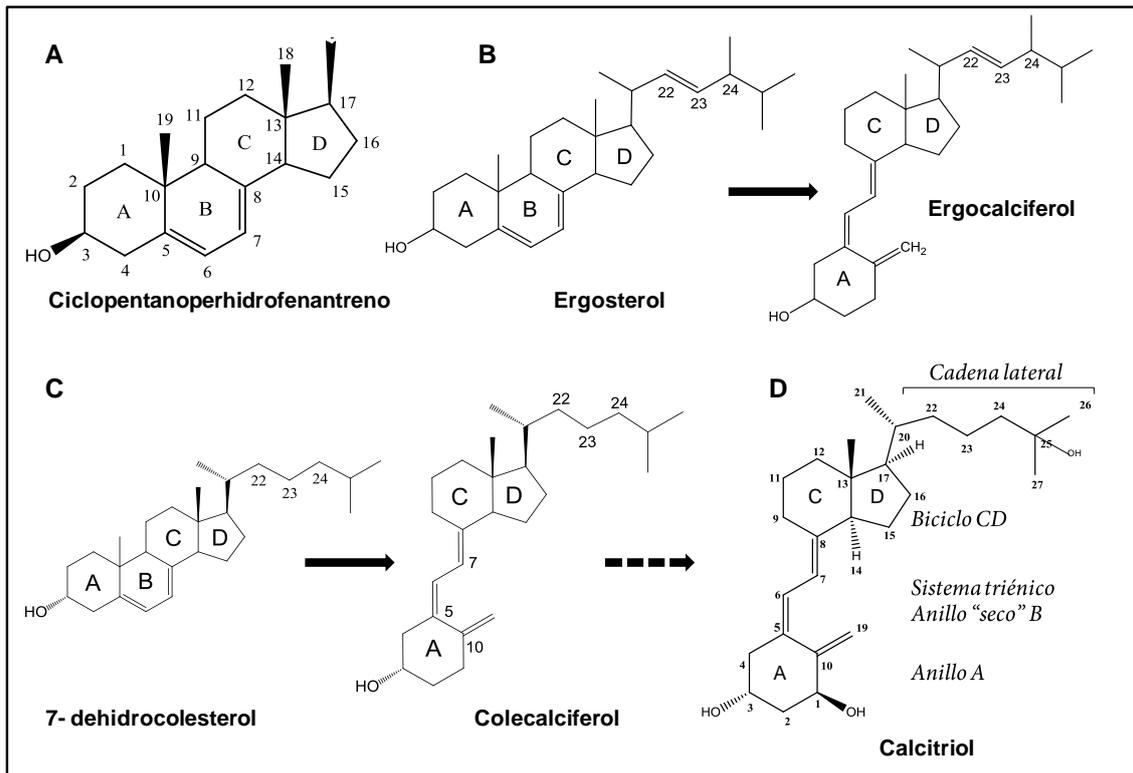


Figura 8. Estructuras químicas de las vitaminas D y metabolitos relacionados. A) Esqueleto esteroidal ciclopentanoperhidrofenantreno. B) Ergocalciferol y su precursor. C) Colecalciferol y su precursor. D) Forma activa de la vitamina D₃.

2.3. Metabolismo de la vitamina D₃

Como se mencionó anteriormente, en la naturaleza se encuentran dos formas principales de la vitamina D: el ergocalciferol, que se obtiene a partir de plantas y hongos, y el colecalciferol. Este último puede ser obtenido principalmente de dos fuentes básicas: la dieta (10 %) y la producción endógena por conversión fotoquímica a partir de 7-dehidrocolesterol en la epidermis (90 %) (**Figura 9**).

A partir de la dieta el colecalciferol puede ser incorporado al organismo por consumo de alimentos ricos en vitamina D₃ como son principalmente el aceite de hígado de pescado y los pescados grasos (salmón, atún, sardinas, etc.). También se encuentra disponible en menor proporción en la leche, manteca, quesos, yema de huevo y champiñones, o alternatively, se lo puede obtener mediante suplementación vitamínica.

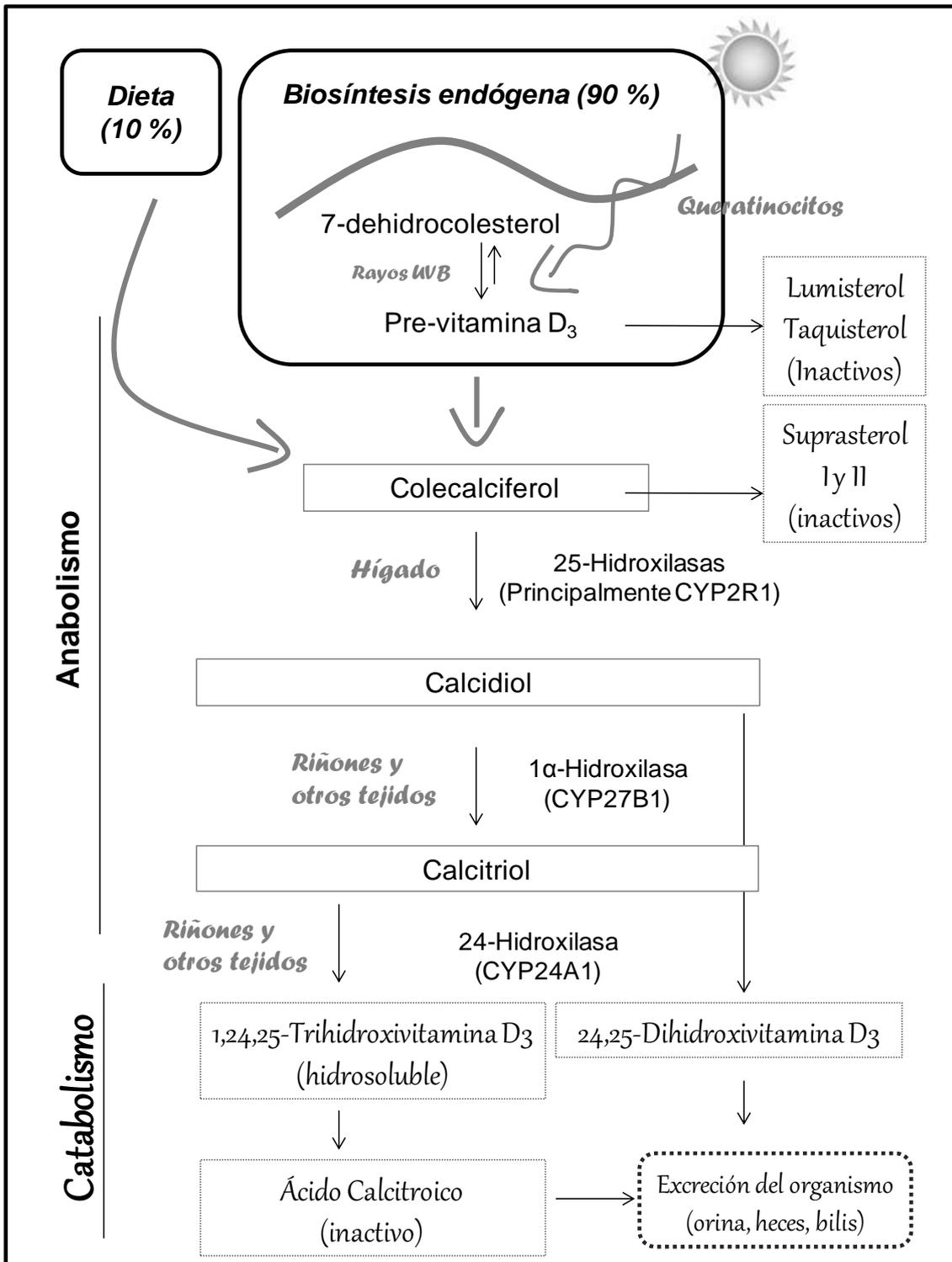


Figura 9. Metabolismo de la vitamina D₃.

Por otro lado, el proceso de biosíntesis cutánea de colecalciferol ocurre en dos pasos: los rayos solares UVB en el rango de 290 - 315 nm (Holick, 2011 a-b; DeLuca, 2004) fotoisomerizan el 7-dehidrocolesterol a pre-vitamina

D₃ (paso no enzimático) a nivel de la membrana plasmática de los queratinocitos; luego ésta isomeriza a colecalciferol en un proceso dependiente de la temperatura de la piel, que tarda varias horas (Adams & Hewison, 2010; Dusso *et al.*, 2005). La producción cutánea está estrictamente regulada, de modo que cuando el nivel de colecalciferol formado es suficiente, la pre-vitamina D₃ puede ser fotoisomerizada a formas inertes (lumisterol o taquisterol) o puede volver a transformarse en 7-dehidrocolesterol y el colecalciferol sintetizado puede degradarse a formas inactivas (suprasterol I y II) (Webb *et al.*, 1989).

Para ejercer sus efectos fisiológicos, el colecalciferol debe convertirse a su forma activa. Para ello inicialmente es transportado por proteínas DBP (del inglés *D- Binding Protein*), que son proteínas fijadoras de vitamina D y sus metabolitos. De esta manera, viaja por circulación sanguínea hasta el hígado, donde sufre un proceso de hidroxilación en el carbono 25, conocido como el primer paso de activación metabólica de la vitamina D₃. Este evento ocurre en los hepatocitos catalizado por varias enzimas hepáticas con función de citocromo P450 (CYP2R1, CYP27A1, CYP2D11, CYP2D25, CYP3A4 y CYP2J3) que favorecen la conversión del colecalciferol a calcidiol (25-hidroxitamina D₃ o hidroxicolecalciferol) (Zhu & DeLuca, 2012). Se ha planteado que, de todas estas enzimas, la CYP2R1 es una enzima clave de la 25-hidroxilación puesto que los pacientes con mutaciones en su gen presentan signos clínicos y bioquímicos de deficiencia de vitamina D (Cheng *et al.*, 2004).

El calcidiol, es un metabolito de importancia clínica dado que es la variante más abundante y estable en circulación de las formas de vitamina D₃ (Adams & Hewison, 2010). Sus niveles se correlacionan con la exposición total del organismo a la vitamina D tanto proveniente de la producción endógena como de la dieta (Toner *et al.*, 2010). El calcidiol es transportado por DBP hacia el riñón, para completar su proceso de activación en el túbulo proximal. Aquí es hidroxilado en el carbono 1 del anillo A para convertirse en la forma hormonalmente activa de la vitamina D₃: el **calcitriol** (1 α ,25-dihidroxitamina D₃), principal responsable de la mayoría de los efectos biológicos de la vitamina D₃ (Giammanco *et al.*, 2015; Kochupillai, 2008; Yoon & DeLuca, 1980). Esta reacción de hidroxilación es catalizada por la enzima mitocondrial 1 α -

hidroxilasa que es el citocromo P450 27B1 (CYP27B1), codificada por el gen *CYP27B1* en los seres humanos. Las mutaciones en esta enzima producen raquitismo dependiente de vitamina D tipo 1, lo cual resalta la importancia de su función en la conversión del calcidiol a su forma activa (Christakos *et al.*, 2015).

La enzima 1 α -hidroxilasa se encuentra predominantemente en las células de los túbulos renales, pero también se expresa en sitios extrarrenales como placenta, monocitos, macrófagos, próstata, mama, colon, corazón, pulmón, cerebro, queratinocitos, células β pancreáticas, células endoteliales y células paratiroides (Morris & Anderson, 2010). Es decir, actualmente se encuentra ampliamente reconocida la producción extrarrenal del calcitriol en muchos tipos de células del cuerpo y, además, en células tumorales (Feldman *et al.*, 2014; Jones, 2007). En contraste con el sistema clásico endocrino de la vitamina D, la regulación de la producción de calcitriol en los tejidos extrarrenales es independiente de la estimulación por la hormona paratiroidea (PTH) y depende, en cambio, de factores específicos del tejido en cuestión y de los niveles de calcidiol en sangre (**Figura 10**).

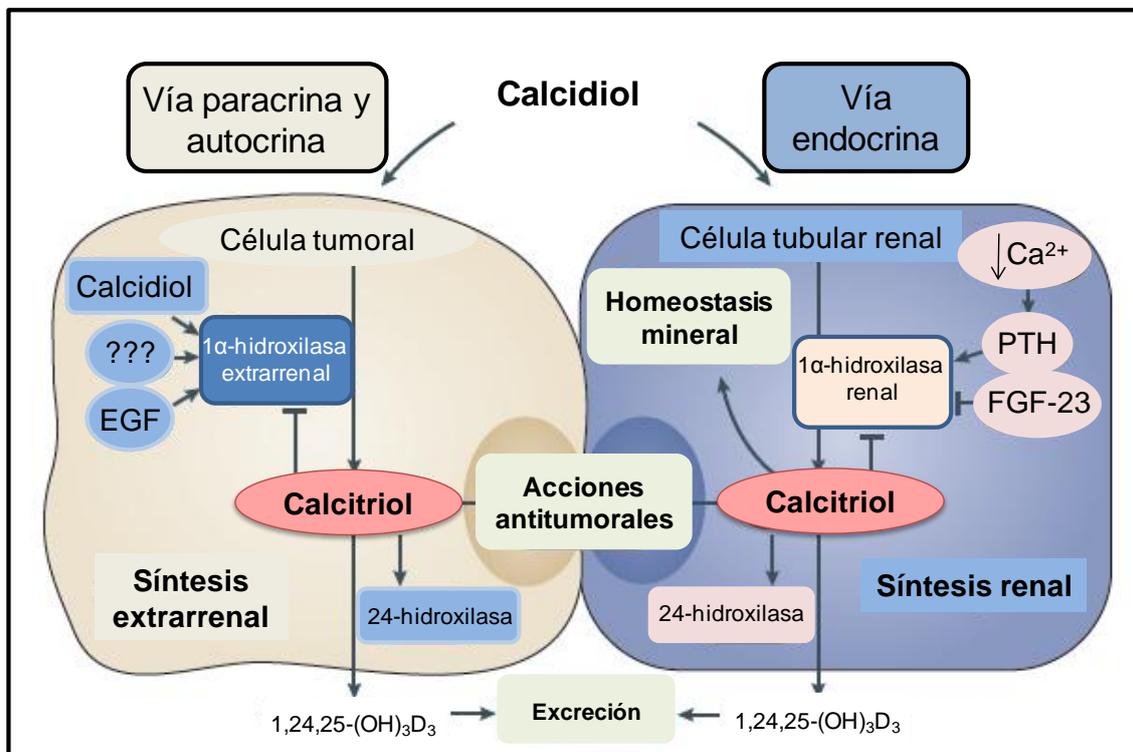


Figura 10. Vías de síntesis del calcitriol: renal endocrina y extrarrenal paracrina o autocrina. Tomado y adaptado de Feldman *et al.*, 2014.

El calcitriol es transportado en sangre unido principalmente a la DBP. Presenta una vida media plasmática de 4 - 5 h y su acción se encuentra limitada por su catabolismo. La degradación del calcitriol ocurre principalmente a través de la actividad de la 24-hidroxilasa (CYP24A1), codificada por el gen *CYP24A1*. Es una enzima multicatalítica perteneciente a la familia del citocromo P450 capaz de realizar oxidaciones sucesivas (Jones *et al.*, 2012; Beckman *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1993). Esta enzima necesita para su acción la presencia de un grupo hidroxilo en posición 25 y puede hidroxilar la posición C24 tanto del calcidiol como del calcitriol, aunque la afinidad por este último es mayor. La acción de la 24-hidroxilasa conduce a la síntesis de 24,25(OH)₂ vitamina D₃ y 1,24,25(OH)₃ vitamina D₃, ambos son derivados hidrosolubles que poseen menor afinidad por el VDR (del inglés *Vitamin D Receptor*). Estos derivados pueden ser eliminados del organismo constituyendo un papel clave en la protección contra el exceso de metabolitos de vitamina D (Christakos *et al.*, 2015; Kumar, 1984).

2.4. Regulación del metabolismo de la vitamina D₃

El calcitriol requiere una estricta regulación de su activación y desactivación a través de una serie de procesos de retroalimentación positiva y negativa que resultan en cambios en la expresión de las enzimas hidroxilasas con el fin de aumentar o disminuir las concentraciones de calcitriol según el estado fisiológico (Plum & DeLuca, 2009). La producción del calcitriol, está estrechamente regulada: principalmente por la hormona paratiroidea (PTH), el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23), el calcio, el fósforo, y el mismo calcitriol (**Figura 11**).

Específicamente, los niveles bajos de calcio inducen un aumento de la actividad de la 1 α -hidroxilasa. Es decir, la hipocalcemia es detectada por el receptor sensible al calcio (CaSR) de las células paratiroideas, con lo que aumenta la expresión de la PTH y ésta a su vez induce la transcripción de la enzima 1 α -hidroxilasa en las células tubulares proximales del riñón. Como

consecuencia, la producción de calcitriol se incrementa para regular la homeostasis fosfocálcica (Christakos *et al.*, 2015). Para controlar este ciclo, el mismo calcitriol suprime la transcripción de los genes *PTH* y *CYP27B1* (Dusso *et al.*, 2005). Adicionalmente, el calcitriol estimula la expresión de la enzima 24-hidroxiolasa que previamente estaba inhibida por los bajos niveles de calcio y por la PTH. La marcada inducción de la 24-hidroxiolasa resulta en una autorregulación cuando los niveles de calcitriol requieren atenuación para proteger al organismo de la hipercalcemia (Christakos *et al.*, 2015).

Además de la PTH, otras hormonas que ejercen regulación endocrina sobre la actividad de la 1α -hidroxilasa son los estrógenos, la calcitonina, la prolactina, la hormona de crecimiento y la insulina. Sus efectos estimulan la acción de esta enzima y favorecen la producción de calcitriol (Norman, 2008). Esta última hormona podrá interactuar con su receptor VDR generando los efectos clásicos en la regulación de la homeostasis del calcio y del fosfato. Al corregirse el déficit en la concentración sérica de calcio, se genera regulación negativa por parte del calcitriol sobre la PTH y las hidroxilasas y, en este mecanismo de control también interviene el FGF-23 liberado a partir del hueso (St-Arnaud, 2008).

El FGF-23 es un factor fosfatúrico que promueve la excreción renal de fosfato por disminución de su reabsorción en el túbulo proximal. Específicamente, el calcitriol induce la expresión de FGF-23 y a su vez el FGF-23 suprime la expresión de 1α -hidroxilasa e induce la de 24-hidroxiolasa en el riñón; por lo tanto, inhibe la síntesis y promueve el catabolismo del calcitriol para reducir sus niveles y dejar de estimular la producción de FGF-23, formando un ciclo de retroalimentación negativa entre FGF-23 y el calcitriol.

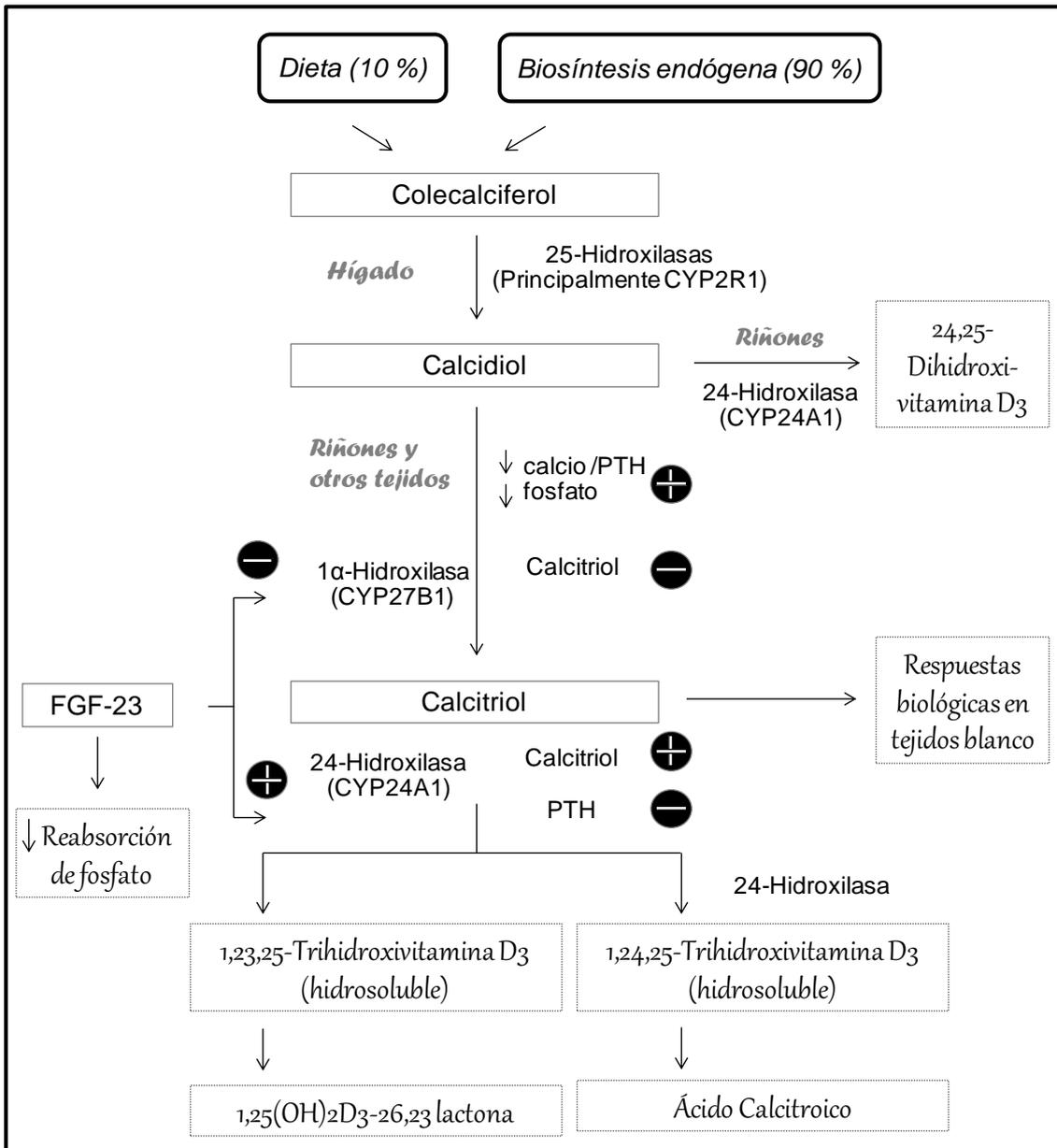


Figura 11. Regulación de la síntesis metabólica y degradación del calcitriol. Tomado y adaptado de Christakos *et al.*, 2015.

2.5. Transporte de la vitamina D₃

Los metabolitos de la vitamina D₃ son moléculas lipofílicas que deben ser transportadas en la circulación unidas a proteínas plasmáticas. La más importante de estas proteínas es la DBP que une los diferentes metabolitos con el siguiente orden de afinidad: calcidiol = 24,25(OH)₂ vitamina D₃ > calcitriol > colecalciferol. Si bien la mayoría de los metabolitos se encuentran unidos a la DBP, también pueden ser transportados por lipoproteínas y por la albúmina sérica debido a la mayor abundancia de esta última (650 μM de albúmina con

respecto a 5 μM de DBP) (Chun *et al.*, 2008). Además, en general estos transportadores están disponibles o “libres” debido a que su concentración relativa es elevada con respecto a los metabolitos de la vitamina D₃. Los niveles plasmáticos de la DBP son 20 veces más altos que la cantidad total de metabolitos de vitamina D₃, por lo que el calcitriol es transportado en sangre unido a la DBP en un 85 - 88 %, mientras que en un 12 - 15 % lo hace unido a la albúmina, estando en condiciones fisiológicas normales aproximadamente sólo el 0,4 % libre en plasma (Bikle *et al.*, 1986).

Los metabolitos de vitamina D₃, tanto libres como unidos a la DBP, pueden ingresar a la célula ya sea por un mecanismo pasivo o activo. Es decir, la pequeña fracción de los metabolitos no unidos a DBP entra pasivamente a las células blanco para ser adicionalmente metabolizada y ejercer sus efectos biológicos. En cuanto a los metabolitos unidos a la DBP, pueden ingresar a la célula mediante endocitosis (Chun, 2012). La megalina (también llamado receptor endocitomegalina) pertenece a un grupo de proteínas que facilitan la endocitosis del complejo calcidiol - DBP junto con la cubilina y la proteína asociada al receptor (RAP). Este mecanismo es el que ocurre en los túbulos proximales del riñón para la producción endocrina del calcitriol. Se ha reportado, que los ratones *knockout* para megalina no logran recuperar la DBP y pierden la vitamina D por vía urinaria, con el consecuente raquitismo (Chun *et al.*, 2008). A su vez, el calcitriol circulante unido a DBP también puede ser endocitado mediante este mecanismo y, al ser liberado en el interior de la célula, provocar sus acciones biológicas.

2.6. Mecanismos de acción del calcitriol

El calcitriol actúa como una hormona esteroidal y puede inducir respuestas a nivel genómico (regulando la transcripción de genes) y no genómico (rápidas). En ambas vías de acción se ha descrito la participación del receptor VDR (Díaz *et al.*, 2015; Feldman *et al.*, 2014), el cual puede actuar como un factor de transcripción activado por ligando.

2.6.1. Características del VDR

El VDR humano pertenece a la familia de los receptores de hormonas esteroideas - tiroideas - retinoideas, consiste en 427 aminoácidos y se compone de dos dominios funcionales básicos: i) DBD (del inglés *DNA Binding Domain*), dominio amino - terminal, altamente conservado, de unión al ADN y ii) LBD (del inglés *Ligand Binding Domain*), dominio carboxi - terminal, de unión al ligando; ambos dominios conectados a través de una región bisagra.

La estructura cristalina de LBD - VDR unido a su ligando natural, el calcitriol, ha sido reportada por Rochel y col. (Rochel *et al.*, 2000). Esta estructura muestra que este dominio se encuentra formado por 13 hélices α y 3 hojas plegadas β (Malinska *et al.*, 2015). La activación del VDR depende de la capacidad del ligando de producir un cambio conformacional en el sitio LBD creando un dominio funcional activado AF-2 dentro por la Hélice 12 (H12) que media la unión de co-moduladores necesarios para regular la transcripción génica (Orlov *et al.*, 2012). La estructura reportada por Rochel y col. corresponde a la conformación activa del VDR (es decir, contiene el dominio de AF-2 activado). Las interacciones principales que se establecen entre el calcitriol y el LBD corresponden a enlaces puentes de hidrógeno con los hidroxilos de las posiciones 1 (1-OH), 3 (3-OH) y 25 (25-OH) del metabolito activo. El 1-OH forma puentes de hidrógeno con los aminoácidos Ser237 y Arg274, siendo más fuerte la interacción con este último residuo. El 3-OH interacciona con Tyr143 y Ser278, y el 25-OH establece dos puentes de hidrógeno con His305 e His397, respectivamente.

En la **Tabla 1** se presenta la diversidad de tejidos y órganos en los que se puede encontrar receptores VDR y dónde puede actuar el calcitriol para provocar sus respuestas genómicas y no genómicas (Verhave & Siegert, 2010; Norman, 2008). Posteriormente se comentarán los efectos específicos en los principales tejidos.

Tabla 1. Distribución tisular del VDR	
Sistema	Órganos, tejidos y células
Endocrino	Paratiroides - Células C tiroideas - Células β pancreáticas - Glándulas suprarrenales - Hipófisis
Cardiovascular	Células del músculo liso arterial - Cardiomiocitos - Células endoteliales
Muscular	Osteoclastos - Condrocitos - Músculo estriado esquelético
Gastrointestinal	Esófago - Estómago - Intestino - Hepatocitos
Renal	Células tubulares - Aparato yuxtglomerular - Podocitos
Reproductor	Ovarios - Placenta - Útero - Testículos - Epidídimo
Inmune	Médula ósea - Timo - Linfocitos B y C
Respiratorio	Células alveolares pulmonares
Epidérmico	Queratinocitos y folículos pilosos
Nervioso	Neuronas
Otros	Retina - Tejido adiposo - Mama - Células tumorales - Parótidas

2.6.2. Acciones genómicas del calcitriol

En el mecanismo de acción genómico del calcitriol el papel del receptor VDR activado por el ligando es dirigir la maquinaria de la transcripción a sitios específicos del genoma. Es decir, el VDR activado por el ligando sufre un cambio conformacional que permite que el receptor sea translocado al núcleo donde forma un heterodímero con el receptor retinoide X (RXR); este complejo se une a elementos de respuesta de vitamina D (VDRE) en el promotor de los genes diana y recluta co-activadores y/o co-represores para inducir o inhibir la transcripción de esos genes (Teske *et al.*, 2016; Feldman *et al.*, 2014) (**Figura 12**).

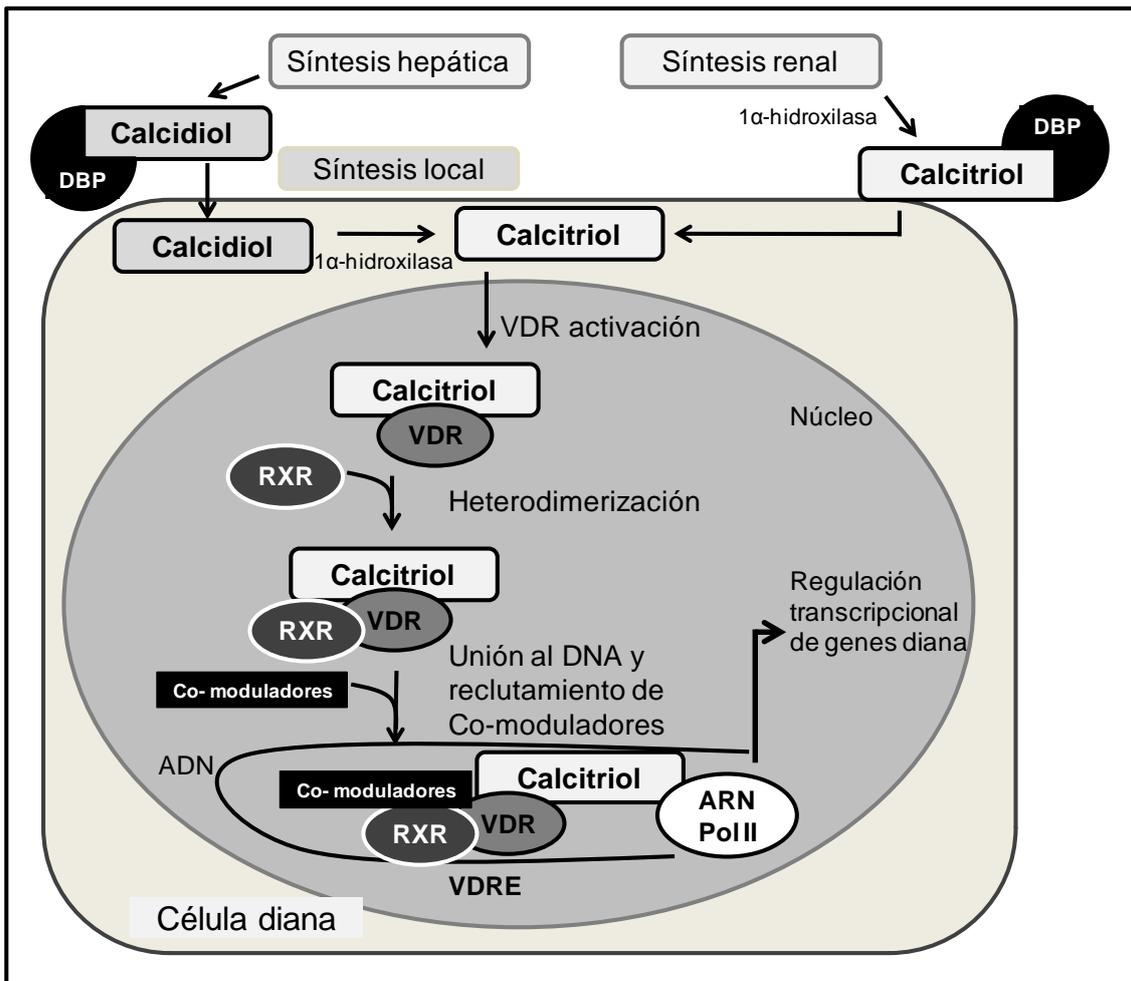


Figura 12. Mecanismo de acción genómico del calcitriol a través de VDR. Calcidiol y calcitriol circulan unidos a la DBP. Al entrar en las células diana el calcidiol se convierte localmente por la enzima 1α -hidroxilasa a calcitriol. Las acciones biológicas del calcitriol, sintetizado tanto en las células renales como en las extrarrenales, están mediadas por el VDR. Cuando el calcitriol se une al VDR, heterodimeriza con el RXR y el complejo calcitriol-VDR-RXR se une a VDRE en los promotores de genes diana. Así, se conduce al reclutamiento de co-activadores o co-represores, que promueven la regulación transcripcional positiva o negativa de la expresión génica. Tomado y adaptado de Feldman *et al.*, 2014.

Dentro de los principales genes blanco que se han caracterizado se incluyen transportadores de calcio y fosfato, osteocalcina (la proteína de unión de calcio), bombas iónicas en intestino y riñón y el factor de diferenciación osteoclastogénico, sintetizado por los osteoblastos, que estimula la actividad de los osteoclastos. Además, el calcitriol suprime la expresión renal del gen *CYP27B1*, cuyo producto proteico es responsable de su síntesis, e induce la expresión de *CYP24A1*, cuyo producto, la enzima 24-hidroxilasa, es responsable de su degradación (Pike & Meyer, 2012).

La gran distribución del VDR en diferentes tejidos y la presencia de los VDRE encontrados en más de 200 genes que modulan un gran número de procesos celulares y tisulares, justifican la variedad de efectos del calcitriol en el organismo. Estos efectos pueden comprender acciones clásicas de regulación de la homeostasis fosfocálcica (ver apartado 2.7.1) y no clásicas (ver apartado 3).

2.6.3. Acciones no genómicas del calcitriol

El calcitriol, al igual que otras hormonas esteroideas, puede inducir respuestas no genómicas o rápidas que ocurren en un tiempo menor a las desencadenadas por mecanismos genómicos. Se ha documentado la existencia de receptores de membrana para el calcitriol responsables de esta rapidez de ocurrencia de los efectos no genómicos (Trump *et al.*, 2010). Los dos candidatos principales para actuar como receptores de membrana son el receptor VDR y la proteína ERp57 (del inglés **E**ndoplasmic **R**eticulum stress **P**rotein 57) o conocida también como 1,25D₃-MARRS (del inglés **C**alcitriol **M**embrane **A**ssociated **R**apid **R**esponse **S**teroid) y GRP58. ERp57 se identificó y describió por primera vez a partir del estudio de los efectos rápidos inducidos por calcitriol en membranas basolaterales del epitelio intestinal de pollo (Nemere *et al.*, 2004) y luego se halló su equivalente en mamíferos (Rohe *et al.*, 2005). En cuanto a la participación del VDR en las respuestas rápidas, se ha descrito su presencia en las caveolas celulares, es decir, en las invaginaciones de la membrana plasmática enriquecidas con esfingolípidos y colesterol. El calcitriol al interactuar con estos receptores puede iniciar rápidamente la síntesis de segundos mensajeros tales como AMP cíclico, GMP cíclico, inositol trifosfato, diacilglicerol y calcio. Así, las señales de estas pequeñas moléculas pueden ser amplificadas por la consiguiente activación de cascadas de proteínas río abajo o efectores secundarios, tales como la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa activada por mitógenos y calmodulina, o por modulación de la vía Hedgehog/Gli (Chiang & Chen, 2013; Haussler *et al.*, 2011).

Las múltiples respuestas rápidas del calcitriol se traducen en diversos efectos fisiológicos dentro de los que cabe citar eventos como la absorción

intestinal rápida de calcio, la secreción de insulina por células β pancreáticas inducida por VDR, la apertura de canales de calcio y cloro dependientes de voltaje en los osteoblastos y la migración rápida de células endoteliales (Hausler *et al.*, 2011). Además, estos efectos no genómicos pueden cooperar con la vía genómica para transactivar el VDR nuclear e inducir otras respuestas biológicas. De este modo, ambos receptores, de membrana y nucleares, pueden participar en los efectos finales del calcitriol en los diferentes tipos de células (Irazoqui *et al.*, 2014; Buitrago *et al.*, 2013; Karlsson *et al.*, 2010; Mizwicki & Norman, 2009).

En la **Figura 13** se presenta un esquema de los mecanismos mediante los cuales el calcitriol puede inducir acciones genómicas y no genómicas.

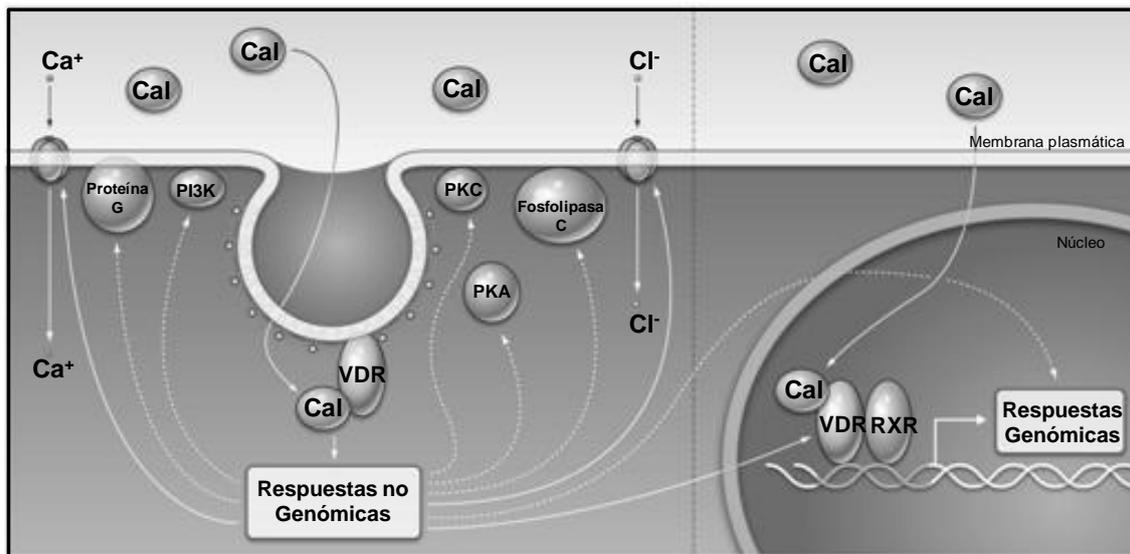


Figura 13. Señalización genómica y no genómica provocada por el calcitriol. La unión del calcitriol (Cal) al VDR nuclear provoca la heterodimerización con el receptor RXR e induce respuestas genómicas a través de la regulación de la transcripción de genes. También el calcitriol puede unirse al VDR asociado a caveolas de la membrana plasmática para generar respuestas no genómicas como la apertura de canales de cloro y calcio o la generación de segundos mensajeros. Algunas de estas cascadas pueden conducir a cambios en la expresión génica de manera independiente o a través del VDR nuclear. Tomado y adaptado de Mizwicki & Norman, 2009.

2.7. Funciones biológicas del calcitriol

En relación a su actividad biológica el calcitriol actúa como una hormona esteroidea en varios tejidos blanco en lo que se conoce como el sistema endocrino de la vitamina D. El calcitriol es un componente esencial de las interacciones entre los riñones, el hueso, las glándulas paratiroides y el intestino, que mantiene los niveles de calcio y fósforo dentro de límites estrechos con el fin de mantener su homeostasis. Además de estas funciones clásicas, el calcitriol presenta acciones no clásicas que explican su relación con patologías autoinmunes, cardiovasculares, neurológicas, infecciosas, diabetes y cáncer (Feldman *et al.*, 2014). A continuación se presentará una descripción de los principales efectos de esta hormona sobre la homeostasis fosfocálcica y posteriormente sobre aquellos procesos que constituyen los “hallmarks” del cáncer.

2.7.1. Funciones clásicas: calcitriol y la homeostasis fosfocálcica

Intestino

El calcitriol aumenta la absorción de calcio y fosfato en el intestino delgado. Para la captación intestinal de calcio la hormona incrementa la expresión de proteínas tales como los canales epiteliales TRPV6, y en menor frecuencia TRPV5, calbindina D (proteína fijadora del calcio citosólico) y transportadores de Na/Ca (NCX1). Adicionalmente, el calcitriol incrementa el transporte de fósforo a través de la estimulación de la expresión de la proteína co-transportadora de sodio - fosfato tipo 2 (NPT2) en la superficie luminal de los enterocitos de yeyuno e íleon, cambiando la composición de la membrana plasmática de estas células para incrementar la fluidez de captación de este anión (Kochupillai, 2008). El efecto del calcitriol en estos procesos es fundamental dado que sin una adecuada cantidad de esta hormona solo se absorbe el 10 – 15 % del calcio y el 60 % del fósforo ingerido en la dieta. La interacción del calcitriol con el receptor VDR incrementa la absorción de calcio intestinal a un 30 – 40 % y del fósforo a un 80 %, aproximadamente (Holick, 2007).

Esqueleto

El calcitriol es esencial para el desarrollo y mantenimiento del esqueleto mineralizado. Su deficiencia produce raquitismo en niños y adolescentes, y osteomalacia en adultos (Holick, 2007). Los efectos de la hormona influyen en múltiples procesos que van desde el desarrollo de la placa de crecimiento, hasta el control de la homeostasis ósea, al regular el equilibrio entre la formación osteoblástica y la resorción osteoclástica del tejido óseo (Montecino *et al.*, 2010; Kochupillai, 2008). Cuando hay deficiencia de calcio sérico, el calcitriol interactúa con el VDR de los osteoblastos para inducir la estimulación osteoclástica y la consecuente resorción de la matriz mineral para liberar calcio a la circulación.

Glándulas paratiroides

El sistema endocrino del calcitriol es un potente modulador sobre la función paratiroidea. Cuando existe deficiencia crónica de vitamina D se produce hiperplasia de las paratiroides e incremento en la síntesis y secreción de la PTH. La administración de calcitriol inhibe la síntesis de la PTH, por lo cual es una terapia efectiva para el hiperparatiroidismo secundario a la enfermedad renal crónica (Norman, 2008). Además de reprimir la transcripción del gen *PTH*, el calcitriol aumenta los niveles proteicos de su receptor VDR en las paratiroides y la respuesta de estas glándulas al calcio sérico por inducción de la transcripción del CaSR (Dusso *et al.*, 2005).

Riñones

Diariamente el 98 % del calcio filtrado es reabsorbido. Alrededor del 65 % se reabsorbe en el túbulo proximal de manera independiente de calcitriol. En los túbulos distales el calcio se reabsorbe por acción del calcitriol y de la PTH. El efecto endocrino más importante del calcitriol en el riñón es la regulación de su propia homeostasis a través de la supresión de la expresión de la 1 α -hidroxilasa y de la inducción de la 24-hidroxilasa (**Figura 11**). Además, aumenta la reabsorción tubular distal de calcio mediante la estimulación de la expresión de calbindina y acelera el transporte de calcio en el túbulo distal

inducido por la PTH. Los TRPV5 son canales importantes en la reabsorción del calcio cuya síntesis es regulada por calcitriol en las células renales (Christakos *et al.*, 2015; Dusso *et al.*, 2005).

3. El sistema hormonal de la vitamina D₃ y su relación con el cáncer

En los últimos años se ha reportado evidencia que indica una fuerte influencia del sistema endocrino de la vitamina D₃ tanto en la prevención como en el desarrollo del cáncer. A continuación se presenta en primer lugar la evidencia epidemiológica de dicha relación (apartado 3.1) y luego la influencia de este sistema, específicamente del calcitriol, sobre los “hallmarks” del cáncer descritos previamente en esta introducción (apartado 3.2).

3.1. Epidemiología del cáncer y vitamina D

La primera evidencia en humanos de la existencia de una relación entre la vitamina D y la prevención del cáncer se originó en estudios ecológicos que sugirieron que una adecuada exposición a la luz del sol (UV) o el hecho de vivir en latitudes menores se relacionaban con una menor incidencia del cáncer de colon (Garland & Garland, 1980). Posteriormente, otros estudios demostraron la misma tendencia para el cáncer de próstata (Hanchette & Schwartz, 1992).

En un meta-análisis de ocho estudios prospectivos se observó una asociación inversa entre los niveles séricos circulantes de calcidiol y el cáncer colorrectal, con una asociación más fuerte para el cáncer rectal (Lee *et al.*, 2011). En concordancia con esta investigación, en un estudio con una cohorte de 25.000 voluntarios, se encontró una asociación inversa entre los niveles pre-diagnóstico altos de calcidiol en suero y un menor riesgo de contraer cáncer de colon (Garland *et al.*, 1989). Estas observaciones sugieren entonces que los niveles bajos de calcidiol están relacionados con mayor riesgo de cáncer colorrectal. Sin embargo, esta asociación entre los niveles de este metabolito y el riesgo de contraer algunos tipos de cáncer no implica una relación causa - efecto. Asimismo, existe abundante y consistente evidencia que indica que los

niveles altos de calcidiol se correlacionan con una mejor supervivencia de los pacientes de cáncer colorrectal (Giovannucci, 2010).

En cuanto al cáncer de mama la evidencia de asociación entre las concentraciones séricas de calcidiol y el riesgo de desarrollo del cáncer es limitada y controversial. Mientras que algunos estudios reportan la falta de asociación entre los niveles séricos de calcidiol y el riesgo de contraer cáncer de mama, otros han asociado niveles séricos de calcidiol de 52 ng/ml con una reducción del 50 % del riesgo de desarrollar este tipo de cáncer en comparación con las mujeres con una concentración de calcidiol menor a 13 ng/ml (Scarmo *et al.*, 2013; Bertone-Johnson *et al.*, 2005; Garland *et al.*, 2007).

En relación al carcinoma hepatocelular, bajos niveles de calcidiol se han asociado tanto con una mayor incidencia de este tipo de cáncer como con una mayor mortalidad de los pacientes (Fedirko *et al.*, 2014; Finkelmeier *et al.*, 2014).

A pesar de la evidencia disponible acerca de la asociación entre la deficiencia de calcidiol y un mayor riesgo de contraer diferentes tipos de cáncer, aún no existe un consenso general acerca de cuáles son los niveles circulantes óptimos de este metabolito, aunque la mayoría de los estudios define a los mismos como aquellos superiores a 30 ng/ml (Feldman *et al.*, 2014; Holick, 2007). A su vez, hay que considerar que estos niveles pueden verse alterados por polimorfismos genéticos. Estudios llevados a cabo para identificar genes asociados con deficiencias en calcidiol establecieron la existencia de SNPs (del inglés **Single Nucleotide Polymorphisms**) en varios genes que influyen sus niveles circulantes (Anderson *et al.*, 2013; Shui *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010). Dentro de ellos se encuentran los que codifican la proteína de transporte DBP (polimorfismos en GC), la enzima 7-dehidrocolesterol reductasa (gen *DHCR7*) que determina la presencia del precursor 7-dehidrocolesterol y la enzima 25-hidroxilasa (gen *CYP2R1*).

3.2. Efectos del calcitriol sobre los sellos distintivos del cáncer

Los ensayos preclínicos llevados a cabo en líneas celulares y en modelos animales de cáncer permitieron demostrar las diferentes acciones antineoplásicas del calcitriol. A continuación se presentarán los principales efectos del metabolito activo sobre los sellos distintivos del cáncer.

3.2.1. Calcitriol y sus efectos sobre la proliferación celular

La proliferación celular requiere el paso de las células a través de una secuencia de eventos que conducen a su replicación. Este proceso se encuentra estrictamente regulado en células normales y su descontrol puede resultar en eventos patológicos como el cáncer. De hecho, la progresión del ciclo celular está regulada por ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La actividad catalítica de las CDKs, a su vez, está controlada por Inhibidores de CDKs (CKIs), tales como los miembros de la familia Cip/Kip, también conocidos como genes supresores de tumores.

El efecto anti-proliferativo del calcitriol fue inicialmente descrito por Colston y col. en 1981 en células de melanoma (Colston *et al.*, 1981). A partir de aquí, numerosos estudios han corroborado la actividad anti-proliferativa del calcitriol en una amplia variedad de células no malignas y cancerosas, comenzando a llamar la atención de los investigadores del campo de la oncología (Christakos *et al.*, 2015; Krishnan & Feldman, 2011; Artaza *et al.*, 2010; Deeb *et al.*, 2007; Bouillon *et al.*, 2006). El calcitriol inhibe la proliferación celular utilizando diferentes mecanismos que dependen del tipo celular y su contexto. Se ha visto que provoca arresto del ciclo celular en la fase G0/G1 mediante inhibición directa de ciclinas, como de las ciclinas D1 y D3, por reclutamiento de co-represores en los VDRE del promotor de estos genes, o reducción de la actividad de CDKs por aumento de la expresión de los CKIs, tales como p21 y p27 (Christakos *et al.*, 2015; Picotto *et al.*, 2012). El calcitriol regula directamente la transcripción de p21 y para el caso de p27 la hormona es capaz de inducir su síntesis y / o reducir su degradación. Como consecuencia de su acción sobre las CDKs y/o CKIs, el factor de transcripción E2F se mantiene unido a la proteína de retinoblastoma Rb, lo que impide la

transcripción de sus genes blanco. También el calcitriol provoca efectos anti-proliferativos mediante la estimulación de las vías de señalización que se desencadenan a partir de TGF- β R ya que la hormona mediante su unión a VDR aumenta la transcripción tanto del ligando TGF- β (factor de crecimiento transformante β) como del receptor (Pereira *et al.*, 2012; Davis & Milner, 2011). Además, el metabolito activo reprime la expresión del EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) provocando inhibición del crecimiento celular (Pereira *et al.*, 2012) (**Figura 14**).

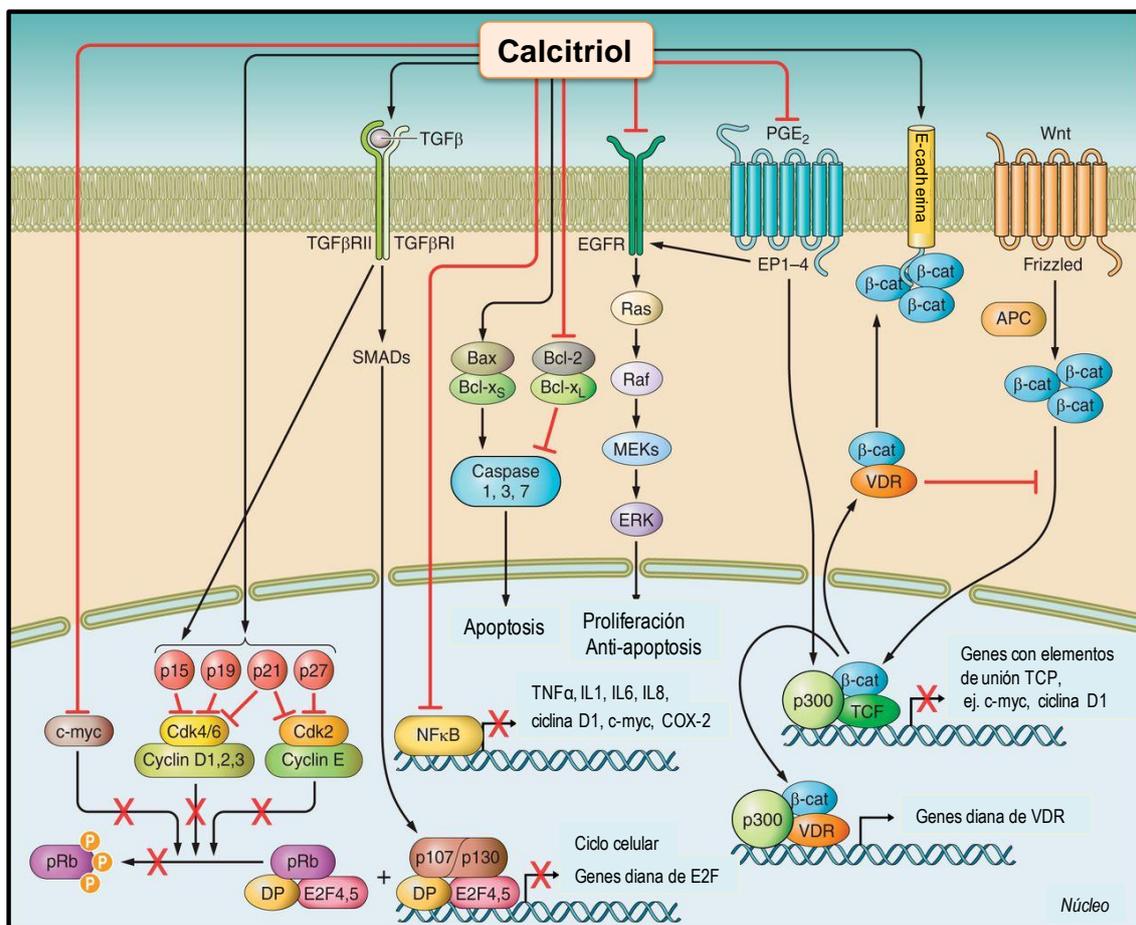


Figura 14. Vías de señalización involucradas en la proliferación celular, apoptosis e inflamación en el cáncer influenciadas por el calcitriol. Tomado y adaptado de Christacos *et al.*, 2015.

Se ha reportado que en células malignas de colon el calcitriol antagoniza la vía de señalización de Wnt / β -catenina mediante tres mecanismos con la consecuencia final de la inhibición de la proliferación celular (Larriba *et al.*,

2013). El calcitriol disminuye la formación de complejos β -catenina / TCF (del inglés *T-cell factor*) en el núcleo al inducir una mayor interacción entre el VDR activado por el ligando y β -catenina en el citoplasma celular. Además, el calcitriol estimula la expresión de E-cadherina que, al aumentar su concentración en la membrana plasmática, recluta una mayor cantidad de β -catenina provocando la disminución de la concentración de esta última en el núcleo. La hormona también induce la expresión del inhibidor de la vía de Wnt denominado Dickkopf (DKK)-1.

Se cuenta con abundante evidencia de la acción anti-proliferativa del calcitriol a través de la *regulación de oncogenes*. Esta hormona reprime transcripcionalmente una gran variedad de oncogenes que pueden diferir según el tipo de tumor. Así, se ha reportado que en células tumorales mamarias (MCF-7, T47D) y de carcinoma de ovario (NIH: OVCAR3) el calcitriol inhibió la expresión de la proteína c-myc en un 50 % en comparación con los controles (Saunders *et al.*, 1993). También, se pudo comprobar una disminución significativa en el ARNm de c-myc y una reducción mucho mayor de la proteína en células de cáncer de próstata, lo que resultó en la inhibición del crecimiento de este tipo de tumor (Rohan & Weigel, 2009). Estos resultados son relevantes teniendo en cuenta que la inactivación de c-myc detiene la progresión tumoral, ya que este oncogén es un regulador positivo del factor de transcripción E2F implicado en la proliferación celular (**Figura 14**). Otro oncogén que es modulado transcripcionalmente por el calcitriol es *FOS*. Tanto *MYC* como *FOS*, contienen VDREs en sus regiones promotoras lo que explica la modulación de la transcripción de estos genes por parte del calcitriol.

Además, un oncogén que participa en la carcinogénesis de múltiples tipos celulares es *KCNH1*, que codifica para el canal de potasio (Eag1) (Camacho, 2006). La sobre-expresión de este oncogén confiere pérdida de inhibición por contacto y favorece la proliferación de las células tumorales, mientras que su inhibición genética o farmacológica impide el crecimiento de las mismas. En este sentido, existe evidencia que muestra que el calcitriol inhibe significativamente la expresión de *KCNH1* en diferentes tipos de células tumorales de mama y cérvix (García-Quiroz *et al.*, 2014; García-Becerra *et al.*, 2010; Avila *et al.*, 2010) debido a la presencia de VDRE en el promotor del gen

KCNH1 (Cazares-Ordoñez *et al.*, 2014). Estos estudios proponen un potencial efecto terapéutico del calcitriol en los tumores que expresen VDR y Eag1.

3.2.2. Calcitriol y sus efectos sobre la inmortalización celular. Relación con la telomerasa

Como se describió al principio de esta introducción una de las capacidades adquiridas de las células cancerosas es la inmortalización celular. Una de las formas en que las células malignas alcanzan la inmortalidad replicativa es a través de la desrepresión de la enzima telomerasa. Su activación se ha observado en ~ 90 % de todos los tipos tumorales humanos (Shay & Bacchetti, 1997); por lo que se supone que la inhibición de su acción o expresión conduciría a la muerte de las células tumorales debido al acortamiento de los telómeros y la consecuente apoptosis. En células de cáncer de próstata y de ovario, el calcitriol reprimió la transcripción de la subunidad catalítica de la telomerasa con actividad de transcriptasa inversa (TERT, del inglés *TElomerase Reverse Transcriptase*), que se tradujo en una disminución de la actividad de la enzima (Zhang *et al.*, 2006; Ikeda *et al.*, 2003). En el mismo sentido, el calcitriol disminuyó los niveles de ARNm de TERT cuando se estimuló la diferenciación de células de leucemia con el metabolito natural (Yamada *et al.*, 2008).

Alternativamente, el calcitriol también puede suprimir indirectamente la expresión de TERT mediante la inducción de micro-ARNs (miARN). Por ejemplo, se han descrito como mediadores de la acción del calcitriol a los genes de miARN-498 que disminuyen la expresión de TERT, inducen la muerte celular y suprimen el crecimiento tumoral (Kasiappan *et al.*, 2012). Este efecto ocurre gracias a que se ha encontrado un VDRE funcional en la región reguladora 5' del gen *MIR498*.

3.2.3. Calcitriol y sus efectos sobre la diferenciación celular

Los primeros investigadores que demostraron una relación entre el calcitriol y la inducción de la diferenciación fueron Abe y col. en células de leucemia mieloide (Abe *et al.*, 1981). Luego se determinó que el calcitriol era

una hormona pro-diferenciante capaz de regular la actividad de más de 60 genes implicados en la diferenciación celular. Por ejemplo, el calcitriol y algunos de sus análogos no-hipercalcemiantes en el carcinoma de colon promueven la diferenciación mediante la inducción de la expresión de proteínas de adhesión, tales como E-cadherina, ocludina y vinculina (Pereira *et al.*, 2012; Pálmer *et al.*, 2001). Estos efectos son potencialmente terapéuticos ya que las proteínas de adhesión mantienen la unión celular favoreciendo la integridad del tejido mientras que su supresión se asocia con la pérdida de inhibición por contacto, la tumorigénesis y metástasis.

Otro ejemplo de los efectos pro-diferenciantes del calcitriol ha sido recientemente descrito en células de cáncer de mama que carecen del receptor de estrógeno α (RE α). En estas células, el calcitriol fue capaz de inducir la expresión de un RE α funcional actuando a través del VDR con la consecuente estimulación de la diferenciación e inhibición de la proliferación celular. La inducción del RE α por calcitriol restauró la respuesta a fulvestrant y tamoxifeno, lo que permitió que estos compuestos ejerzan sus acciones antitumorales como lo hacen en las células que expresan este receptor (Santos-Martínez *et al.*, 2014). Estos resultados son alentadores ya que sugieren una alternativa terapéutica para aquellos pacientes afectados con tumores RE-negativos, mediante la mejora de su sensibilidad a la terapia hormonal.

3.2.4. Calcitriol y sus efectos sobre la muerte celular

Dentro de los tipos de muerte celular se encuentra el proceso de apoptosis, es decir, la muerte celular genéticamente programada. El calcitriol es capaz de modular los mediadores de la apoptosis por diversos mecanismos que favorecen la eliminación de las células malignas. De hecho, el calcitriol reprime la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (del inglés ***B-cell lymphoma 2***) y Bcl-X_L (del inglés ***B-cell lymphoma extra large***), y estimula la de las proteínas pro-apoptóticas Bax, Bak y Bad en diversas células del cáncer (Kizildag *et al.*, 2010) (**Figura 14**). Por otra parte, el calcitriol induce la activación directa de las caspasas efectoras (Trump *et al.*, 2010), ya sea solo o en combinación con fármacos quimioterapéuticos convencionales, tales como

la gemcitabina, comúnmente utilizado para tratar el cáncer de páncreas (Yu *et al.*, 2010).

En el mismo sentido, en cáncer de mama con expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), se demostró un efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico sinérgico entre el gefitinib y el calcitriol o algunos de sus análogos sintéticos. La inducción de la apoptosis fue mediada por la estimulación de las proteínas pro-apoptóticas BIM y la activación de la caspasa 3 (Segovia-Mendoza *et al.*, 2015).

El calcitriol también puede inducir apoptosis por aumento de la concentración de calcio intracelular, la liberación del citocromo c mitocondrial y la reducción de glutatión intracelular (Sergeev, 2005; Weitsman *et al.*, 2005; Ravid & Koren, 2003). Como es sabido, el glutatión es un antioxidante que protege a las células de las ROS (del inglés **Reactive Oxygen Species**), por lo tanto la reducción de glutatión producida por calcitriol favorece la apoptosis. Además, los efectos del calcitriol pueden ser potenciados cuando se combina este metabolito con otras hormonas. En este sentido, se observó que la incubación de células de cáncer de endometrio con progesterona y calcitriol produjo una sobre-expresión de Bax y otras proteínas pro-apoptóticas, conduciendo a inhibición del crecimiento de las células mediante la inducción de la apoptosis y arresto en el ciclo celular (Lee *et al.*, 2013).

Recientemente se ha encontrado un camino alternativo de muerte celular programada independiente de caspasas: la autofagia, un proceso celular que se puede encontrar desregulado en tumores. La autofagia se caracteriza por la formación de autofagosomas, es decir, vacuolas rodeadas por una doble membrana que secuestran citoplasma y organelas para ser digeridas cuando se fusionan con los lisosomas. Se ha demostrado que algunos agentes movilizados de calcio, como el calcitriol, inducen un aumento masivo en el número de autofagosomas en células de cáncer de mama conduciendo de esta manera a la autofagia (Bristol *et al.*, 2012; Høyer-Hansen *et al.*, 2010).

3.2.5. Calcitriol y sus efectos sobre la angiogénesis y la metástasis

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente, evento crucial para el continuo crecimiento, progresión y metástasis de los tumores (Hanahan & Weinberg, 2011). Las células tumorales adquieren la capacidad de inducir la formación de nuevos vasos con el objeto de garantizarse un adecuado suministro de nutrientes y oxígeno, poder invadir el sistema circulatorio y metastatizar en lugares distantes. La neoangiogénesis es una de las características menos deseables en el paciente con cáncer ya que sugiere un mal pronóstico. Este proceso se activa cuando los factores pro-angiogénicos superan a los factores anti-angiogénicos, cuya producción puede estar regulada por oncogenes y genes supresores de tumores. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es considerado como el principal factor pro-angiogénico, mientras la trombospondina-1 (TSP-1) es reconocida como una importante molécula anti-angiogénica (Sousa Moreira *et al.*, 2007; Bocci *et al.*, 2003). Se dispone de una gran cantidad de evidencia que demuestra que el calcitriol inhibe la angiogénesis tanto en líneas celulares como modelos animales de cáncer. Se ha demostrado que el calcitriol inhibe el crecimiento de tumores derivados de células endoteliales (TDEC) y, además, en un modelo animal de este tipo tumoral con ratones *knockout* para VDR se halló un aumento de la expresión en los tumores de HIF-1 α (factor inducible por hipoxia), VEGF, angiopoyetina 1 y factor de crecimiento derivado de plaquetas, lo que sugiere que los efectos anti-angiogénicos mediados por calcitriol en TDEC son dependientes de su receptor (Chung *et al.*, 2009; Bernardi *et al.*, 2002). También se ha probado que el calcitriol incrementa los niveles de ARNm del factor TSP-1 en células de cáncer colorrectal (Fernandez-García *et al.*, 2005), interrumpe la señalización de IL-8 en forma dependiente de NF κ B en cáncer de próstata (Bao *et al.*, 2006) (**Figura 14**) y reduce la expresión de VEGF a través de la represión transcripcional de HIF-1 en células de cáncer de páncreas (Ben-Shoshan *et al.*, 2007). Además, es factible que la hormona regule directamente la transcripción de VEGF puesto que el gen que lo codifica presenta VDRE en su región promotora (Cardus *et al.*, 2009 y 2006).

Sin embargo, y contrariamente a lo recién descrito, también existe evidencia que el calcitriol puede inducir de forma significativa la expresión de VEGF estimulando así la proliferación de células vasculares (Grundmann *et al.*, 2012; Cardus *et al.*, 2009 y 2006; Riboldi *et al.*, 2005; Fernandez-García *et al.*, 2005; Levine & Teegarden, 2004; Lin *et al.*, 2002). En este sentido, se ha reportado que el tratamiento con calcitriol de un amplio panel de células de cáncer de mama con diferentes improntas moleculares inhibió significativamente la expresión de TSP-1 y estimuló la de VEGF, induciendo entonces a un fenotipo pro-angiogénico. En concordancia con estos hallazgos en las líneas celulares, la administración de calcitriol a ratones xenotransplantados con tumores de mama resultó en un aumento significativo de los niveles de VEGF en suero e indetectables de TSP-1 en comparación con los controles (Garcia-Quiroz *et al.*, 2014). Estos hechos, sin embargo, no invalidan el efecto inhibitor del calcitriol sobre el crecimiento tumoral reportado en ratones, indicando que la actividad antineoplásica de la hormona implica diferentes mecanismos que no están necesariamente relacionados con la inhibición de la vascularización del tumor (Diaz *et al.*, 2015). Es probable que, al igual que en otros procesos celulares, el calcitriol pueda inducir o inhibir la angiogénesis en función del tipo celular y de su contexto.

El calcitriol también afecta directamente la cascada metastásica a través de la disminución de la **capacidad migratoria e invasiva** de las células tumorales. Específicamente se evidenció que produce inhibición de metaloproteasas (MMPs), enzimas que juegan un papel importante en la degradación de la MEC y la consecuente migración, invasión y metástasis. Se ha demostrado que el calcitriol disminuye la expresión y actividad de las MMP-2 y MMP-9, a la vez que incrementa la actividad del Inhibidor Tisular de Metaloproteasas 1 (TIMP-1) (Iglesias Gato *et al.*, 2011; Bao *et al.*, 2006; Koli & Keski-Oja, 2000). Asimismo provoca aumento de la expresión integrinas (Bermeo *et al.*, 2001) y de E-cadherina (Beer & Myrthue, 2004), proteínas implicadas en la TEM que las células tumorales sufren durante el proceso invasivo.

3.2.6. Calcitriol y sus efectos anti-inflamatorios e inmunomoduladores

La inflamación crónica de los tejidos se ha descrito como una de las características facilitadoras de la progresión tumoral que contribuye a que las células tumorales adquieran los sellos distintivos del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011). Los mediadores de la inflamación tales como las citoquinas, quemoquinas, prostaglandinas (PGs), ROS y especies reactivas de nitrógeno favorecen la tumorigénesis a través de la activación de múltiples vías de señalización (Allavena *et al.*, 2008; Mantovani *et al.*, 2008). Como es sabido, el funcionamiento del sistema inmune está estrechamente relacionado con el proceso inflamatorio. En este sentido, varios componentes celulares de la respuesta inflamatoria como los macrófagos, especialmente los asociados al tumor, y los linfocitos T y B intervienen en la progresión tumoral. Se ha demostrado que el calcitriol ejerce efectos inmunosupresores al inhibir la activación de los linfocitos T efectores, la producción de citoquinas por parte de estos y al estimular a los linfocitos T reguladores (Adams & Hewison, 2008).

El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) es la principal citoquina pro-inflamatoria implicada en la carcinogénesis inducida por la inflamación por medio de la señalización de STAT3 y NF- κ B (Sethi *et al.*, 2008). Tanto las cascadas de señalización de STAT3 como la de NF- κ B pueden inducir la TEM mediante la regulación negativa de la expresión de marcadores de diferenciación epitelial (Lo *et al.*, 2007; Huber *et al.*, 2005). El calcitriol ha demostrado su capacidad antineoplásica al reprimir estas dos vías de señalización. En este sentido, un análogo de vitamina D de tipo gemini reprimió marcadamente la señalización de CD44-STAT3 demostrando su potencial para inhibir la invasión de células de cáncer de mama (So *et al.*, 2013).

El calcitriol también inhibe la producción de las citoquinas inflamatorias IL-6 y TNF- α en las células malignas (Noyola-Martínez *et al.*, 2013; Bessler & Djaldetti, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Díaz *et al.*, 2009), reprime la expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) implicada en la síntesis de PGs, mientras que sobre-expresa la enzima 15-hidroxiprostaglandina deshidrogenasa que inicia el catabolismo de las mismas (Moreno *et al.*, 2005). Además, el calcitriol ha mostrado estimular a la proteína quinasa activada por mitógenos fosfatasa 5

(MAPK-P5) través de VDR y la consecuente producción de citoquinas pro-inflamatorias (Nonn *et al.*, 2006).

Un efecto reconocido del calcitriol es promover los mecanismos de defensa inmune innatos que incluyen la sobre-expresión de péptidos antimicrobianos tales como catelicidina y DEFB4 (Olmos-Ortiz *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2004). Esto sugiere fuertemente otro mecanismo antitumoral del metabolito activo evitando los procesos cancerígenos relacionados con la inflamación crónica provocada por agentes infecciosos como virus y bacterias.

3.3. Calcitriol y ensayos clínicos

En base a la abundante evidencia preclínica de la acción antitumoral de la vitamina D y sus metabolitos, y desde que el calcitriol fue aprobado por la FDA para el tratamiento de la enfermedad renal crónica y del hipoparatiroidismo, se han llevado a cabo diferentes ensayos clínicos para evaluar los efectos de estos compuestos, ya sea solos o en combinación con otras drogas, en la prevención o tratamiento de distintos tipos de cáncer (Feldman *et al.*, 2014; Woloszynska-Read *et al.*, 2011).

Actualmente, las formulaciones farmacéuticas del calcitriol han demostrado ser inadecuadas para el tratamiento contra el cáncer dado que no poseen una buena biodisponibilidad, presentan una gran variabilidad en cuanto a los niveles séricos alcanzados entre los distintos pacientes (Woloszynska-Read *et al.*, 2011; Muindi *et al.*, 2002) y provocan efectos secundarios tóxicos (Muindi *et al.*, 2005; Beer *et al.*, 2001; Beer & Myrthue, 2004).

Los primeros estudios clínicos fueron realizados en pacientes con síndrome mielodisplásico (SMD) y leucemia mieloide aguda (LMA) (Ferrero *et al.*, 1996; Slapak *et al.*, 1992). Un régimen diario de calcitriol combinado con otras drogas logró los efectos pro-diferenciantes buscados sobre las células sanguíneas y una remisión prolongada de la enfermedad, aunque también se observó hipercalcemia como efecto colateral. Además se realizaron estudios en pacientes con cáncer de próstata. En un ensayo piloto se administró una dosis diaria de calcitriol por vía oral de 1,5 - 2,5 µg y si bien se observó que los niveles de PSA de los pacientes se estabilizaron, no se logró una reducción de

los mismos (Gross *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta este antecedente, se realizaron ensayos clínicos posteriores administrándose dosis orales más elevadas e intermitentes de calcitriol en combinación con docetaxel y dexametasona en pacientes con cáncer de próstata metastático, utilizando la composición de calcitriol DN-101 de Novacea. Tampoco en este caso se obtuvieron los efectos esperados: el ensayo clínico de fase III con 1.200 pacientes (ASCENT-2) resultó en una disminución de la supervivencia total con respecto al grupo control, detectándose además hipercalcemia (Scher *et al.*, 2011; Woloszynska-Read *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos en los ensayos clínicos en los que se ha testado el efecto terapéutico de la vitamina D y sus metabolitos en pacientes con cáncer han sido analizados por diferentes autores y muchos de estos estudios han sido criticados por presentar fallas en el diseño de los mismos. Además, se han generado preguntas que aún continúan sin respuesta, tales como, ¿cuál es la forma óptima de administración de la vitamina D₃ (colecalfiferol o calcitriol)?, ¿cuál es la concentración de calcidiol o calcitriol sanguínea necesaria para obtener los efectos terapéuticos?, ¿cuál es el mejor régimen de tratamiento (continuo o intermitente)?, ¿cuál es la combinación óptima de drogas a utilizar?, ¿en qué momento de la enfermedad comenzar el tratamiento?, ¿cuáles son las características necesarias de la población en estudio? Estas cuestiones todavía no resueltas y que por lo tanto requieren continuar con las investigaciones no permiten descartar totalmente al calcitriol como agente terapéutico en al menos algunos tipos particulares de cáncer.

En cuanto al empleo de estos metabolitos en la prevención del cáncer, actualmente se encuentra en marcha un ensayo clínico denominado VITAL que investiga el efecto de la administración diaria de colecalfiferol (2.000 UI) con ácidos grasos omega 3 (1 gr. de aceite de pescado) en la prevención del desarrollo de cáncer o enfermedades cardiovasculares (Identificación del ensayo clínico: NCT01169259; <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01169259>).

Para tratar de evitar los efectos colaterales del tratamiento del cáncer con calcitriol, especialmente la hipercalcemia, se están desarrollando dos estrategias: i) la combinación de acciones del calcitriol con otras drogas y ii) la

síntesis de análogos de calcitriol con capacidad terapéutica comparable o superiores, pero con menores efectos tóxicos secundarios.

En cuanto a la primera estrategia, algunos de los ensayos clínicos que se están realizando con calcitriol pueden encontrarse en la página web del Instituto Nacional del Cáncer (Institutos Nacionales de Salud, USA): <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Calcitriol+and+cancer&Search=Search> Estos ensayos clínicos combinados de calcitriol y compuestos no citotóxicos, tales como glucocorticoides o taxanos, han demostrado lograr mejores resultados al disminuir la hipercalcemia. Por ejemplo, un ensayo clínico de fase II con pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas tratados con calcitriol, dexametasona y cisplatino mostró una estabilización de la enfermedad sin observarse hipercalcemia como efecto colateral (Ramnath *et al.*, 2013).

A continuación se presenta una breve descripción de la segunda de las estrategias, es decir aquella que utiliza análogos del calcitriol, y de los resultados obtenidos con la misma.

4. Análogos del calcitriol

En la búsqueda de análogos del calcitriol que conserven o incrementen las características antitumorales del metabolito natural pero que carezcan de la actividad hipercalcemiantes, la hormona ha sido objeto de modificaciones en cada una de las partes de la molécula (**Figura 8**), siendo la cadena lateral, y en menor medida el anillo A, los principales sitios donde se han realizado esas modificaciones. Varios de estos análogos han sido probados en ensayos preclínicos obteniéndose, en ciertos casos, resultados promisorios (Leyssens *et al.*, 2013; Mehta *et al.*, 2013). Sin embargo, la respuesta antitumoral obtenida varía considerablemente de acuerdo al análogo y al tipo celular donde es testeado. Esta respuesta diferencial puede tener varias explicaciones: una interacción diferente de cada análogo con la proteína transportadora DBP, o con el receptor VDR nuclear y de membrana, un reclutamiento de diferentes co-moduladores transcripcionales que lleven a reprimir o estimular la expresión de los genes diana en forma particular, o diferencias en el catabolismo de los

compuestos. Las modificaciones estructurales en los análogos del calcitriol pueden afectar esas interacciones y, en última instancia, la actividad biológica de dichos compuestos explicando en algunos casos los efectos diferenciales observados. La **Figura 15** ilustra diversas explicaciones para la variabilidad de respuestas producidas por los análogos de vitamina D.

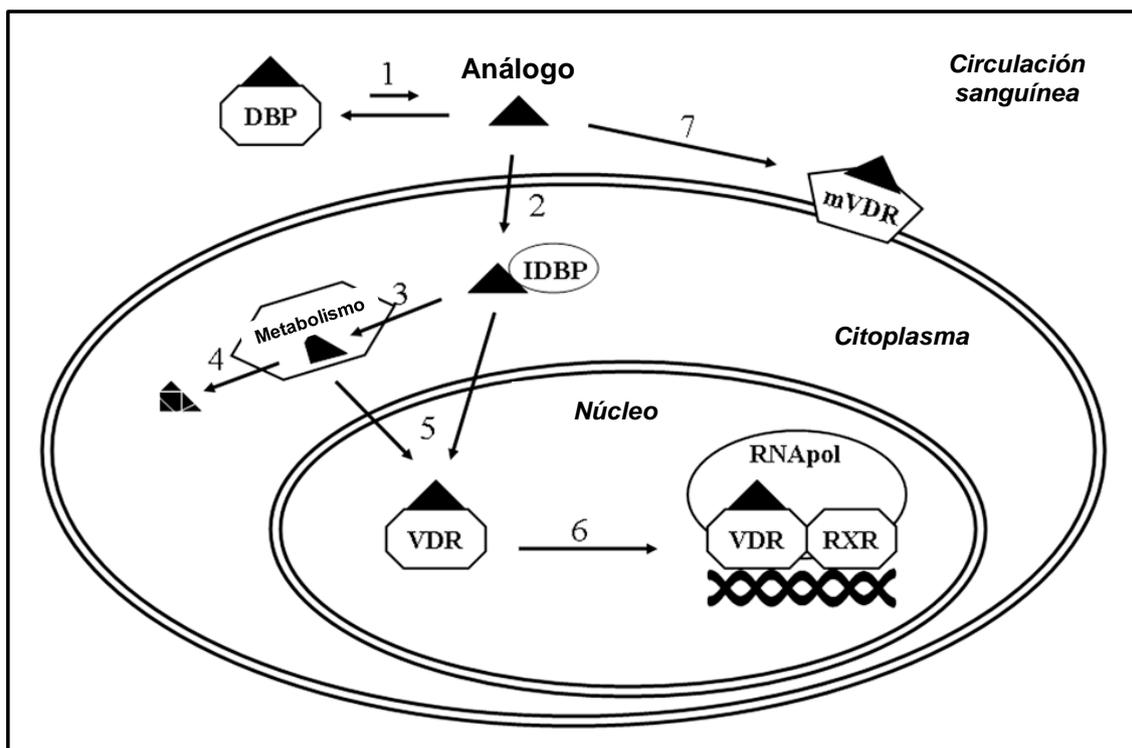


Figura 15. Esta figura muestra puntos del mecanismo de acción del calcitriol que pueden ser responsables de la variabilidad observada en la acción biológica de sus análogos. 1) Unión del análogo a la DBP sérica, 2) Ingreso a la célula, 3) Interacción con proteínas de unión a calcitriol intracelulares (IDBPs), 4) Conversión mitocondrial a metabolitos activos o inactivación catabólica, 5) Interacción con el VDR nuclear, 6) Cambios conformacionales que promueven la interacción con el RXR, DNA y co-moduladores que regulan la transcripción génica, 7) Vía de activación no genómica a través del VDR de membrana. Tomado de Brown & Slatopolsky, 2008.

Se ha reportado que la afinidad del análogo por la proteína DBP puede influenciar en su actividad biológica. Los compuestos con mayor afinidad por la DBP que el calcitriol presentan una mayor vida media circulante. Se ha descrito que análogos con baja afinidad por la DBP y alta por el VDR presentan propiedades antitumorales con menores efectos sobre la homeostasis del calcio, debido en parte, a una alteración en la farmacocinética

del compuesto (Bouillon *et al.*, 1991 y 1996). A su vez, dicha interacción con el VDR puede conducir al reclutamiento de un conjunto particular de cofactores transcripcionales que conduzcan a reprimir o estimular la expresión de los genes diana en forma diferencial. Los estudios computacionales de las diferentes conformaciones adoptadas por el VDR unido a estos ligandos permitieron dilucidar que el LBD - VDR puede acomodar a gran cantidad de moléculas, dando lugar a ligeras diferencias en la conformación de VDR, que a su vez pueden influir en la interacción con los co-activadores y co-represores que median la transcripción por el VDR activado (Carlberg & Molnár, 2006; Rochel & Moras, 2006). Los análogos del calcitriol de tipo gemini constituyen una familia de compuestos que han sido diseñados para aumentar la actividad transcripcional del VDR. Además, el catabolismo diferencial de los análogos también puede jugar un rol muy importante en la variabilidad de la actividad biológica presentada por los mismos. En este sentido, se han diseñado racionalmente algunos análogos que poseen resistencia a su catabolismo, el cual ocurre principalmente por la acción de la enzima 24-hidroxilasa (Salomón *et al.*, 2014). La síntesis de nuevos análogos con estas características resulta importante para su utilización en tipos celulares que poseen una alta expresión de la enzima.

4.1. Análogos del calcitriol y ensayos clínicos

Como ya se ha mencionado, varios análogos del calcitriol han demostrado resultados interesantes en ensayos preclínicos. Algunos de ellos han sido evaluados en ensayos clínicos, ya sea en forma individual o en combinación con los protocolos terapéuticos establecidos (quimioterapia, radioterapia, etc.).

Uno de los análogos del calcitriol que ha sido testeado en estudios de fase I y II es el EB1089 (seocalcitol). Este análogo resultó ser un potente inhibidor del crecimiento tumoral de varios tipos de cáncer en ensayos preclínicos. En concordancia con estos estudios, el análogo presentó resultados promisorios en pacientes con carcinoma hepatocelular (Dalhoff *et al.*, 2003), sin embargo no logró reproducir la respuesta antitumoral en pacientes con cáncer de mama, colorrectal y pancreático (Gulliford *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 2002). A pesar de estos resultados, no se puede descartar las propiedades antitumorales del

análogo debido a las limitaciones de los ensayos clínicos realizados tales como variabilidad en los pacientes en cuanto a la presencia / ausencia del receptor VDR en el tejido tumoral, tratamientos previos, escaso número de pacientes en el ensayo y dosis de análogo administrada.

Otro análogo del calcitriol, el inecalcitol, fue administrado por vía oral a los pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración, en combinación con docetaxel, por un máximo de 18 semanas. Este estudio produjo una tasa de respuesta del 85 % basado en una disminución del PSA a partir de los 3 meses de tratamiento (Medioni *et al.*, 2014). Este compuesto también ha sido probado con éxito en un estudio de fase II con pacientes portadores de leucemia linfocítica crónica en una dosis de 2 mg/ día y como resultado el 52 % de los pacientes experimentaron una estabilización o disminución del recuento de linfocitos leucémicos en sangre. En base a estos antecedentes prometedores, actualmente se está desarrollando un estudio de fase II con pacientes de leucemia mieloide crónica combinando inecalcitol e imatinib oral (página web de Hybrigenics).

El calcipotriol o MC903 es un análogo del calcitriol que también ha sido probado en estudios clínicos. Los ensayos realizados en pacientes con cáncer de mama avanzado con lesiones metastásicas en piel informaron que de un total de 19 pacientes en 15 de ellas el tratamiento tópico con calcipotriol en las lesiones cutáneas metastásicas (100 mg / día durante 6 semanas) causó una reducción de 65 % del diámetro de las mismas, en 3 pacientes se observó una reducción de 50 %, mientras que una paciente mostró una respuesta mínima (Bower *et al.*, 1991). Cabe señalar que sólo 2 pacientes desarrollaron hipercalcemia durante el tratamiento. Este análogo es empleado actualmente en el tratamiento de la psoriasis por lo que se conoce que resulta bien tolerado cuando es administrado por vía tópica (DeLuca & Plum, 2016; Ochaita & Fernández, 2001).

Por último, recientemente se investigaron los efectos antitumorales del análogo ILX23-7553 en 16 pacientes con tumores sólidos avanzados. Si bien no se obtuvo una respuesta objetiva, el análogo resultó bien tolerado y no provocó hipercalcemia a la dosis ensayada (Jain *et al.*, 2011).

En conclusión, los análogos de calcitriol han demostrado poseer potentes efectos antineoplásicos en cultivos celulares y en modelos animales de cáncer, y muchos de ellos están siendo testeados en ensayos clínicos con diferentes resultados. A diferencia de otras drogas empleadas en la quimioterapia, los análogos de la vitamina D no son citotóxicos y por lo tanto, pueden ser adecuados para combinarse con terapias contra el cáncer. Hasta el momento, ningún análogo sintetizado se encuentra dentro de los esquemas de quimioterapia establecidos. Sin embargo, los resultados alentadores de algunos de los ensayos clínicos realizados indican la necesidad de seguir explorando la posibilidad de utilización terapéutica de los análogos del calcitriol. Es por esta razón que, en este trabajo de tesis, hemos evaluado la actividad biológica de un nuevo análogo de calcitriol, de tipo gemini, que ha sido sintetizado en colaboración con un grupo de química orgánica de la Universidad de Vigo (España). Los **análogos tipo gemini** se diferencian respecto al metabolito natural en que presentan una segunda cadena lateral unida al C-20. Tras numerosas modificaciones, se han desarrollado análogos portadores de cadenas laterales extras con enlaces triples, sustituyentes hexafluoros o trideuterometilhidroxi terminales (Pazos *et al.*, 2014). Estas modificaciones han sido posibles debido a las mejoras en los métodos de síntesis para la preparación de estos derivados, lo que permitió aumentar su complejidad molecular y el control de la diastereoselectividad en el C-20 y en las cadenas laterales sustituidas. Diversos análogos tipo gemini han demostrado ser capaces de interactuar con gran afinidad con el receptor VDR y presentar resultados alentadores en numerosos ensayos preclínicos (Shan *et al.*, 2016; Laverny & Metzger, 2015; Okamoto *et al.*, 2014; Wahler, *et al.*, 2014; Maehr *et al.*, 2013; Spina *et al.*, 2007; Uskokovic *et al.*, 1997).

De todos estos antecedentes se deduce que aun continúa siendo importante sintetizar nuevos análogos del calcitriol para que sean evaluados, ya sea solos o en combinación con otros compuestos, como posibles agentes terapéuticos en distintos tipos de cáncer.

HIPÓTESIS

Y

OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO

El calcitriol, la forma hormonalmente activa de la vitamina D₃, posee efectos antitumorales en varios tipos de cáncer y si bien algunos ensayos clínicos realizados a la fecha han aportado resultados alentadores, en la mayoría de los casos se han observado efectos secundarios hipercalcemiantes debido a su clásica acción sobre el metabolismo del calcio. Estos efectos adversos dificultan la administración de la dosis necesaria para lograr una respuesta antitumoral efectiva y por ello es necesario diseñar y sintetizar análogos del calcitriol con el objeto de hallar compuestos que conserven o potencien la actividad antitumoral sin ejercer los efectos secundarios. El laboratorio en el que se desarrolló este trabajo de tesis tiene como una de sus líneas de investigación el estudio de la actividad biológica de varios análogos del calcitriol sintetizados en colaboración con dos laboratorios de química orgánica especializados en su síntesis, con el fin de evaluar su potencialidad terapéutica en el cáncer. El UVB1 es un análogo del calcitriol de tipo gemini, es decir, presenta dos cadenas laterales en el C-20, que ha sido sintetizado en colaboración con el Laboratorio de Química Orgánica de la Universidad de Vigo (España) a cargo del Dr. Yagamare Fall Diop.

Por lo tanto, la hipótesis del presente trabajo de tesis es que el análogo del calcitriol UVB1 ejerce efectos antitumorales con escasa o nula actividad calcémica, y, por lo tanto, puede ser un agente quimioterapéutico potencialmente eficaz para el tratamiento de trastornos hiperproliferativos como el cáncer.

OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo de tesis es estudiar en ensayos preclínicos los efectos antitumorales del análogo del calcitriol UVB1, identificando mecanismos celulares y moleculares responsables de la posible acción antineoplásica, e investigar su actividad calcémica *in vivo*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Visto que el calcitriol o algunos de sus análogos poseen fuertes efectos hipercalcemiantes que dificultan la administración de la dosis necesaria para la acción antitumoral, es importante evaluar la actividad calcémica del nuevo análogo sintetizado simultáneamente con sus características antineoplásicas. Por lo tanto, nos proponemos:

1. Evaluar la actividad calcémica del análogo UVB1 *in vivo*, comparándola con la ejercida por el calcitriol.

2. Estudiar los efectos del UVB1 sobre la viabilidad, migración e invasión celular en distintas líneas tumorales, comparando los efectos producidos por el análogo sobre estos procesos celulares con los provocados por la hormona natural.

El tratamiento quimioterápico puede optimizarse si se conocen las vías o mecanismos de acción de las drogas implicadas. En base a los resultados obtenidos en el objetivo específico 2, nos planteamos:

3. Comenzar a estudiar los mecanismos celulares (proliferación y/o apoptosis) y moleculares involucrados en la acción antitumoral del nuevo análogo.

Debido a que el comportamiento de las células en cultivo puede resultar diferente al de las células cuando se encuentran formando parte integral de los tejidos en el organismo, es aconsejable estudiar también las respuestas a drogas antitumorales observadas en líneas celulares en modelos animales. Por lo cual otro objetivo específico es:

4. Analizar el potencial efecto antitumoral del UVB1 en los modelos animales de cáncer correspondientes, para contrastar los resultados con los efectos antineoplásicos obtenidos en las líneas tumorales.

Conociendo que los efectos antitumorales del calcitriol implican muy a menudo la participación del receptor de vitamina D (VDR), nos proponemos:

5. Analizar mediante el empleo de herramientas bioinformáticas la unión entre el análogo UVB1 y el receptor VDR, comparando las interacciones intermoleculares con las establecidas por el calcitriol.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

1. Calcitriol y UVB1

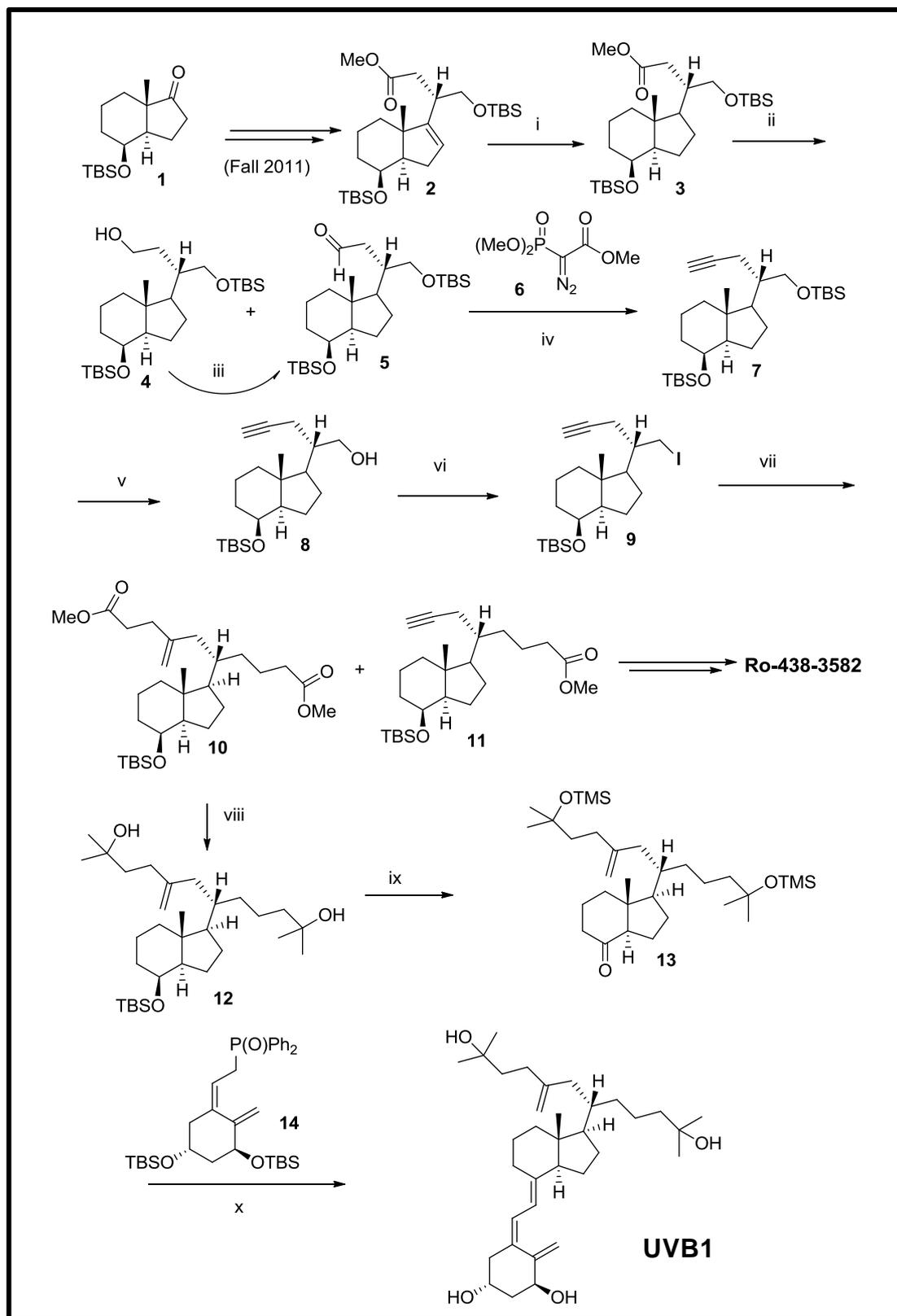
1.1. Síntesis del calcitriol

La síntesis del calcitriol utilizado en esta tesis se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Mouriño y col. (Mouriño *et al.*, 1997) y por Fall y col. (Fall *et al.*, 2000).

1.2. Síntesis del UVB1

La síntesis del análogo UVB1 ha sido publicada en uno de los trabajos científicos generados como parte de esta de tesis (Ferronato *et al.*, 2015). Este análogo se obtuvo a partir de una transformación química clave (un reordenamiento sigmatrópico) que provee una gran versatilidad y selectividad en la síntesis de compuestos tipo gemini (Fall *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2006). El **Esquema 1** muestra la ruta sintética empleada tomando como sustrato de partida la cetona **1** (Fernández *et al.*, 1992), preparada a partir del diol Inhoffen (Gándara *et al.*, 2013) que fue el precursor del alqueno **2** (Fall *et al.*, 2011), el cual fue hidrogenado con Pd/C para obtener el éster **3**. Una reducción Dibal-H del compuesto **3** produjo el alcohol **4**, que por oxidación TPAP produjo el aldehído **5** con un buen rendimiento. El compuesto **5** fue sometido a una homologación Ohira-Bestmann (Müller *et al.*, 1996) para dar el alquino **7**. La desprotección selectiva del grupo hidroxilo primario de **7** proporcionó el alcohol **8** que se convirtió fácilmente en el yoduro **9**. La adición conjugada de níquel al compuesto **9** proporcionó el compuesto esperado, el éster **11** y, sorprendentemente, se obtuvo el diéster **10**. El mecanismo racional de la obtención del éster **10** aún se desconoce. Sin embargo, se continuó con la ruta sintética prevista inicialmente ya que este compuesto podría conducir a un potencial análogo tipo gemini. Exitosamente, se obtuvo posteriormente el análogo denominado UVB1. Así, la reacción de **10** con metil-litio condujo al diol **12**, que se sometió a una desprotección de su grupo hidroxilo, seguido de una oxidación PDC y protección TMS de los grupos hidroxilo de las cadenas laterales, obteniéndose la cetona **13**. La reacción de Wittig-Horner a partir de **13** con el anión derivado del óxido de fosfina **14** (Mouriño *et al.*, 1997;

Daniewski *et al.*, 2002), seguido de la eliminación de los grupos protectores sililo, proporcionó el análogo tipo gemini: **UVB1**.



Esquema 1. Síntesis del análogo UVB1. Reactivos y condiciones: (i) H₂, Pd/C, AcOEt (98 %); (ii) Dibal-H, hexano, (**4**, 73 % y **5**, 20 %); (iii) TPAP, NMO, CH₂Cl₂ (90 %); (iv) **6**, K₂CO₃, MeOH, 0 °C (61 %); (v) TBAF, THF (99 %); (vi) I₂, PPh₃, Im, THF (77 %); (vii) metilacrilato, NiCl₂ · 6H₂O, Zn, Pyr (**10**, 40 % y **11**, 42 %); (viii) MeLi, THF (99 %); (ix) a) TBAF, THF; b) PDC, CH₂Cl₂; c) TMS-Im (64 %, 3 pasos); (x) a) **14**, *n*-BuLi, THF, -78 °C, b) TBAF, THF (70 %, 2 pasos).

El análogo UVB1 y el calcitriol fueron purificados por sucesivas cromatografías preparativas en placa. La pureza se determinó mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ¹H y ¹³C, y por HPLC analítico (> 95 %).

1.3. Preparación de la solución madre de calcitriol y análogo UVB1

El calcitriol y su análogo fueron resuspendidos en isopropanol (vehículo de las drogas) de calidad HPLC (Sintorgan, SIN-026008-01). Se protegieron de la luz, se gasearon con N₂ y se conservaron a -20 °C en viales de vidrio.

Para la determinación de la concentración de las soluciones madre de calcitriol y análogo se utilizó la técnica analítica de espectrofotometría UV-Visible. Dado que el sistema triénico conjugado del calcitriol, y sus análogos, le confiere la característica de absorción de luz UV, la concentración de las soluciones fue determinada por espectrofotometría. El coeficiente de extinción molar (ϵ) de la vitamina D es de 18.300 M⁻¹ cm⁻¹ (λ máxima (λ máx): 264 nm). Por lo tanto, mediante el empleo de la ley de Lambert-Beer se calculó la concentración de la solución madre de calcitriol:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Absorbancia a la } \lambda_{\text{máx}} \times \text{Factor de dilución}}{\epsilon}$$

ϵ

Para el análogo UVB1 se calculó el ϵ mediante la realización de una curva de calibrado. Se prepararon soluciones del análogo de diferentes concentraciones, se midieron en el espectrofotómetro Jasco V-630 entre un rango de longitudes de onda de 200 y 300 nm, determinándose para cada una de ellas el valor de absorbancia a la λ máx. Se construyó un gráfico representando los valores de absorbancia en el eje de las ordenadas y los de concentración en el eje de las abscisas (**Figura 16**). Se trabajó con la

precaución de respetar la zona de cumplimiento de la ley de Lambert-Beer (la absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración). Se calculó gráficamente el valor de ϵ a partir de la curva de calibrado, que corresponde a la pendiente de la recta. En nuestro caso, el valor de ϵ para el análogo UVB1 fue de $17.434 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda_{\text{máx}}$: 265 nm; **Figura 16**). Luego se calculó la concentración de la solución madre mediante el empleo de la ley de Lambert-Beer.

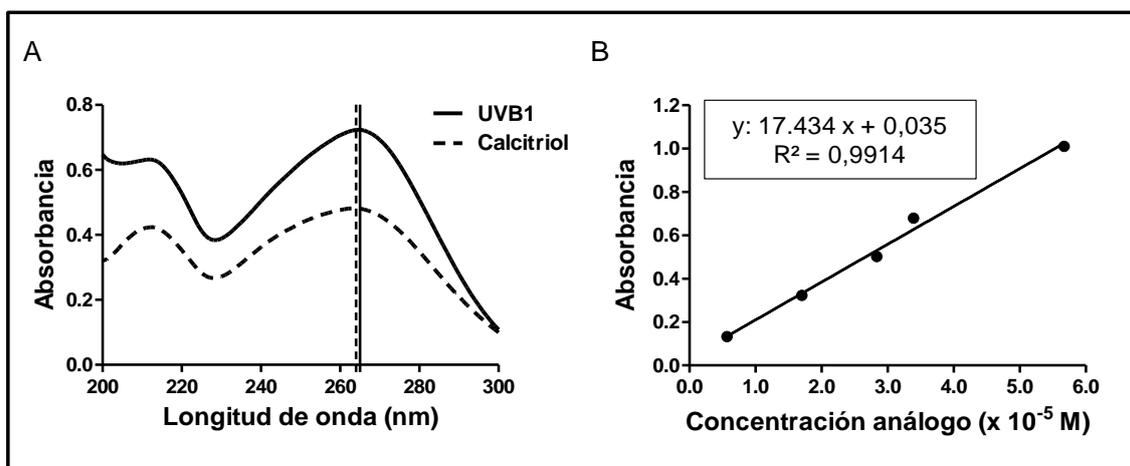


Figura 16. Espectro UV del calcitriol y del UVB1 y determinación del coeficiente de extinción molar (ϵ) para el UVB1. A) La representación de los espectros del calcitriol y del UVB1 muestran las $\lambda_{\text{máx}}$ de los compuestos. B) La pendiente de recta de la curva de calibrado corresponde al ϵ del análogo.

2. Evaluación del calcio plasmático en ratones

Se realizó un primer experimento en ratones machos de la cepa CF1 de 8 - 10 semanas de edad y con un peso aproximado de 40 gramos (g). Se utilizaron 5 animales por condición a los cuales se les administró una dosis de $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal de UVB1, calcitriol o vehículo por vía intraperitoneal cada 24 horas (h) por un lapso de 96 h. Se tomaron muestras de sangre para analizar los niveles de calcio plasmático a las 0 h (niveles basales) y a las 24, 48, 72 y 96 h posteriores a la administración de las drogas. Para ello, los animales fueron anestesiados con Acedan[®] (Holliday Scott, Argentina) en una dosis de $0,22 \text{ mg}/\text{kg}$ de peso corporal y posteriormente se colectó sangre del seno retro-orbital utilizando capilares heparinizados. Las muestras se

mantuvieron en hielo hasta su procesamiento. Los capilares se centrifugaron a 5.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos (min), se determinó el hematocrito y se separó la fracción plasmática que fue almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dado que el análogo fue probado en diferentes líneas celulares tumorales humanas, se realizó un segundo experimento en ratones machos N:NIH(S)-*Fox1^{nu}* (nude) de 8 semanas de edad y con un peso aproximado de 20 g. Esta cepa de ratones inmunosuprimidos es ampliamente utilizada en la realización de xenotransplantes con células tumorales humanas. Se utilizaron 8 ratones por condición que fueron inyectados vía intraperitoneal, tres veces por semana, con una dosis de $40\text{ }\mu\text{g/kg}$ de peso durante un período de tiempo de 30 días. Se recolectó la sangre al comienzo (basal) y al final del tratamiento y se separó y almacenó el plasma de la forma anteriormente descrita.

En ambos ensayos (5 y $40\text{ }\mu\text{g/kg}$ de peso de UVB1) se controlaron signos relacionados con la toxicidad general y que han sido asociados a la hipercalcemia (Hathcock *et al.*, 2007), como son los cambios en el peso corporal, en el comportamiento, aparición de conjuntivitis, escalofríos. En el segundo ensayo, empleando $40\text{ }\mu\text{g/kg}$ de peso de UVB1, se recolectaron hígado y riñones de los ratones para su análisis histológico.

La concentración de calcio plasmático se determinó utilizando el kit colorimétrico Ca-Color Arsenazo III AA kit (Wiener Lab, Argentina), según las indicaciones del fabricante. Se prepararon los tubos de acuerdo a la siguiente tabla (**Tabla 2**):

Tabla 2. Determinación de calcemia	Blanco (B)	Estándar (S)	Desconocido (D)
Agua destilada	10 μl	-	-
Estándar	-	10 μl	-
Muestra a determinar	-	-	10 μl
Reactivo de color	1 ml	1 ml	1 ml

Se incubó la mezcla de reacción durante 5 min a temperatura ambiente (15 – 25 °C) y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 650 nm, llevando el equipo a cero con el Blanco. El calcio plasmático se calculó utilizando la siguiente fórmula:

Calcio plasmático (mg/dL)= Absorbancia del tubo D x F
F (factor): 10 mg/dL (concentración del estándar) / Absorbancia del tubo S

Los niveles de calcio plasmático se consideraron normales en el rango de 8,5 a 10,5 mg/dL (Sharabani *et al.*, 2006; Spina *et al.*, 2005); valores coincidentes con los de calcemia normal en humanos (González *et al.*, 2012). Previa a la determinación del calcio plasmático se calculó el hematocrito para cada ratón, antes y después de los tratamientos, sabiendo que el rango normal del mismo es de 39 – 47 % (Windberger *et al.*, 2003) y que niveles elevados de este parámetro son un signo de intoxicación (OECD, 1995).

3. Cultivo celular

Las líneas celulares utilizadas en los distintos experimentos de esta tesis se describen en la **Tabla 3**. Las células fueron cultivadas en medio DMEM (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma), suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Gibco) en una concentración de 5 % v/v o 10 % v/v según la línea, L-glutamina (5 mM, Gibco), penicilina (Gibco, 100 U/mL) y estreptomycin (Gibco, 100 µg/mL). Las células se mantuvieron a 37 °C bajo atmósfera de 5 % de CO₂.

Las células MDA-MB-231, GL26 y HC11 fueron cultivadas en medio RPMI (del inglés *Roswell Park Memorial Institute Medium*, Sigma) suplementado con 10 % v/v de SFB, L-glutamina (5 mM, Gibco), penicilina (100 U/mL, Gibco), y estreptomycin (100 µg/mL, Gibco). El medio correspondiente a las células HC11 fue suplementado con insulina (5 µg/mL, Gibco). Las células se mantuvieron a 37 °C bajo atmósfera de 5 % de CO₂.

Tabla 3. Líneas celulares	
Líneas de glioblastoma multiforme	
U251	Línea de origen humana.
T98G	Línea de origen humana, ATCC® CRL-1690™.
GL26	Línea de origen murino.
Líneas de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello	
HN13	Línea de origen humana derivada de un tumor primario de lengua.
HN12	Línea derivada de una metástasis en un nódulo linfático originada de un carcinoma de la cavidad oral humano.
Líneas de carcinoma colorrectal humanas	
HCT116	ATCC® CCL-247™.
HCT116 p53 -/-	Línea HCT116 con el gen <i>TP53</i> silenciado.
Líneas celulares mamarias	
LM3	Línea originada a partir de un cultivo primario del adenocarcinoma mamario murino M3 (Urtreger <i>et al.</i> , 1997). No expresa receptores de estrógeno ni de progesterona. Esta línea fue gentilmente cedida por el Instituto de Oncología Ángel H. Roffo.
MDA-MB-231	Derivada de células ascíticas provenientes de un tumor ductal humano triple negativo. Esta línea celular también fue gentilmente cedida por el Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, ATCC® HTB26™.
T47D	Derivada de células ascíticas provenientes de un carcinoma ductal de mama, ATCC® HTB-133™.
HC11	Línea mamaria no maligna, derivada de la glándula mamaria de un ratón hembra BALB/c que se encontraba en gestación. Expresa receptores de estrógeno (Williams <i>et al.</i> , 2009).

4. Ensayos Celulares

4.1. Ensayos de viabilidad celular: conteo en cámara de Neubauer y ensayo de WST-1

La viabilidad celular se evaluó por el método directo de conteo celular en cámara de Neubauer y mediante un método indirecto utilizando el reactivo colorimétrico WST-1 (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno).

Para ello, las células se repicaron de la siguiente manera: se retiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con 5 mL de buffer fosfato salino (PBS) 1X estéril, se descartó el PBS y se agregó 500 μ L de tripsina estéril. Una vez que las células perdieron su adhesión a la placa de cultivo, se frenó la acción de la tripsina por el agregado de 2 mL del medio de cultivo estéril correspondiente a la línea celular. Se homogeneizó la suspensión celular y se cargó 10 μ L de ella por duplicado en la cámara de Neubauer para determinar el número de células presentes por mL de suspensión.

Para realizar los ensayos de viabilidad celular se trabajó con placas de 96 pocillos. Las células fueron sembradas en una densidad de 500 a 2.000 células cada 100 μ L de medio completo por pocillo e incubadas a 37 °C en atmósfera húmeda de 5 % de CO₂. La densidad celular varía en función de la línea en estudio y del tiempo de tratamiento a ensayar. Transcurridas 24 h desde su siembra, se prepararon las concentraciones para realizar los tratamientos celulares (0,01; 0,1; 1; 10; 100 nM) a partir de las soluciones madres de calcitriol, análogo o vehículo. Los tratamientos con cada concentración se realizaron por cuadruplicado. Las drogas fueron renovadas cada 2 días hasta realizarse el conteo celular y el ensayo de WST-1.

Para el recuento celular se removió el medio de cada pocillo, se realizó un lavado con 100 μ L de PBS 1X, se agregó 50 μ L de tripsina y una vez que las células perdieron su adhesión se la inactivó con 50 μ L de medio de cultivo completo. Con una alícuota de 10 μ L de la suspensión se determinó en cámara de Neubauer el número de células presentes por pocillo. Cada ensayo fue repetido tres veces.

Para el ensayo colorimétrico con el reactivo WST-1, las células se trataron de la manera descrita anteriormente y transcurrido el tiempo de tratamiento se removió el medio de cada pocillo, se agregó el reactivo WST-1 diluido en el medio de cultivo correspondiente (1:10) y se realizó una incubación de 1 h a 37 °C y 5 % CO₂. Transcurrido este tiempo, se agitó levemente la placa para obtener una solución de color homogéneo, se extrajeron los 100 µL de cada pocillo y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro Jasco V-630 a 440 nm. Posteriormente las células se lavaron con PBS 1X, se agregaron 50 µL de tripsina y se resuspendieron en 100 µL de medio de cultivo completo. Con una alícuota de 10 µL de la suspensión, se contaron de células en cámara de Neubauer y se calculó el número de células presentes en el pocillo.

La concentración de vehículo utilizada en los ensayos de viabilidad fue como máximo de 0,001 % v/v por pocillo, encontrándose que esta cantidad de alcohol no provocó un efecto significativo sobre la viabilidad de las líneas celulares utilizadas.

Se graficó el número de células contadas o la absorbancia leída, como porcentaje respecto al vehículo (considerado 100 %), en función de la concentración utilizada empleando el *software GraphPad Prism 5*. Los valores de concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de UVB1 o calcitriol para cada línea celular se obtuvieron utilizando la ecuación de dosis - respuesta sigmoidea del programa estadístico *GraphPad Prism 5.00 para Microsoft Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, Estados Unidos)*.

4.2. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

El análisis del ciclo celular fue realizado por FACS (del inglés *Fluorescence-Activated Cell Sorter analysis*). Aproximadamente 1×10^6 células, previamente tratadas con UVB1, calcitriol o vehículo durante 120 h, fueron tripsinizadas y resuspendidas en el medio de cultivo completo correspondiente. La suspensión de células se centrifugó a 2.000 rpm durante 5 min, se lavó el pellet generado con 1 mL de PBS 1X y se centrifugó nuevamente a 2.000 rpm por 5 min. Los nuevos pellets fueron resuspendidos

en 1,5 mL de PBS 1X más el agregado gota a gota de 3,5 mL de etanol 100 % frío para la fijación. Las células se almacenaron a -20 °C durante 24 h como mínimo y por un período no mayor a 15 días. Al momento del análisis, las células resuspendidas en etanol fueron centrifugadas a 2.000 rpm por 5 min, lavadas con 1,5 mL de PBS 1X y nuevamente centrifugadas a 2.000 rpm por 5 min. Finalmente, el pellet obtenido fue resuspendido en 0,5 mL de PBS 1X conteniendo 50 µg/mL de ioduro de propidio (IP) y 100 µg/mL ARNasa A. Se realizó una incubación de 1 h a 37 °C en oscuridad. El IP empleado se intercala en la cavidad mayor de la doble cadena del DNA y produce un aducto altamente fluorescente que puede ser excitado a 488 nm con un ancho de emisión centrado en alrededor de 600 nm. El empleo de ARNasa se debe a que el IP también puede unirse al ARN y por lo tanto es necesario degradarlo para una óptima resolución del ADN. El análisis del ciclo celular se realizó en un citómetro de flujo FACSCalibur usando una longitud de onda de excitación de 488 nm y de emisión de 585 nm. Se empleó un programa para histogramas de deconvolución de la frecuencia del contenido de ADN (*ModFit LT cell cycle analysis software*) y se graficó el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular. Siempre se trabajó por triplicado.

4.3. Análisis de la apoptosis celular

La detección y cuantificación de la apoptosis se realizó mediante el ensayo de TUNEL (*In Situ Cell Death Detection Kit POD*, Roche).

Durante la apoptosis las endonucleasas digieren el ADN genómico en fragmentos de doble hebra de aproximadamente 180 - 200 pares de bases y fragmentos de cadena simple de alto peso molecular. Estos fragmentos de ADN se pueden identificar mediante el etiquetado de los extremos 3'-OH libres con nucleótidos modificados en una reacción enzimática catalizada por una transferasa deoxinucleotidil terminal (TdT).

Para la detección de apoptosis por este método las células HCT116 se sembraron sobre cubreobjetos colocados en placas de cultivo de 35 mm a una densidad de 5×10^4 células por placa. Luego de 24 h, se trataron con vehículo, UVB1 o calcitriol (100 nM) durante 72 h. Se descartó el sobrenadante, las

células se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4 % en PBS 1X durante 60 min a temperatura ambiente, se lavaron con PBS 1X dos veces durante 5 min y se incubaron con la solución de bloqueo (agua oxigenada al 3 % en metanol) durante 10 min. Luego los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS 1X y se recubrieron con la solución de permeabilización (Tritón X-100 0,1 % en citrato de sodio 0,1 %). Las células apoptóticas se detectaron con el kit comercial. Para la cuantificación se tomaron 10 fotos de campos al azar de cada preparado con el microscopio NIKON ECLIPSE TE 2000S. Cada condición se trabajó por triplicado.

4.4. Cuantificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS)

La cuantificación de los niveles de las ROS se llevó a cabo usando la sonda diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCDHF-DA, Sigma; del inglés *5 (o 6)-carboxy-2'7'-dichlorodihydrofluorescein diacetato*). Tras atravesar la membrana plasmática, las esterasas separan el acetato de modo que la diclorodihidrofluoresceína (DCDHF) queda retenida en el interior celular donde puede reaccionar con las ROS para generar la forma fluorescente diclorofluoresceína (DCF).

Se sembraron 5.000 células HN13 por placa de 35 mm y a las 24 h se realizó el tratamiento con el vehículo, UVB1 o calcitriol (100 nM) durante 120 h. Luego las células se lavaron con PBS 1X y se las incubó por 30 min, en oscuridad y a 37 °C con medio de cultivo que contenía 10 µM de DCDHF-DA (D6883, Sigma). Cada placa se lavó tres veces con PBS 1X y se lisaron las células con buffer lisis. Los lisados se sonicaron dos veces por 30 segundos (seg) y se midió la fluorescencia de los lisados en fluorímetro SLM modelo 4800 (SLM instruments, Urbana, IL) a $\lambda_{\text{emisión}} = 590 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{excitación}} = 538 \text{ nm}$. Luego, se cuantificaron las proteínas del lisado y se normalizó la señal de la fluorescencia obtenida con respecto a la cantidad de proteína del lisado correspondiente. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias (UA). Como control positivo de la técnica se trataron células HN13 con agua oxigenada (H₂O₂) al 0,1 % durante 30 min antes de la incubación con la sonda. Se realizaron dos ensayos independientes por triplicado.

4.5. Ensayo de migración celular

Para evaluar la influencia del análogo sobre la migración celular se realizó el ensayo de la herida, también conocido como “*wound healing*” (Petit *et al.*, 2000). Se sembraron las células en placas de Petri de 35 mm de diámetro y se cultivaron por 24 h hasta la formación de una monocapa. Luego se realizó una herida con un tip de 200 μ L dejando al descubierto una sección de la monocapa celular. Se retiró el medio de cultivo y se añadió medio nuevo conteniendo vehículo, UVB1 o calcitriol a una concentración de 100 nM. La herida fue observada con un microscopio invertido NIKON ECLIPSE TE 2000S y fotografiada con una cámara digital Sony Coolpix acoplada al microscopio (200x). Las fotos se tomaron a las 0 h de tratamiento y a intervalos regulares de tiempo que se establecieron en función a cada línea, siempre teniendo la precaución que el ensayo no superara el tiempo de duplicación de la línea celular estudiada. El programa *ImageJ* se empleó para medir el área de la herida para cada condición en los distintos tiempos evaluados. Se realizaron gráficos representando el área de la herida de cada condición y en cada tiempo como porcentaje del área a tiempo 0 h. Se realizaron al menos tres experimentos independientes por duplicado.

4.6. Ensayo de invasión celular

El ensayo de invasión celular consiste en colocar cámaras *transwell*, es decir insertos de membrana de policarbonato (con poros de 12 μ m de tamaño), en una placa de cultivo celular de 24 pocillos. La superficie superior de los insertos es recubierta con una capa uniforme de Matrigel[®]. Las células invasivas son capaces de degradar las proteínas de la matriz del Matrigel[®] y atravesar los poros de la membrana de policarbonato. Finalmente, las células que permanecen en la zona superior son removidas y las que lograron atravesar la membrana (invadir) son teñidas y cuantificadas.

Para realizar este ensayo se colocaron 0,6 mL del medio de cultivo correspondiente en cada pocillo de la placa de cultivo. En cada uno de ellos se colocó el inserto de policarbonato. Luego se agregó 0,1 mL de Matrigel[®] (Becton Dickinson, diluido 1:3 en el medio de cultivo correspondiente libre de

suero) a cada inserto de policarbonato y se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se sembraron las células (LM3: 12.500; HC11: 25.000; HCT116: 20.000 células / pocillo) en la cámara superior de cada inserto, en un volumen final de 0,4 mL de medio completo conteniendo vehículo, UVB1 o calcitriol (100 nM). Luego de la incubación a 37 °C se retiraron los insertos, se lavaron suavemente con 1 mL de PBS 1X, se fijaron en metanol 100 % por 5 min y finalmente se tiñeron con cristal violeta 0,5 % (Sigma) en metanol 20 % por 5 min. Luego se aspiró el cristal violeta, se lavaron los pocillos con agua destilada para quitar el exceso de colorante y las células que habían quedado en la parte superior del inserto se removieron con un hisopo. Las células que atravesaron el inserto hacia la cara inferior de los mismos fueron observadas con el microscopio invertido NIKON ECLIPSE TE 2000S y fotografiadas con una cámara digital Sony Coolpix acoplada al microscopio. Se tomaron 10 fotografías de campos seleccionados al azar y se cuantificaron las células empleando el programa de computación Fiji. Cada condición se trabajó por triplicado.

4.7. Zimografía

Con el objetivo de detectar la actividad proteolítica (gelatinasa) de las MMP-2 y MMP-9 liberadas por las células HCT116, LM3 y HC11 se utilizó la técnica de zimografía. Para la obtención de los medios condicionados las células fueron tratadas con vehículo, UVB1 o calcitriol a la concentración de 100 nM. Se recolectó el medio sobrenadante y las células LM3 y HC11 se lisaron para luego realizar la cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford. Las células HCT116 se cuantificaron mediante empleo de cámara de Neubauer. Los medios condicionados fueron recolectados en frío, centrifugados a 1.500 rpm durante 5 min y almacenados a -20 °C. Para esta técnica se prepararon geles de poliacrilamida como se indica en la **Tabla 4**. Su característica particular es la presencia de gelatina como sustrato y su espesor de 0,75 mm.

Tabla 4. Composición del gel de <i>stacking</i> y del gel de resolución utilizados en la electroforesis del ensayo zimográfico		
Reactivos	Gel de <i>stacking</i> (5 %)	Gel de resolución (10 %)
Gelatina (3 mg/mL)	-	4,15 mL
H ₂ O destilada	5,5 mL	
Tris 1,5 M pH 8,8	-	2,6 mL
Tris 1 M pH 6,8	1 mL	-
Acrilamida/bis-acrilamida 30 %	1,3 mL	3,5 mL
Glicerol 50 %	-	0,0825 mL
SDS 10 %	0,08 mL	0,0825 mL
TEMED	0,008 mL	0,01 mL
APS 10 %	0,08 mL	0,05 mL

Previo a ser sembradas, las muestras de medio condicionado de cada condición experimental fueron resuspendidas en buffer de muestra (SDS 15 %, glicerol 50 % en Tris-HCl 0,4 M, pH: 6,8 conteniendo azul de bromofenol sin 2-mercaptoetanol) en una proporción 1:4 (buffer de muestra: muestra cruda).

La corrida electroforética fue realizada a voltaje constante de 90 V sobre el gel de *stacking* y de 180 V sobre el gel de resolución, durante aproximadamente 90 min. El buffer de electroforesis empleado se detalla en la **Tabla 5.**

Tabla 5. Composición del buffer de electroforesis utilizado en el ensayo zimográfico	
Reactivos	Cantidad empleada
Tris Base	3 g
Glicina	14,4 g
SDS 10 %	10 mL
Agua destilada	c.s 1L

Luego de la corrida electroforética se realizaron dos lavados con buffer de activación enzimática (Tritón X-100 2,5 % en agua destilada) durante 10 min cada uno y en agitación, para eliminar el SDS presente, y un último lavado con PBS 1X para eliminar el Tritón de los lavados anteriores. Los geles fueron incubados durante 24 h a 37 °C con agitación en buffer enzimático (Tris-HCl 50 mM; pH 7,4 conteniendo NaCl 0,15 mM y CaCl₂ 30 mM). Luego, se removió la solución y el gel fue teñido con *Coomasie Brilliant Blue G-250* al 0,1 % en metanol 30 % y ácido acético 10 % hasta que la actividad gelatinolítica fue detectada por la presencia de bandas claras sobre un fondo azul.

Para la identificación de cada banda de degradación correspondiente a las MMP-2 y MMP-9 activas, se utilizaron marcadores de peso molecular estándares comerciales preteñidos, considerando que el peso molecular de las MMPs es de 62 y 82 kDa respectivamente. La intensidad de las bandas fue determinada con un transiluminador y analizadas con el programa de densitometría *ImageJ*. Los datos fueron normalizados con la concentración de proteína total para el caso de las células LM3 y HC11 y con el número de células para el caso de las HCT116. Los resultados fueron presentados como porcentaje respecto al control (considerado 100 %). Se realizaron al menos dos ensayos independientes por triplicado.

4.8. Inmunofluorescencia (IF)

Las células se sembraron en placas de 35 mm de diámetro conteniendo en ellas un cubreobjeto estéril, se incubaron hasta alcanzar una confluencia de 70 % y se trataron con vehículo, UVB1 o calcitriol (100 nM). Luego del tratamiento, las células fueron lavadas tres veces con 1,5 mL de PBS 1X y fijadas con PFA 4 % en PBS 1X durante 1 h a temperatura ambiente. Nuevamente, se realizaron tres lavados con 1,5 mL de PBS 1X y se permeabilizaron las células con Tritón 0,1 % (Sigma) en PBS 1X durante 15 min a temperatura ambiente. Se bloquearon las células con 1 % BSA disuelta en PBS 1X por 1 h y luego se llevó a cabo la incubación con 150 µL de anticuerpo primario en cámara húmeda.

Para la evaluación de los filamentos de actina en células LM3 se utilizó una dilución 1/100 del anticuerpo primario Faloidina-Rodamina en PBS 1X durante 30 min y en los últimos 5 min de incubación se les agregó a las placas 150 μ L de una dilución 1/1.000 del anticuerpo TOPRO para marcar los núcleos celulares. A continuación las células se lavaron 3 veces con PBS 1X durante 5 min. Se sumergieron los preparados en agua destilada, se secaron por unos segundos a temperatura ambiente y se montaron en portaobjetos.

Para la evaluación de la expresión de p27 las células LM3 se incubaron con una dilución 1/100 del anticuerpo primario p27 (BD *Transduction Laboratories*, número de catálogo 610241) en BSA 1 % en PBS 1X durante 1 h. A continuación las células se lavaron 3 veces con PBS 1X durante 5 min y se incubaron en cámara húmeda y en oscuridad con una dilución 1/1.000 del anticuerpo secundario fluoro-conjugado *anti-mouse* Alexa 488 (*Molecular Probes*, Invitrogen) preparado en BSA 1 % en PBS 1X, durante 1 h. Luego las células se lavaron 2 veces con PBS 1X durante 5 min y se realizó un tercer lavado de 5 min con el agregado a las placas de 150 μ L de una dilución 1/1.000 del anticuerpo TOPRO para marcar los núcleos celulares. Posteriormente las células se lavaron 3 veces con PBS 1X durante 5 min, se sumergieron los preparados en agua destilada, se secaron por unos segundos a temperatura ambiente y se montaron en portaobjetos.

Ambas marcaciones, Faloidina-Rodamina y p27, fueron observadas en un microscopio de fluorescencia NIKON ECLIPSE TE 2000S donde se cuantificó la cantidad de células con presencia / ausencia de fibras de estrés o las células con expresión de p27 en 10 campos seleccionados al azar. En un segundo ensayo, los preparados fueron observados en un microscopio confocal (Leica TSP2) y fotografiados (630x).

Para analizar la expresión de E-cadherina, las células LM3 o HCT116 se incubaron con una dilución 1/100 del anticuerpo primario E-cadherina (*Santa Cruz Biotechnology*, sc-7870) en BSA 1 % en PBS 1X durante 1 h. A continuación las células se lavaron 3 veces con PBS 1X durante 5 min y se incubaron en cámara húmeda y en oscuridad con una dilución 1/1.000 del anticuerpo secundario fluoro-conjugado *anti-rabbit* Alexa 566 (*Molecular Probes*, Invitrogen) preparado en BSA 1 % en PBS 1X, durante 1 h.

Posteriormente las células se lavaron 2 veces con PBS 1X durante 5 min y se realizó un tercer lavado con solución de DAPI (1:10.000) en PBS 1X también por 5 min. Se sumergieron los preparados en agua destilada para remover el exceso de DAPI, se secaron por unos segundos a temperatura ambiente y se montaron en portaobjetos. Los preparados fueron observados en el microscopio de fluorescencia NIKON ECLIPSE TE 2000S y fotografiados con una cámara digital Sony Coolpix acoplada al microscopio. Se cuantificaron 10 campos al azar a 400x registrando las células marcadas con E-cadherina y el total de células presentes en el campo. Luego se calculó el porcentaje de células con expresión de E-cadherina en cada condición. Las fotos capturadas fueron procesadas con el programa de computación Fiji.

En cuanto a la evaluación de la expresión de β -catenina, las células HCT116 se incubaron con una dilución 1/100 del anticuerpo primario (*Santa Cruz Biotechnology*, sc-7199) preparado en BSA 1 % en PBS 1X. Luego el protocolo se prosiguió de la misma manera que la descrita para evaluar la expresión de E-cadherina. Se observaron los preparados al microscopio, se registró el número de células totales y con expresión de β -catenina por campo, haciendo una discriminación de su localización celular.

4.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS - PAGE) y *Western Blot* (WB)

4.9.1. Preparación de los lisados celulares

Luego del tratamiento de las distintas líneas celulares con vehículo, UVB1 o calcitriol, se procedió a realizar el lisado celular en hielo. Para esto, se retiró el medio de cultivo de las placas, se realizó un lavado con PBS 1X, se removió completamente todo el líquido y se adicionó 75 - 150 μ L de buffer de lisis (2 % Tris 1 M, 1 % Tritón-X100, EDTA 0,5 M, 2 % NaCl 1 M) al cual se le agregó previamente el cóctel de inhibidores de proteasas en una concentración final de 1X. Se levantaron las células con espátula y se colocaron en tubos eppendorf. La mezcla se dejó reposar durante 30 min en hielo para su lisado completo.

4.9.2. Medición de la concentración de proteínas

Para la determinación de la concentración proteica se confeccionó una curva de calibrado constituida por cantidades crecientes de un estándar de albúmina de suero bovino (BSA) 1 mg/mL en un volumen final de 1 mL de reactivo de Bradford (RB) (BioRad). Se leyeron las absorbancias de los estándares en el espectrofotómetro a 595 nm. Paralelamente, se prepararon las muestras incógnitas por duplicado colocando 2 μ L de muestra en 998 μ L de RB. Sus absorbancias fueron leídas también a 595 nm.

4.9.3. Preparación de las muestras

Se realizaron los cálculos necesarios para llevar el volumen del lisado a la concentración de proteínas deseada con buffer de lisis y buffer de muestra 4X (Tris 1 M 2,4 ml pH 6,8; SDS 0,8 g; glicerol 4 ml; 0,01 g azul de bromofenol; 1 ml 2-mercaptoetanol; agua destilada 2,8 ml). Finalmente se calentó la mezcla en agua hirviendo por 5 min y los lisados se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

4.9.4. Electroforesis

Para la separación de proteínas por peso molecular se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 12 % o 15 % según la proteína de interés. Para ello se prepararon los geles de *stacking* y de resolución como se indica en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Reactivos, con sus respectivas cantidades, empleados para la preparación del gel de *stacking* y de resolución utilizados en la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS - PAGE)

Reactivos	Gel de <i>stacking</i>	Gel de resolución	Gel de resolución
	5 %	12 %	15 %
H ₂ O destilada	6,8 mL	8,2 mL	5,7 mL
Tris 1 M pH 6,8	1,25 mL	-	-
Tris 1,5 M pH 8,8	-	6,3 mL	6,3 mL
Acrilamida/bis-acrilamida 30 %	1,7 mL	10,0 mL	12,5 mL
SDS 10 %	0,1 mL	0,25 mL	0,25 mL
TEMED	0,01 mL	0,01 mL	0,01 mL
APS 10 %	0,1 mL	0,25 mL	0,25 mL

Las muestras a sembrar, se calentaron en agua hirviendo durante 5 min. En una calle se sembró 10 μ L de marcador de peso molecular (*See Blue Plus, Invitrogen*) y en las restantes 50 - 100 μ g de proteínas según el caso a analizar. La separación de proteínas se realizó a amperaje constante de 0,04 A sobre el gel de *stacking* y de 0,06 A sobre el gel de resolución, hasta terminar la corrida. El buffer de electroforesis empleado se detalla en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Composición del buffer de electroforesis (1X)

Reactivos	Cantidad empleada
Tris Base	3 g
Glicina	14,4 g
SDS 10 %	10 mL
Agua destilada	c.s 1L

4.9.5. Transferencia a membrana de PVDF.

Una vez concluida la separación electroforética una de las caras del gel fue apoyada sobre una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF, Millipore), previamente activada con metanol por 1 min. Ambos fueron

colocados entre papeles de filtro previamente humedecidos en buffer de transferencia (**Tabla 8**) y a su vez colocados entre dos esponjas de poro grande y dentro de un soporte plástico. Toda la construcción fue sumergida en la cámara electroforética con buffer de transferencia 1X, orientando la membrana de PVDF hacia el lado anódico. La transferencia se llevó a cabo a 0,3 A constante durante 90 min o 120 min dependiendo del peso de la proteína de interés.

Tabla 8. Composición del buffer de transferencia (1X)	
Reactivos	Cantidad empleada
Tris Base	3 g
Glicina	14,4 g
Metanol	200 mL
Agua destilada	c.s 1L

Finalizada la transferencia, las membranas fueron lavadas con PBS 1X durante 15 min, secadas y guardadas a 4 °C hasta su utilización.

4.9.6. Inmunodetección de proteínas

Las membranas fueron sumergidas en metanol por 1 min para su activación y luego lavadas en PBS 1X. El bloqueo se realizó con leche descremada al 5 % en PBS 1X y en agitación continua durante 30 min. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 5 min cada uno y se procedió a la incubación con el anticuerpo primario a 4 °C y agitación continua durante toda la noche. El anticuerpo primario se preparó en solución de BSA 0,4 % en PBS 1X. Luego se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con *Tween* 0,01 % en buffer Tris salino (TBS) 1X e inmediatamente se incubó la membrana con la dilución adecuada del anticuerpo secundario específico conjugado con peroxidasa de rábano picante. La dilución del anticuerpo secundario se realizó en leche descremada al 5 % en PBS 1X y el tiempo de incubación fue de 90 min en agitación continua a temperatura ambiente.

Finalmente se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con *Tween* 0,01 % en TBS 1X y se procedió a revelar las membranas empleando el reactivo de quimioluminiscencia ECL Plus (GE *Healthcare*) según las especificaciones indicadas por el proveedor. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-ciclina D1 (*Thermo Scientific*, RM-9104-S1), anti-ciclina E (Santa Cruz *Biotechnology*, sc-481), anti-p27^{kip1} (BD *Transduction Laboratories*, cat. 610241), anti-E-cadherina (H-180) (Santa Cruz *Biotechnology*, sc-7870), anti- β -catenina (H-102) (Santa Cruz *Biotechnology*, sc-7199), anti-VDR (C-20) (Santa Cruz *Biotechnology*, sc-1008) y anti-Bax (N-20) (Santa Cruz *Biotechnology*, sc-493). El anticuerpo anti- β -actina (C-11) (Santa Cruz *Biotechnology*, sc-1615) fue usado como control de carga.

5. Modelos animales

Los ratones empleados en los modelos animales realizados fueron adquiridos en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura y humedad, con ciclos diarios de 12 h de luz y 12 h de oscuridad y con libre disponibilidad de alimento y agua. El cuidado y la manipulación de los ratones se realizaron de acuerdo a los lineamientos institucionales de buenas prácticas de trabajo con animales de laboratorio y con la aprobación del protocolo de experimentación por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur.

5.1. Modelo animal de xenotransplante subcutáneo con células de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello HN12

Para la obtención de este modelo se utilizaron 8 ratones N:NIH(S)-*Fox1^{nu}* (nude) machos sanos de 10 semanas de edad y de 25 g de peso promedio. Los animales fueron inyectados en forma subcutánea con 5×10^6 células HN12 (Kawakami *et al.*, 2004) en 100 μ L de medio DMEM libre de suero y antibiótico. El implante de las células se llevó a cabo en el dorso del

animal, empleando jeringas de 1 mL con agujas hipodérmicas (BD) 0,80 x 25 mm (21G). A los 15 días, los ratones presentaban tumores con un diámetro aproximado de 4 mm por lo que fueron divididos aleatoriamente en dos grupos de 4 animales cada uno. Un grupo fue tratado con UVB1 en una dosis de 40 µg/kg de peso y el otro grupo con el vehículo de la droga, ambos compuestos homogeneizados en 50 µL de solución fisiológica. Cada ratón recibió 3 aplicaciones semanales (lunes, miércoles y viernes) administradas subcutáneamente en la periferia del tumor. Antes de cada aplicación se midieron las dimensiones del tumor con un calibre digital para estimar su volumen empleando la fórmula $\pi/6 \times A \times B^2$ (se asume un forma elipsoidal; Geran *et al.*, 1972), siendo A y B las dos dimensiones del tumor. También se registró el peso de cada ratón en estudio y su comportamiento. Luego de 12 dosis recibidas, los animales fueron anestesiados con Ketamina (50 mg/kg) /Acedan (1 mg/kg) aplicándose de manera intraperitoneal para realizar una extracción sanguínea del seno retro-orbital e inmediatamente sacrificados por dislocación cervical. El tumor obtenido por disección de cada animal fue pesado, fotografiado y medido en sus tres dimensiones: diámetro mayor (A), diámetro menor (B) y espesor (C), para calcular su volumen por empleo de la fórmula: $\pi/6 \times A \times B \times C$. El tumor, hígado, riñones y bazo fueron fijados en formol al 10 % en PBS 1X por 24 h para su posterior análisis histológico.

5.2. Modelo animal de transplante singeneico con células de adenocarcinoma mamario LM3

Para la obtención de este modelo se utilizaron 15 ratones BALB/c hembras vírgenes sanas de 9 - 10 semanas de edad y de 20 g de peso promedio. Cada ratón se inyectó en forma subcutánea con 4×10^5 células LM3 en 100 µL de medio DMEM libre de suero y antibiótico. El implante de las células se llevo a cabo en el dorso del animal empleando jeringas de 1 mL con agujas hipodérmicas 21G (BD). Cuando los tumores alcanzaron un tamaño medible con precisión (diámetro menor > 4 mm) los ratones fueron divididos en 2 grupos: experimental (n=7) y control (n=8). Los ratones del grupo experimental fueron tratados con 40 µg/kg de peso de UVB1 colocados en 50 µL de solución fisiológica y el grupo control con el vehículo de la droga. Cada

ratón recibió 3 aplicaciones semanales durante 2 semanas, administradas subcutáneamente en la periferia del tumor. Antes de cada aplicación se midieron las dimensiones del tumor con un calibre digital para estimar su volumen empleando la fórmula $\pi/6 \times A \times B^2$ (se asume un forma elipsoidal; Geran *et al.*, 1972), siendo A y B las dos dimensiones del tumor. También se registró el peso de cada ratón en estudio y su comportamiento. Luego de dos semanas de tratamiento, los animales fueron anestesiados de la manera anteriormente descrita y sacrificados por dislocación cervical. El punto final del ensayo fue condicionado por el tamaño de los tumores y el estado general de los animales. El tumor obtenido por disección de cada animal fue pesado, fotografiado y medido en sus tres dimensiones: diámetro mayor (A), diámetro menor (B) y espesor (C), para calcular su volumen por empleo de la fórmula: $\pi/6 \times A \times B \times C$. El tumor, hígado, riñones y bazo fueron fijados en formol al 10 % en PBS 1X por 24 h para su posterior análisis histológico. Los pulmones de los animales fueron fijados con solución de Bouin para determinar la presencia de metástasis.

5.2.1. Procesamiento de pulmones para cuantificación de metástasis

Al momento de la disección, los pulmones obtenidos de cada ratón fueron fijados en Bouin durante 24 h (**Tabla 9**) (Kim *et al.*, 2011). Luego, se determinó el número de metástasis en la superficie de los lóbulos pulmonares de cada ratón utilizando una lupa Nikon SMZ1500 con cámara digital acoplada (Nikon ACT-1 Versión 2.63) para la adquisición fotográfica.

Tabla 9. Composición de la mezcla fijadora Bouin	
Reactivos	Cantidad empleada
Solución acuosa sobresaturada de ácido pícrico 2 g / 100 mL	700 mL
Formol 40 %	250 mL
Ácido acético glacial (al momento de su utilización)	50 mL

5.3. Modelo animal de xenotransplante subcutáneo con células de carcinoma colorrectal HCT116

Para la obtención de este modelo se utilizaron 12 ratones N:NIH(S)-*Fox1^{nu}* (nude) machos, sanos, de 10 semanas de edad y de 25 g de peso promedio. Los animales fueron inyectados en forma subcutánea con 5×10^6 células HCT116 (Kim *et al.*, 2014) de la misma forma descrita en los modelos anteriores. A los 10 días, los ratones presentaban tumores con un diámetro aproximado de 5 mm, por lo que fueron divididos aleatoriamente en 2 grupos de 6 ratones cada uno. Un grupo fue tratado con UVB1 en una dosis de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso y el otro grupo (control) con el vehículo de la droga, ambos compuestos homogeneizados en 50 μL de solución fisiológica. Cada ratón recibió 3 aplicaciones semanales (lunes, miércoles y viernes) durante 4 semanas, administradas de manera subcutánea en la periferia del tumor. Antes de cada administración de droga se midieron y estimaron las dimensiones del tumor del mismo modo descrito anteriormente. Luego de 12 dosis recibidas, se les extrajo sangre y a continuación los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. El tumor obtenido por disección de cada animal fue pesado, fotografiado y medido tal como se describió en los modelos animales anteriores. Los órganos de los ratones, hígado, riñones y bazo, fueron recolectados para su posterior análisis histológico.

6. Técnicas histológicas

6.1. Procesamiento de órganos y tumores para histología

Los órganos y tumores de los ratones recolectados durante la disección de cada animal, fueron colocados en casetes individuales y sumergidos en formol al 10 % en PBS 1X durante 24 h. Luego fueron lavados bajo agua corriente durante 15 min, escurridos y colocados en concentraciones crecientes de alcohol (70, 96 y 100 %) durante 90 min en cada una para lograr la deshidratación de la pieza. Posteriormente los casetes se colocaron en xilol por 90 min. Transcurrido este tiempo, se escurrieron y colocaron en recipientes contenedores de parafina a 56 °C durante 3 h. Finalmente se armaron los tacos de parafina. Con el material ya incluido, se realizaron cortes de 5 μm de

espesor de cada uno de los tacos empleando un micrótopo Leica RM 2145 y se colocaron sobre los portaobjetos correspondientes.

6.2. Coloración con Hematoxilina - Eosina (H&E)

Los cortes a colorear fueron sumergidos en xilol y se colocaron en estufa a 60 °C por 30 min para remover la parafina. Posteriormente, los cortes de tejido fueron rehidratados mediante su pasaje por una secuencia de soluciones alcohólicas de concentración decreciente (100, 96 y 70 %, 5 min en cada una de ellas). Se realizó un lavado con agua destilada por 5 min y se colorearon con Hematoxilina (**Tabla 10**) durante 15 seg, diferenciando luego el colorante con agua corriente. Posteriormente, los preparados fueron sumergidos en alcohol 80 % por 5 min y coloreados 30 seg con Eosina (**Tabla 10**).

Tabla 10. Composición de la tinción H&E.			
Hematoxilina según Harrys		Eosina	
Hematoxilina	5 g	Eosina amarillenta	1 g
Alcohol 100°	50 mL	H ₂ O destilada	100 mL
Alumbre de K	100 g	Alcohol 96 °	780 mL
H ₂ O destilada	920 mL	Floxina B (1g/100 mL H ₂ O _d)	10 mL
Óxido rojo de Hg	2,5 g	Ácido Acético	4 mL
Ácido Acético	30 mL		

Luego se deshidrataron mediante el pasaje por soluciones alcohólicas crecientes (96 y 100 %, 15 seg en cada una). Finalmente, se colocaron en xilol y se realizó en montaje en medio *Permount* (*Fisher Scientific*). Los preparados fueron observados con un microscopio vertical Olympus CX31 equipado con una cámara fotográfica Lumera Infinity Microscopy USB 2.0.

6.3. Evaluación del índice mitótico (IM)

Para evaluar la proliferación celular, se cuantificó el número de figuras mitóticas en 10 campos al azar en cortes teñidos con H&E. Estas cuantificaciones fueron realizadas en colaboración con el médico especialista en patología Julián Arévalo.

6.4. Inmunohistoquímica (IHQ)

Los cortes de los tumores de los animales se sumergieron en xilol y se colocaron en estufa a 60 °C por 30 min para fundir y remover la parafina. Luego, fueron hidratados mediante su pasaje por una secuencia de soluciones alcohólicas de concentración decreciente (100 y 96 %, 5 min en cada una de ellas). Seguidamente, se realizó un lavado de 15 min en peróxido de hidrógeno 3 % (en alcohol al 96 %) con el fin de eliminar la actividad de la peroxidasa endógena. Los cortes fueron lavados con PBS 1X por 15 min y luego incubados con una solución de BSA 2 % en PBS 1X durante 30 min en una cámara húmeda. Transcurrido el tiempo, se descartó el BSA 2 %, los cortes fueron cubiertos con el anticuerpo primario diluido en BSA 2 % e incubados en cámara húmeda a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, se realizó un lavado de 15 min en PBS 1X y la incubación de los cortes con el anticuerpo secundario disuelto en BSA 2 % durante 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente. Al mismo tiempo se preparó el reactivo AB *Vectastain* (*Vector Laboratories*) en una dilución 1/50 en PBS 1X, dejándolo reaccionar en oscuridad y a temperatura ambiente durante 30 min antes de su utilización. Luego de la incubación con el anticuerpo secundario, los preparados fueron lavados con PBS 1X durante 15 min e incubados con el reactivo AB en cámara húmeda, oscuridad y a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, se realizó un lavado de 15 min con PBS 1 X y se preparó el reactivo de diaminobencidina (DAB, Sigma) de acuerdo a las especificaciones indicadas por el proveedor. Bajo microscopio óptico se agregó 200 µL del reactivo DAB sobre cada pieza de tejido, controlando el desarrollo de la reacción. Finalmente, como coloración de contraste se realizó una tinción con Hematoxilina de Harrys (**Tabla 10**). Los preparados fueron deshidratados

mediante el pasaje por soluciones alcohólicas crecientes (80, 96 y 100 %, 5 min en cada una), se colocaron en xilol y se realizó en montaje en medio *Permount (Fisher Scientific)*. Los preparados fueron observados con un microscopio vertical *Olympus CX31* equipado con una cámara fotográfica *Lumera Infinity Microscopy USB 2.0*.

En todas las IHQ realizadas se trabajó con un control negativo, el cual fue procesado según lo descrito anteriormente, con la salvedad de no haber sido expuesto al anticuerpo primario.

Los anticuerpos primarios empleados fueron: policlonal de cabra anti-Ki-67 (M-19,sc-7846, dilución 1/100), policlonal de conejo anti-p53 (sc-6243, dilución 1/100), policlonal de conejo anti-Bax (N-20, sc-493, dilución 1/100), policlonal de conejo anti-E-cadherina (H-108, sc-7870, dilución 1/100), policlonal de conejo anti- β -catenina (H-102, sc-7199, dilución 1/250) y policlonal de conejo anti-VDR (C-20, sc-1008, dilución 1/100), todos de Santa Cruz *Biotechnology, Inc.*

6.4.1. Evaluación de la inmunomarcación

Para la semicuantificación de las IHQ se trabajó con el *score* inmunoreactivo (IRS) sugerido por Remmele y Stegner (Remmele & Stegner, 1987). El IRS es el producto entre la intensidad de marcación y el porcentaje de las células marcadas. Para la intensidad de la marcación se consideró: 0= negativo, 1= marcación débil, 2= marcación moderada y 3= marcación fuerte; y para el porcentaje de células marcadas se consideró: 0= 0 - 10 %, 1= 11 - 50 %, 2= 51 - 80 % y 3 > 80 %. En todas las IHQ, se determinó el IRS en 10 campos al azar de 400x y se realizó el promedio de los mismos. La expresión de Ki-67 fue evaluada considerando únicamente el porcentaje de células con marcación nuclear. En todos los casos la evaluación de la inmunomarcación fue realizada a ciegas por el médico patólogo Julián Arévalo y dos investigadores de nuestro grupo de investigación.

7. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el *software GraphPad Prism 5* (San Diego California USA). Primeramente, se analizó la distribución normal de los datos de la variable en estudio mediante el test de D'Agostino–Pearson Omnibus. En el caso de seguir una distribución normal, los datos se analizaron con test paramétricos (test de *Student* para comparar dos grupos o ANOVA para comparar tres grupos). En el caso que los datos presentaran una distribución no gaussiana, se utilizaron para el análisis test no paramétricos (test de *Mann Whitney* o *Kruskal Wallis*). Un $p < 0,05$ fue considerado como significativo.

8. Ensayos computacionales

Los ensayos computacionales fueron realizados con la colaboración del Dr. Mario Alfredo Quevedo de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA - CONICET) de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Los estudios bioinformáticos se desarrollaron en base a la estructura cristalográfica del receptor VDR complejoado con calcitriol, tal como se encuentra depositado en la base de datos Protein DataBank (PDB) bajo el código 1DB1 (Rochel *et al.*, 2000). La selección de la estructura del receptor cristalizado para los ensayos computacionales fue realizada teniendo en cuenta la calidad y grado de validación estructural de todos los cristales reportados para el VDR (para una revisión sobre la calidad, el rendimiento y la validación estructural de las estructuras depositadas ver Malinska *et al.*, 2015). Así, la estructura depositada en el PDB por Rochel y col. constituye un modelo lo suficientemente validado.

Mediante el empleo del *software MarvinSketch* (*MarvinSketch v.6.31.*, *ChemAxon Ltd*), se construyeron las estructuras químicas iniciales del calcitriol y del UVB1. Luego se utilizó el *software Gaussian03* (Frisch *et al.*, 2003) para obtener la conformación de mínima energía aplicando métodos semiempíricos (AM1) y *ab initio* (HF/6-311+G*).

Los ensayos de *docking* molecular se realizaron empleando paquetes de *software* desarrollados por *OpenEye Scientific Software*. Los estudios de reconocimiento intermolecular consistieron en tres etapas secuenciales: i) generación de bibliotecas de conformeros de los ligandos estudiados, para lo cual se utilizó un umbral de energía de 10 kcal/mol. Estos estudios conformacionales se realizaron empleando el *software* OMEGA (Omega.2.4.3.; Hawkins & Nicholls, 2012), ii) la ejecución de los estudios de *docking* propiamente dicho se llevó a cabo empleando una exploración rígida exhaustiva, tal como se encuentra implementado en el *software* FRED3 (Fred.3.0.0; McGann, 2011 y 2012), aplicando la función de puntuación *ChemGauss3* para evaluar y clasificar los distintos modos de unión generados. Se consideró la conformación de unión de mínima energía para los análisis posteriores. La etapa iii) implicó la visualización tridimensional y análisis de las interacciones intermoleculares involucradas en el reconocimiento ligando – receptor, las cuales se realizaron utilizando los paquetes de *software* VIDA (VIDA.4.2.1) y LIGPLOT + (Laskowski & Swindells, 2011), respectivamente.

Para la ejecución de los estudios de dinámica molecular (DM), se empleó el paquete de *software* AMBER14 (Salomon-Ferrer *et al.*, 2013; Case *et al.*, 2015). Para llevar a cabo la parametrización del VDR y los ligandos estudiados se utilizaron los campos de fuerza AMBER FF99SB y GAFF, respectivamente (Hornak *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004). Las trayectorias de DM fueron obtenidas por empleo de los complejos logrados por *docking* molecular como estructuras iniciales, solvatadas empleando cajas periódicas de solvente explícito (agua). Para iniciar la simulación, se sometieron los sistemas a dos etapas iniciales de minimización de energía, la primera de ellas efectuada sobre el solvente, y la segunda sobre el sistema completo. Los sistemas minimizados se calentaron a 298 K durante 100 ps, empleando de un paso de tiempo de 2 fs bajo condiciones constantes de presión y temperatura. Luego de la fase de calentamiento, se llevó a cabo una etapa de equilibración (1 ns) y posteriormente las etapas de producción (20 ns). Los análisis estructurales sobre las trayectorias de DM se llevaron a cabo utilizando el módulo de *Cpptraj* de AMBER14, realizando cálculos y análisis de componentes de interacción energética ligandos – macromolecular por empleo

del método de MMPBSA, tal como se encuentra implementado en el módulo MMPBSA.py. (Miller *et al.*, 2012). Las trayectorias de DM resultantes se visualizaron usando el *software* VMD V.1.9 (Humphrey *et al.*, 1996). En todos los casos, las simulaciones de DM se obtuvieron empleando código de simulación basado en arquitectura CUDA (*pmemd.cuda*), empleando infraestructura de cómputo proporcionada por el grupo de computación GPGPU de la Facultad de Matemática y Física de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

RESULTADOS

1. Análisis del efecto del análogo UVB1 sobre los niveles plasmáticos de calcio en ratones

Como hemos mencionado en la sección “introducción”, la síntesis de nuevos análogos del calcitriol tiene como objetivo la obtención de compuestos que posean poca o nula actividad calcemiente con el fin de poder administrar la dosis necesaria para la acción antitumoral sin provocar efectos tóxicos secundarios. Por esta razón, uno de los objetivos planteados para este trabajo de tesis es la evaluación de la actividad calcémica del nuevo análogo de calcitriol UVB1 mediante ensayos *in vivo*.

Por lo tanto, comenzamos estudiando el efecto del análogo UVB1, en comparación con calcitriol, sobre los niveles plasmáticos de calcio en ratones CF1 que fueron inyectados intraperitonealmente con dosis diarias de 5 µg/kg de peso de UVB1, calcitriol o vehículo. Se midieron los niveles de calcio de estos animales a tiempo 0 h (basales) y cada 24 h durante un lapso total de 96 h.

Los valores basales del calcio plasmático fueron de $8,55 \pm 0,57$ mg/dL (**Figura 17**, tiempo: 0 h). Estos valores se encuentran dentro del rango de referencia reportado previamente para ratones (Sharabani *et al.*, 2006; Spina *et al.*, 2005). Asimismo, dicho rango es coincidente con el de los humanos que es de 8,5 - 10,5 mg/dL (González *et al.*, 2012).

La elección de la dosis a inyectar se basó a una revisión bibliográfica de los ensayos farmacocinéticos publicados para el calcitriol. Estos reportes demuestran que el metabolito administrado intraperitonealmente en una dosis única de 0,125 µg/ratón (aproximadamente 5 µg/kg de peso) resulta en una concentración máxima de calcitriol plasmático a las 24 h de 12 ng/mL y en un área debajo de la curva (AUC) de 47 ng.h/mL; siendo esta concentración superior a la necesaria para la acción antitumoral demostrada en modelos murinos (Muindi *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2009; Muindi *et al.*, 2004).

Como se observa en la **Figura 17**, el análogo UVB1 carece de actividad hipercalcemiente a todos los tiempos ensayados con la dosis de 5 µg/kg de peso. Por el contrario, el calcitriol produjo hipercalcemia a partir de las 24 h de

administración, la cual se mantuvo hasta las 72 h. A las 96 h todos los animales habían muerto. Además, registramos un aumento del hematocrito en los ratones tratados con calcitriol (calcitriol: $56 \pm 0,82$ % vs vehículo: $44 \pm 0,19$, $p = 0,0002$; a las 72 h de tratamiento; rango de hematocrito murino normal: 39 - 47 %; Windberger *et al.*, 2003), siendo este aumento un signo intoxicación (OECD, 1995).

La observación visual de los órganos internos de todos los ratones, como hígado, bazo y riñones, no evidenciaron alteraciones morfológicas macroscópicas con ninguno de los tratamientos.

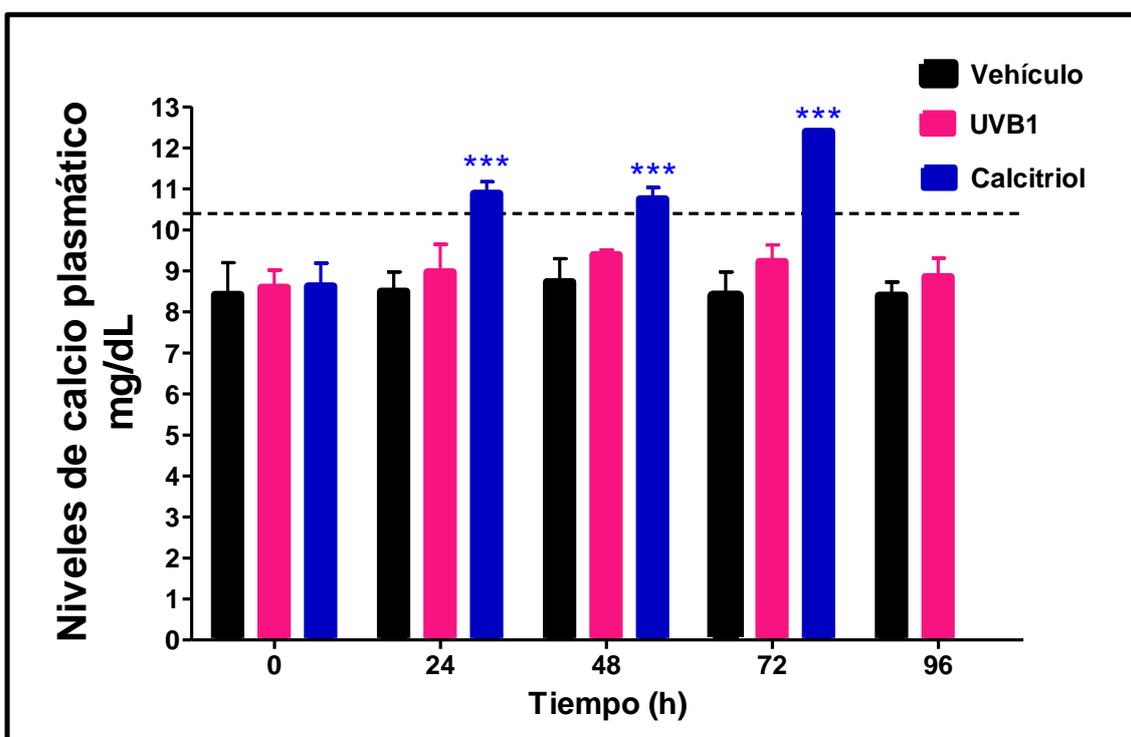


Figura 17. Niveles de calcio plasmático en ratones CF1. Los animales fueron inyectados diariamente con $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal de UVB1, calcitriol o vehículo, por vía intraperitoneal durante un período de 96 h. Se midió el calcio plasmático antes de la inyección de los compuestos (0 h, niveles basales) y a las 24, 48, 72 y 96 h. Los valores correspondientes al tratamiento de 96 h con calcitriol no están disponibles dado que los animales murieron después de las 72 h de tratamiento debido probablemente a la hipercalcemia. Los valores mostrados corresponden al promedio \pm SD de cinco animales en cada grupo. La línea punteada indica el límite superior del rango de calcemia normal. El experimento se repitió dos veces. Se aplicó el test de ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni. *** $p < 0,001$ con respecto al vehículo.

Posteriormente, dado que no se observaron efectos hipercalcemiantes sobre los ratones a los que se les administró el UVB1 en una dosis de 5 µg/kg de peso, y que el análogo presentó resultados interesantes en diferentes líneas celulares tumorales humanas (ver apartado 2 de esta misma sección), nos propusimos evaluar los efectos sobre la calcemia en un segundo ensayo *in vivo* con una dosis más alta de análogo y por un tiempo prolongado en ratones N:NIH(S)-*Fox1^{nu}* (nude). Esta cepa de ratones inmunosuprimidos es ampliamente utilizada en la realización de xenotransplantes con líneas tumorales humanas y fue empleada en modelos animales desarrollados en esta tesis.

En este experimento los ratones fueron divididos en dos grupos de 8 animales cada uno e inyectados con UVB1 o vehículo en una dosis de 40 µg/kg de peso corporal, 3 veces por semana durante un período total de 30 días. Se extrajo sangre antes y al final del período de tratamiento, y los niveles plasmáticos de calcio se midieron según se describió en la sección “Materiales y Métodos”.

Como se muestra en la **Figura 18**, los ratones nude presentaron valores basales normales tanto de calcemia ($8,79 \pm 0,23$ mg/dL) como de hematocrito ($46 \pm 2,63$ %).

El tratamiento de estos animales con esta nueva dosis del análogo no provocó diferencias significativas en la calcemia (UVB1: $9,03 \pm 0,54$ mg/dL vs vehículo: $9,20 \pm 0,60$ mg/dL, $p = 0,579$; **Figura 18A**), hematocrito (UVB1: $44 \pm 2,36$ % vs vehículo: $45 \pm 2,95$ %, $p = 0,365$; **Figura 18B**) y peso (**Figura 18C**). Es de destacar que tampoco detectamos alteraciones histológicas en hígado y riñones (**Figura 18D**). La trama reticular de los hígados de los ratones de ambas condiciones se mantuvo conservada, sin lesiones centrolobulillares; tampoco se evidenciaron glomerulopatías o lesiones vasculares o intersticiales en los riñones.

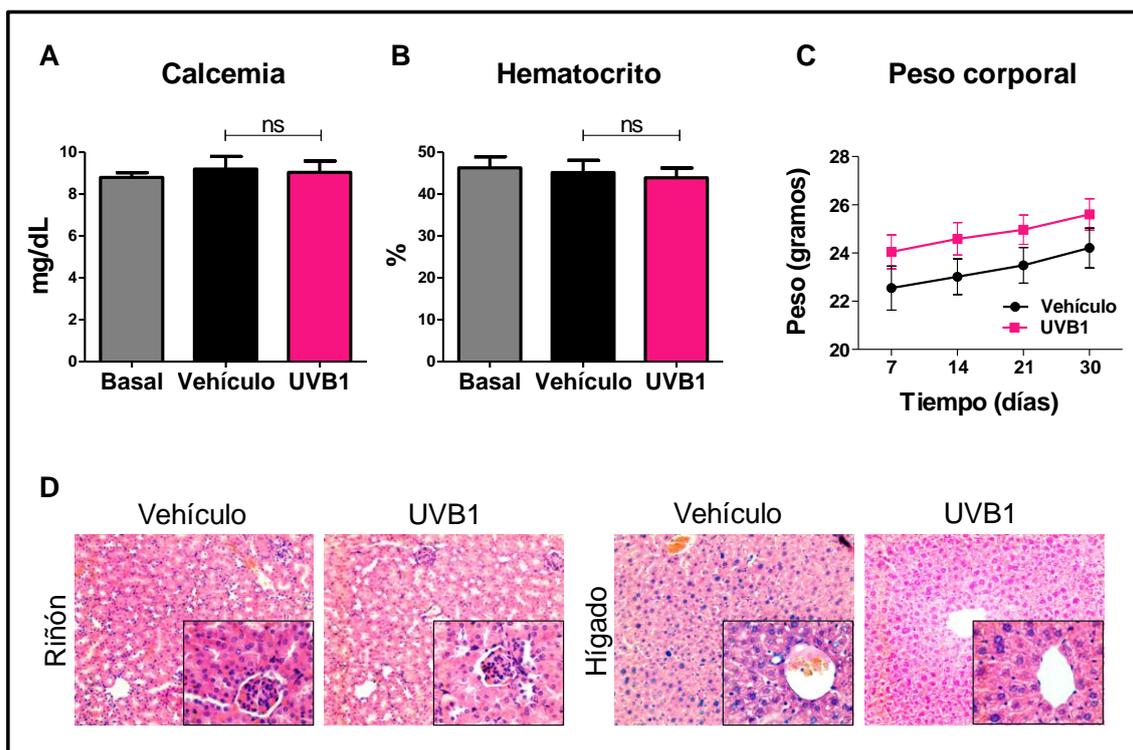


Figura 18. A) Niveles plasmáticos de calcio, B) Hematocrito, C) Peso corporales de los ratones y D) Histología de los riñones e hígado. Ratones N:NIH(S)-Fox1^{nu} (nude) fueron tratados con vehículo o UVB1 a una dosis de 40 μ g/Kg de peso durante un período total de 30 días. Los valores presentados corresponden al promedio \pm SD. Se aplicó el test de *Student* para calcemia y hematocrito y ANOVA de dos vías con posterior test de Bonferroni para el peso corporal. Ns: no significativo. $p > 0,05$. Magnificación: 100x y 400x.

2. Estudio de los efectos antitumorales del análogo UVB1

Los ensayos preclínicos que se realizan para evaluar las propiedades antitumorales de un determinado compuesto incluyen estudios en diferentes líneas celulares y en modelos animales de cáncer, los cuales serán denominados en esta tesis como ensayos *in cultivo* y ensayos *in vivo*, respectivamente.

Uno de los primeros estudios que se llevan normalmente a cabo con el fin de comenzar a evaluar si un determinado compuesto presenta propiedades antitumorales *in cultivo* es la determinación de sus efectos sobre la viabilidad celular de distintas líneas celulares de cáncer. El UVB1 es un compuesto nuevo sintetizado por nuestro grupo de trabajo por lo que no existían antecedentes del tipo tumoral sobre el cuál podría ser efectivo. Por lo tanto, como una primera

aproximación para comenzar a determinar el valor terapéutico del análogo UVB1, evaluamos sus efectos sobre la viabilidad celular en líneas tumorales elegidas al azar entre el amplio panel de líneas celulares disponibles en nuestro laboratorio.

A tal fin, realizamos curvas de concentración y tiempo respuesta para evaluar los efectos del UVB1 sobre la viabilidad celular inicialmente en tres líneas celulares tumorales humanas de diferente estirpe: una línea celular de glioblastoma multiforme U251, una de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello (CCECC) HN13 y una de carcinoma colorrectal (CCR) HCT116. Cabe destacar que estas líneas celulares pertenecen a tres tipos tumorales previamente estudiados por nuestro grupo de investigación.

En esta tesis definimos operativamente a la variable *viabilidad celular* como la proporción de células que sobreviven a alguna situación particular; específicamente aquí se refiere al número de células vivas o viables luego del tratamiento con el compuesto en estudio. Si el número de células hallado en la condición experimental es menor al de la condición control esto podría deberse a que el análogo produjo una alteración en el ciclo celular y/o un incremento de la muerte celular en las células de la línea en estudio.

Para la selección de las concentraciones y los tiempos de tratamiento a utilizar, realizamos una revisión bibliográfica de las concentraciones de acción fisiológicas del calcitriol (Zittermann *et al.*, 2009; Chun *et al.*, 2008) y de análogos probados en ensayos *in cultivo* (Ben-Eltriki *et al.*, 2016; Segovia-Mendoza *et al.*, 2015; Wierzbicka *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2014; Díaz *et al.*, 2000) y decidimos tratar a las células con un rango amplio de concentraciones del análogo UVB1 (0,01; 0,1; 1; 10; 100 nM) y a diferentes tiempos de tratamiento (24, 48, 72, 96, 120 h). Empleamos la técnica de recuento manual en cámara de Neubauer y el ensayo colorimétrico de WST-1, para validar por un método independiente los resultados obtenidos con el recuento celular.

Como se puede observar en la **Figura 19**, el número de células contadas y la absorbancia leída luego del tratamiento con el UVB1 fue menor con respecto al control a partir de las 96 h de tratamiento registrándose un efecto marcado a las 120 h en las tres líneas celulares ensayadas. Por lo tanto,

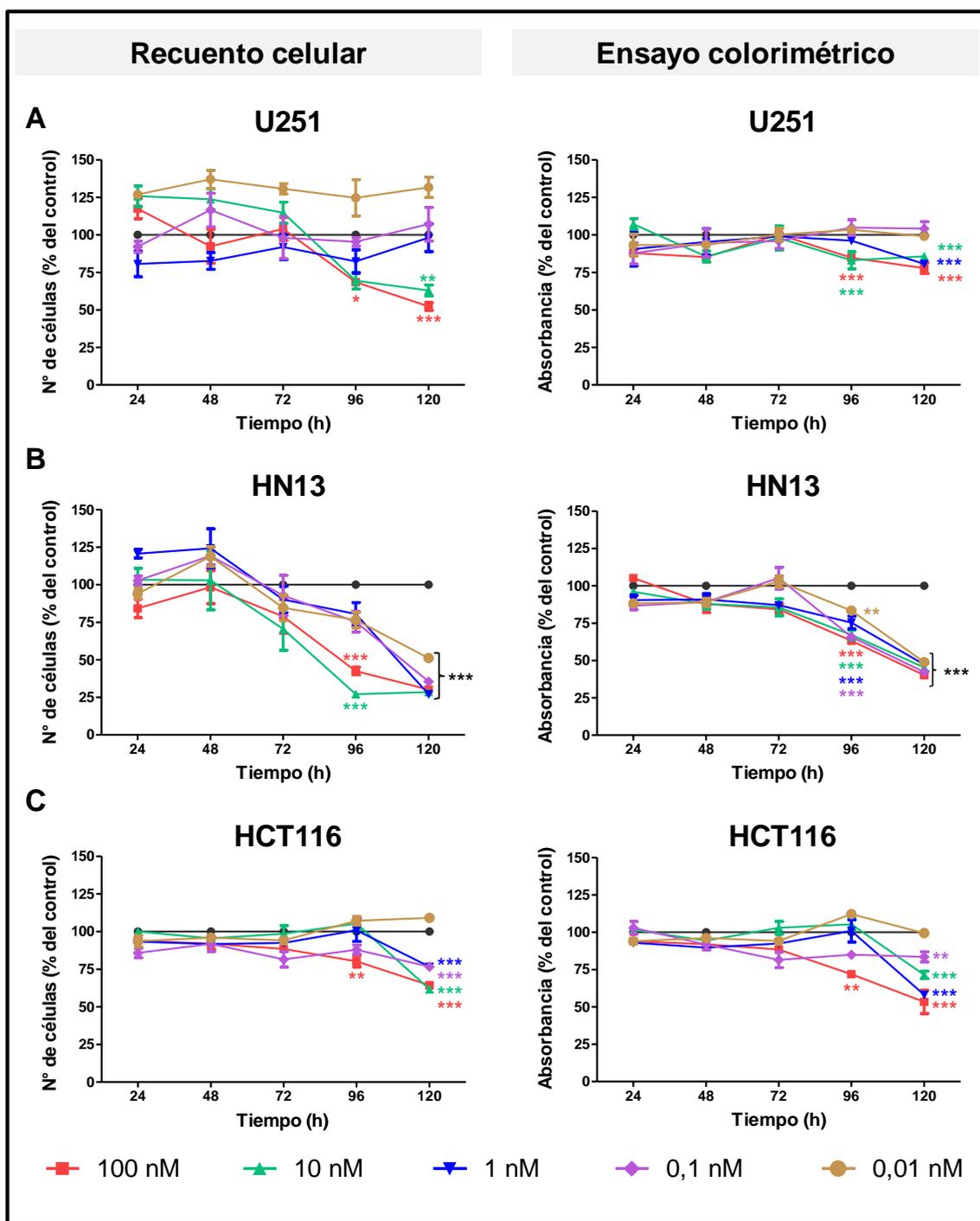


Figura 19. Curvas de concentración y tiempo respuesta para evaluar la viabilidad celular en las líneas tumorales humanas U251, HN13 y HCT116 mediante conteo manual en cámara de Neubauer (panel izquierdo) y ensayo colorimétrico de WST-1 (panel derecho). Las células fueron tratadas con el análogo en las concentraciones de 0,01; 0,1; 1; 10; 100 nM durante 24, 48, 72, 96, 120 h. Cada punto representa la media \pm SEM de al menos dos ensayos independientes. Se aplicó el test de ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

decidimos continuar el estudio del efecto del análogo sobre un panel más amplio de líneas celulares tumorales realizando curvas de concentración - respuesta a 120 h de tratamiento y comparando el efecto del análogo con el ejercido por el calcitriol.

Teniendo en cuenta los resultados anteriormente descritos y la experiencia previa de nuestro grupo de investigación con determinados tipos tumorales, decidimos continuar estudiando los potenciales efectos de este análogo sobre glioblastoma multiforme, carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello, adenocarcinoma mamario y carcinoma colorrectal. Por lo tanto, los resultados obtenidos en las diferentes líneas celulares tumorales serán presentados a continuación en los apartados correspondientes a cada tipo tumoral.

2.1. Evaluación de los efectos antitumorales del análogo UVB1 en células de glioblastoma multiforme

Análisis de los efectos del UVB1 sobre la viabilidad celular en las líneas de glioblastoma multiforme

Tal como se describió, comenzamos evaluando los efectos del análogo sobre la viabilidad celular realizando las curvas de concentración - respuesta a 120 h de tratamiento en las líneas celulares de glioblastoma multiforme GL26, de origen murino, y T98G, de origen humano. Además, se repitió el experimento con la línea U251 (humano), utilizada en el ensayo de viabilidad inicial exploratorio, para comparar los efectos obtenidos entre el análogo y el calcitriol (**Figura 20**). Luego, se calcularon las concentraciones inhibitorias 50 (IC₅₀) para las líneas que respondieron al tratamiento durante 120 h con UVB1 y/o calcitriol (**Tabla 11**).

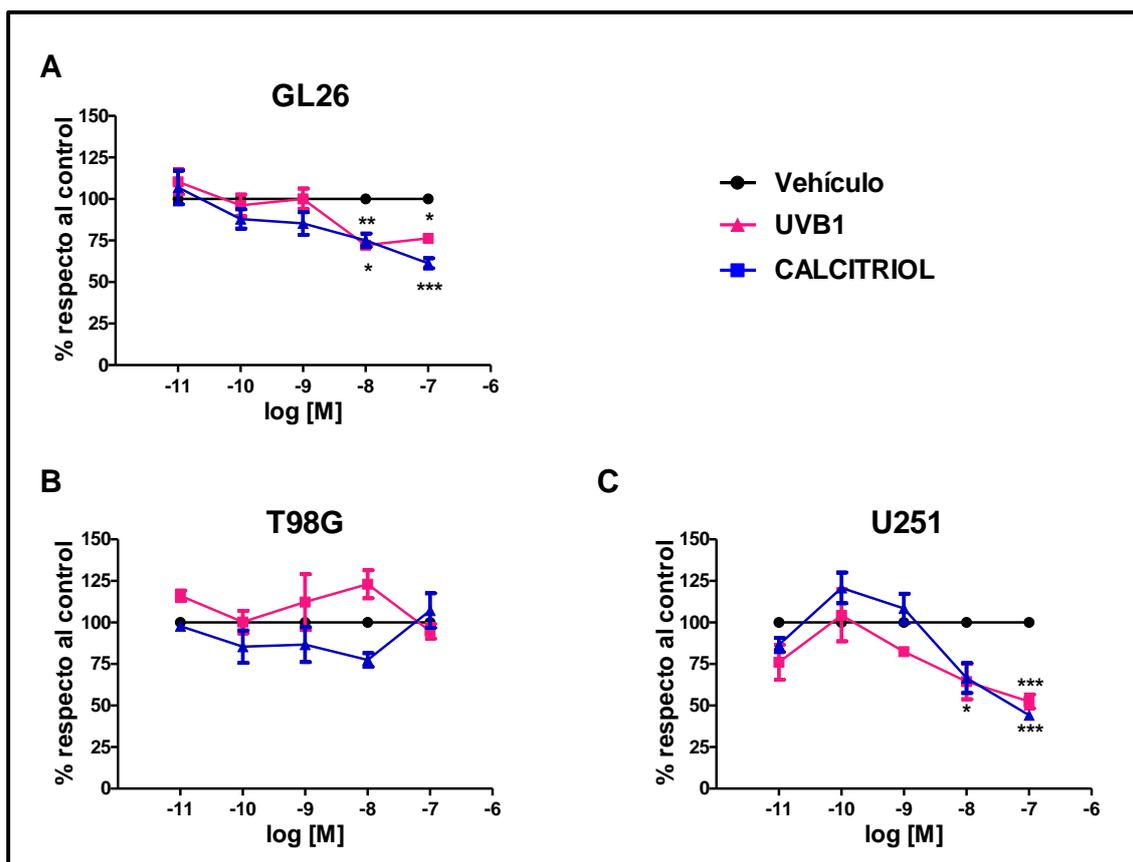


Figura 20. Ensayos de concentración - respuesta para el UVB1 y calcitriol evaluando la viabilidad celular de líneas de glioblastoma multiforme. A) GL26, B) T98G y C) U251. Las células fueron expuestas a las concentraciones indicadas de análogo, calcitriol o vehículo por 120 h. Cada punto representa el promedio de cuatro réplicas de un mismo experimento \pm SD. El ensayo fue repetido 3 veces para cada línea. Se aplicó el test de ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Línea Celular	UVB1	Calcitriol
GL26	2,20	0,76
T98G	-	-
U251	5,61	12,09

IC₅₀: Concentración Inhibitoria 50: concentración de compuesto necesaria para reducir la viabilidad celular al 50 % (nM).

Tabla 11. IC₅₀ de las líneas celulares de glioblastoma multiforme tratadas con UVB1 o calcitriol durante 120 h. Las IC₅₀ corresponden al promedio de los tres ensayos independientes.

Como se muestra en la **Figura 20**, tanto el análogo como el calcitriol disminuyeron la viabilidad celular de la línea murina GL26 (**Figura 20A**) y humana U251 (**Figura 20C**). Por el contrario, ninguno de los dos compuestos

provocó efectos sobre la viabilidad de las células de glioblastoma multiforme humanas T98G (**Figura 20B**). La comparación de las IC_{50} calculadas para cada línea (**Tabla 11**) muestra que el calcitriol es más potente que el UVB1 en la reducción de la viabilidad celular de la línea GL26 mientras que en la línea U251 el análogo presentó un efecto mayor que la hormona natural.

Estudio de los efectos del UVB1 sobre la migración celular

Teniendo en cuenta que existen reportes que indican que el calcitriol y algunos de sus análogos son capaces de modular la capacidad migratoria de las células tumorales (Scaranti *et al.*, 2016; Picotto *et al.*, 2012), decidimos evaluar los efectos del UVB1 sobre la migración celular en estas líneas de glioblastoma multiforme. Para ello, realizamos el ensayo de cierre de la herida o “*wound healing*”.

Cabe destacar que este ensayo tiene el inconveniente que las variaciones en el cierre de la herida pueden deberse a un efecto del compuesto en estudio tanto sobre la migración celular como sobre la proliferación celular. Habiendo demostrado que el análogo produce una disminución de la viabilidad en varias líneas celulares, ya sea de glioblastoma multiforme como de otros tipos tumorales, resultaba importante asegurarse en estos ensayos que el análogo UVB1 afecte realmente la migración celular. Por esta razón, las diferentes líneas celulares se trataron con una concentración de 100 nM del análogo, calcitriol o vehículo durante un tiempo inferior a la tasa de duplicación de las líneas en estudio. Si bien esta cantidad de compuesto corresponde a la concentración más alta empleada en los ensayos de viabilidad celular, en estos últimos no se observaron efectos a las 24 h de tratamiento de las diferentes líneas celulares (**Figura 19**). Dado que los tiempos utilizados en estos ensayos de migración celular son menores a ese lapso, es razonable considerar que lo que se está detectando es el efecto del calcitriol o del análogo solo sobre el proceso de migración celular sin que intervengan modificaciones en la viabilidad de las células.

Como se puede observar en la **Figura 21A**, en la línea de glioma murina GL26, ni el análogo ni el calcitriol provocaron efectos sobre la capacidad

migratoria de estas células a los tiempos estudiados ($p > 0,05$). En relación a la migración celular de las líneas de glioblastoma multiforme humanas que fueron tratadas con el análogo mostraron un comportamiento disímil: las células T98G presentaron una disminución de la capacidad migratoria con respecto al vehículo para el mismo tiempo transcurrido (UVB1 vs vehículo: 16 h: $45,47 \pm 3,65 \%$ vs $13,99 \pm 2,22 \%$, ** $p < 0,01$ - 21 h: $27,76 \pm 5,79 \%$ vs $7,32 \pm 3,57 \%$, * $p < 0,05$; **Figura 21B**), mientras que las células U251 no fueron afectadas por la presencia de UVB1 en el medio de cultivo ($p > 0,05$; **Figura 21C**). Las líneas celulares U251 y T98G tratadas con calcitriol no mostraron diferencias significativas en la migración con respecto al vehículo ($p > 0,05$).

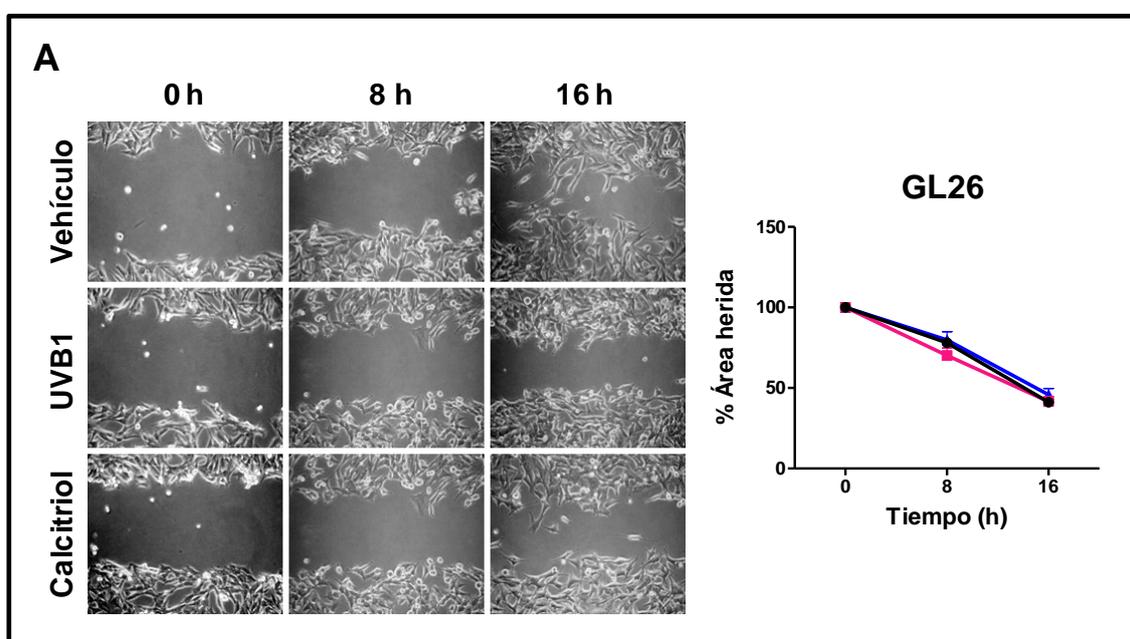


Figura 21. Evaluación de la migración celular luego del tratamiento con UVB1 y calcitriol en líneas de glioblastoma multiforme. A) GL26, B) T98G y C) U251. Las células fueron expuestas a la concentración de 100 nM de UVB1, calcitriol o vehículo por un tiempo menor a 24 h. Se muestran fotos representativas a los distintos tiempos analizados (200x). El gráfico de líneas representa la media \pm SEM del porcentaje descubierto del área de la herida de tres ensayos independientes. Se aplicó el test de ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni, ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

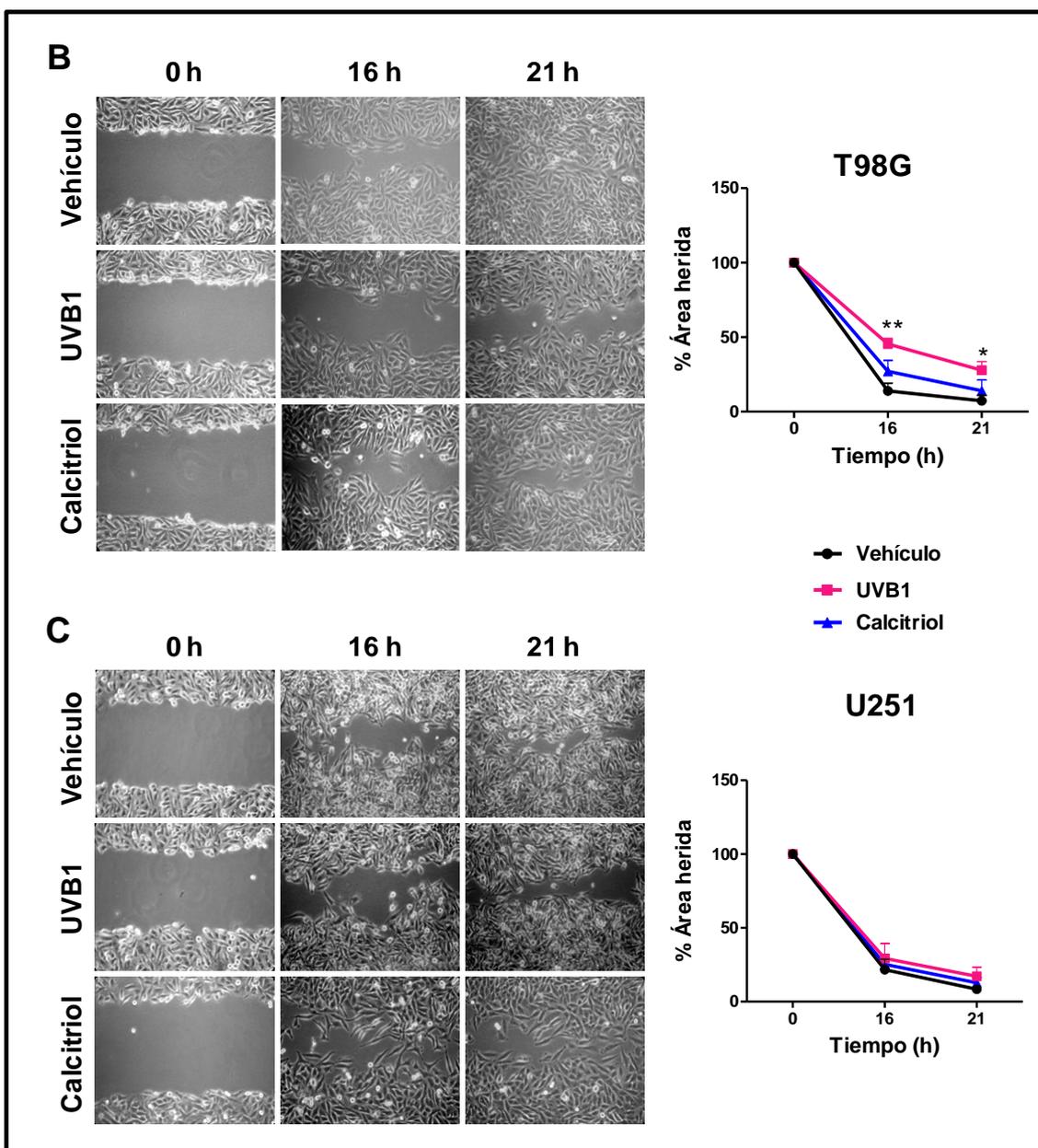


Figura 21 (continuación). Evaluación de la migración celular luego del tratamiento con UVB1 y calcitriol en líneas de glioblastoma multiforme. A) GL26, B) T98G y C) U251. Las células fueron expuestas a la concentración de 100 nM de UVB1, calcitriol o vehículo por un tiempo menor a 24 h. Se muestran fotos representativas a los distintos tiempos analizados (200x) y el gráfico de líneas representa la media \pm SEM del porcentaje descubierto del área de la herida de tres ensayos independientes. Se aplicó el test de ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni, ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Como se puede observar los resultados obtenidos en las líneas celulares de glioblastoma multiforme fueron variables. Por esta razón, y teniendo en cuenta el tiempo de desarrollo habitual de una tesis, los estudios relacionados

a este tipo tumoral, fueron detenidos en este punto con la perspectiva de retomarlos en el futuro próximo.

2.2. Evaluación de los efectos antitumorales del análogo UVB1 en células de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello

Estudio de los efectos del UVB1 sobre la viabilidad celular en la líneas de CCECC

Dado que en el ensayo de viabilidad exploratorio inicial obtuvimos resultados promisorios al evaluar el análogo en la línea celular HN13 y teniendo en cuenta la experiencia del laboratorio en el estudio del CCECC, decidimos iniciar el análisis de los efectos del UVB1 en este tipo tumoral.

Para realizar las curvas de concentración – respuesta a 120 h de tratamiento, las líneas celulares humanas de CCECC HN12 y la línea anteriormente ensayada HN13 fueron sembradas y tratadas con UVB1, calcitriol o vehículo en las concentraciones previamente descriptas.

Como se muestra en la **Figura 22 A y B**, tanto el UVB1 como el calcitriol disminuyeron la viabilidad celular de ambas líneas de CCECC. La comparación de las IC_{50} calculadas a partir de las curvas de concentración - respuesta (**Tabla 12**) indica que el efecto del UVB1 sobre la viabilidad celular de la línea HN12 fue similar al demostrado por el calcitriol (IC_{50} UVB1: 0,071 nM vs IC_{50} calcitriol: 0,084 nM), mientras que en las células HN13, el análogo demostró un efecto más potente que la hormona natural. La IC_{50} del análogo fue significativamente menor con respecto a la del calcitriol (IC_{50} UVB1: 0,0016 nM vs IC_{50} calcitriol: 1,98 nM).

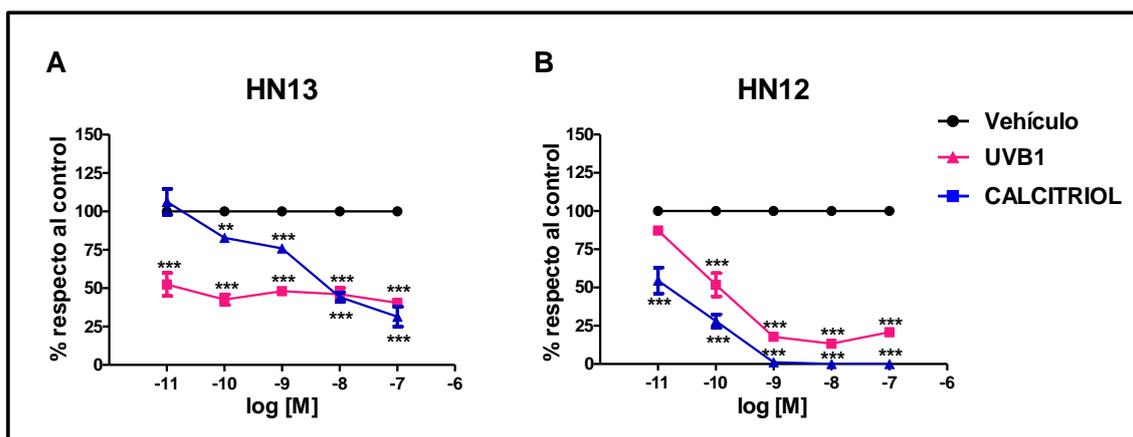


Figura 22. Ensayos de concentración - respuesta para el UVB1 y calcitriol evaluando la viabilidad celular de líneas celulares de CCECC. A) HN13 y B) HN12. Las células fueron expuestas a las concentraciones indicadas de análogo, calcitriol o vehículo por 120 h. Cada punto representa el promedio de cuatro réplicas de un mismo experimento \pm SD. El ensayo fue repetido 3 veces para cada línea. Se aplicó el test de ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Línea Celular	UVB1	Calcitriol
HN13	0,0016	1,98
HN12	0,071	0,084

IC₅₀: Concentración Inhibitoria 50: concentración de compuesto necesaria para reducir la viabilidad celular al 50 % (nM).

Tabla 12. IC₅₀ de las líneas celulares de CCECC tratadas con UVB1 o calcitriol durante 120 h. Las IC₅₀ corresponden al promedio de los tres ensayos independientes.

Debido a la interesante respuesta antitumoral observada con el UVB1 en los ensayos de viabilidad celular en las líneas de CCECC, nos propusimos continuar con los ensayos preclínicos del análogo comenzando a indagar los mecanismos celulares y moleculares implicados en sus efectos.

Para ello, comenzamos evaluando los efectos del UVB1 sobre el ciclo celular de la línea HN13. Dicha decisión respondió al hecho de que se obtuvo una mejor respuesta con el análogo sobre la viabilidad en esta línea celular que en las células HN12 (IC₅₀ HN13: 0,0016 nM vs IC₅₀ HN12: 0,071 nM) y al hecho de que el UVB1 mostró un efecto más potente que el calcitriol en la reducción de la viabilidad de las células HN13.

Análisis de los efectos del análogo UVB1 sobre el ciclo celular de las células HN13

Como es sabido, la progresión del ciclo celular es un evento biológico que se encuentra altamente regulado en las células normales, pero se convierte en un evento aberrante o desregulado en las células neoplásicas. Mientras que las células normales sólo son capaces de abandonar un estado quiescente (reposo) e ingresar en un estado de proliferación activa luego de recibir una señal mitogénica, las células tumorales proliferan descontroladamente tras adquirir autonomía proliferativa e insensibilidad a las señales de salida del ciclo celular (dos capacidades adquiridas) (Hanahan & Weinberg, 2000). En este contexto inhibir la progresión del ciclo celular de las células malignas es una estrategia efectiva para limitar el crecimiento tumoral (Benada & Macurek, 2015). También es conocido que otra de las capacidades adquiridas que las células normales para transformarse en tumorales es la evasión a la apoptosis (Hanahan & Weinberg, 2000).

Teniendo en cuenta lo antedicho decidimos investigar si el potente efecto del UVB1 sobre la viabilidad celular de la línea HN13 se debió a una disminución de la proliferación celular o a un aumento de la apoptosis analizando la distribución de la población de células en las distintas etapas del ciclo celular por citometría de flujo. Para ello las células HN13 pre-tratadas con UVB1 o vehículo se tiñeron con IP y se sometieron al análisis de las distintas fases del ciclo celular según lo descrito en la sección “Materiales y Métodos”. Como se muestra en la **Figura 23**, el tratamiento de las células HN13 con el análogo (100 nM; 120 h) produjo un aumento muy significativo del número de células en fase G0/G1 en comparación con el vehículo (UVB1: $63,10 \pm 0,85$ vs vehículo: $53,33 \pm 3,53$ %; *** $p < 0,001$).

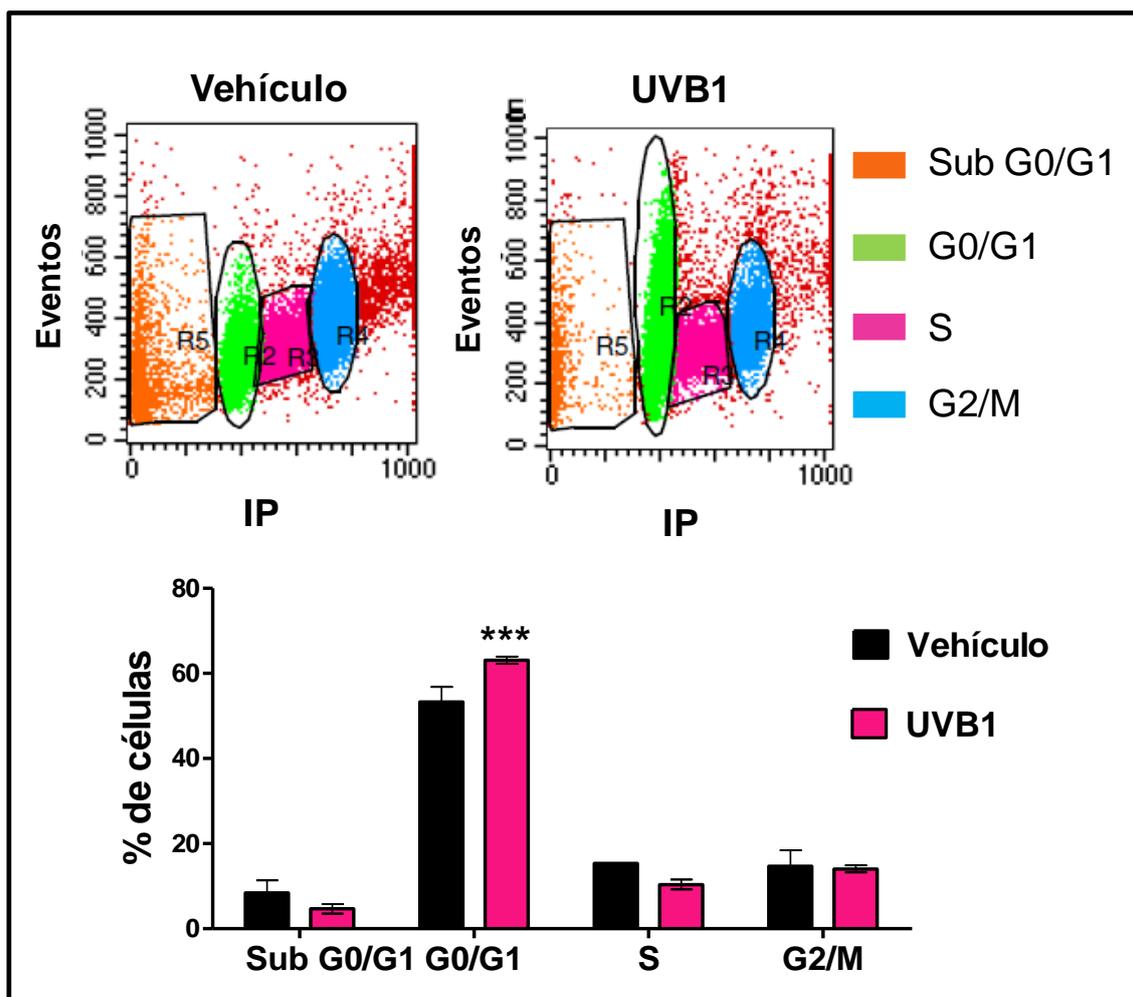


Figura 23. Análisis de la distribución de células HN13 en las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo. Las células fueron tratadas con UVB1 (100 nM) o vehículo durante 120 h. Se muestra la distribución de la población celular analizada por citometría de flujo luego de la tinción con IP. El gráfico de barras representa el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular. El ensayo fue realizado por triplicado. Se aplicó el test de ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni. *** $p < 0,001$.

Estos resultados indican que la disminución de la viabilidad celular inducida por el análogo en estas células se debe a la inhibición de la proliferación a través de un arresto del ciclo celular en G0/G1.

Se ha demostrado que el arresto del ciclo celular se produce frecuentemente como consecuencia de la activación de mecanismos de control de dicho ciclo que se ponen en marcha ante varios estímulos, entre ellos los producidos por el estrés oxidativo (Vicencio *et al.*, 2008). Este último es desencadenante también de la activación de enzimas de biotransformación de fase I y II para tratar de eliminar al agente causante del arresto celular, entre

las cuales se encuentra la enzima Hemo Oxigenasa-1 (HO-1) (Lương & Nguyễn, 2012). En base a estos antecedentes y al hecho de que el calcitriol ha demostrado ejercer sus efectos antitumorales mediante la capacidad de inducir estrés oxidativo por generación de ROS en diferentes líneas celulares (Zhang *et al.*, 2014; Koren *et al.*, 2001) es que nos propusimos determinar los niveles de sustancias oxidantes en la línea HN13 tratadas con el análogo y analizar la expresión de algunas proteínas comúnmente involucradas en el control del ciclo celular, así como también de la enzima antioxidante HO-1.

Para determinar el efecto del UVB1 sobre la producción de las ROS en la línea celular HN13, las células fueron tratadas con el análogo (100 nM, 120 h), luego se incubaron con la sonda DCDHF-DA y se cuantificaron las ROS como se detalló en la sección de “Materiales y Métodos”. Dado que no hay antecedentes de estudios de evaluación de ROS con la sonda DCDHF-DA en líneas de CCECC tratadas con calcitriol, evaluamos los efectos de la hormona natural en la línea HN13 y comparamos los resultados obtenidos con los del UVB1. Células HN13 tratadas con agua oxigenada fueron empleadas como control positivo de la técnica.

Como se observa en la **Figura 24A** tanto el análogo como el calcitriol provocaron un aumento de las ROS con respecto al vehículo (UVB1: $17,78 \pm 1,20$ UA; calcitriol: $20,78 \pm 2,32$ vs vehículo: $9,92 \pm 0,72$ UA; ** $p < 0,01$). La generación de las ROS en el control positivo de agua oxigenada fue de $34,89 \pm 5,98$ UA, resultado que indica un buen funcionamiento de la técnica ya que es ampliamente conocido el efecto oxidante de esta sustancia.

Estos resultados sugieren que la generación de ROS por parte del análogo, es decir el estrés oxidativo generado por el UVB1, podría conducir a un arresto del ciclo celular en G0/G1 en la línea HN13.

Coincidentemente, la evaluación de la expresión de la enzima antioxidante HO-1 luego del tratamiento de las células HN13 con UVB1 resultó incrementada por presencia del análogo (**Figura 24B**).

Para comenzar a investigar los mecanismos moleculares que podrían estar conduciendo al arresto del ciclo celular estudiamos la expresión de algunas de las proteínas involucradas en la regulación de dicho ciclo mediante

WB. Como se observa en la **Figura 24B**, el UVB1 provocó disminución de la expresión de ciclina D1 y no afectó la expresión de la proteína p27.

Tal como fue descrito en la sección “Introducción”, una de las formas por la cual el calcitriol y sus análogos ejercen su actividad antitumoral es a través de mecanismos que involucran al receptor VDR. Con el objetivo de analizar si el tratamiento con UVB1 inducía un aumento del receptor en células HN13, se estudiaron sus niveles proteicos mediante WB. Como se puede observar en la **Figura 24C**, el análogo no provocó cambios en la expresión de VDR a tiempos cortos de tratamiento (12 y 24 h), mientras que a tiempos largos (120 h) el UVB1 produjo un aumento de la expresión del receptor.

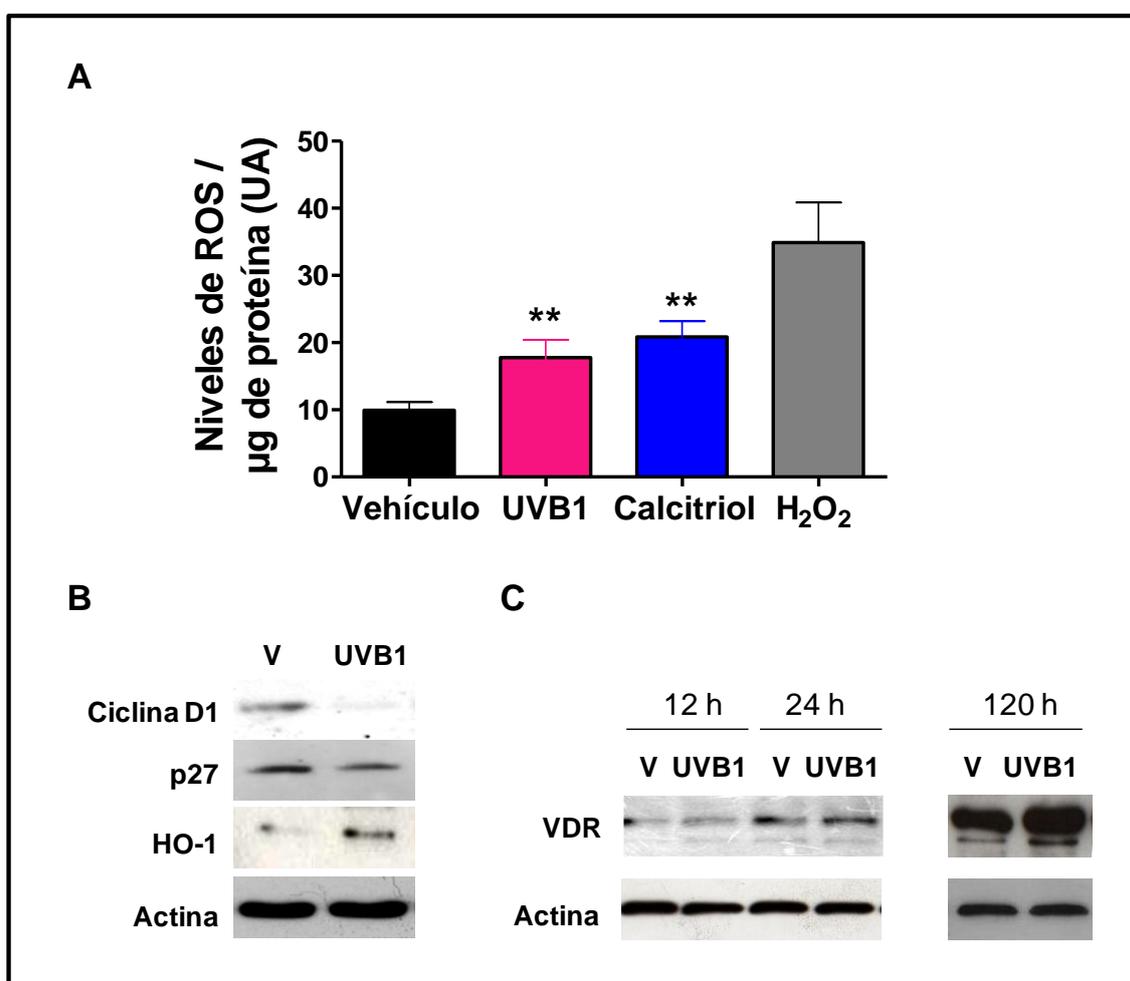


Figura 24. Evaluación de las ROS y de la expresión de proteínas en la línea celular HN13. A) Determinación de las ROS. Las células fueron tratadas con vehículo, UVB1o calcitriol (100 nM, 120 h) y luego incubadas con DCDHF-DA. Se utilizó como control positivo células tratadas con agua oxigenada (H₂O₂). Los niveles de las ROS se cuantificaron por espectrofluorimetría. UA: niveles de ROS / μg de proteína. Se muestra la media \pm SEM de dos ensayos

independientes. Se aplicó el test de ANOVA con posterior test de Bonferroni. ** $p < 0,01$. B) Efecto del análogo UVB1 sobre la expresión de ciclina D1, p27 y HO-1 mediante WB. C) Se muestra el efecto del análogo UVB1 sobre la expresión de VDR a tiempos cortos y largos de tratamiento analizada mediante WB. Los resultados fueron normalizados con actina.

Estudio de los efectos del análogo UVB1 sobre la migración celular

Como ya se comentó existen reportes que indican que el calcitriol y algunos de sus análogos modulan la migración de las células tumorales, por lo tanto decidimos evaluar este proceso mediante la realización de ensayos de cierre de la herida o “*wound healing*” de la manera anteriormente descrita.

Como se puede observar en la **Figura 25**, la línea celular HN13 no evidenció alteración de la migración celular ante la presencia del análogo o del calcitriol, mostrando la misma velocidad de migración que las células tratadas con vehículo ($p > 0,05$; **Figura 25A**). Sin embargo, la línea HN12 presentó una disminución de la capacidad migratoria cuando las células fueron tratadas con el análogo (UVB1 vs vehículo: 16 h: $54,28 \pm 7,01$ % vs $32,81 \pm 3,00$ %, ** $p < 0,01$ - 21 h: $42,78 \pm 5,08$ % vs $21,99 \pm 2,61$ %, * $p < 0,05$; **Figura 25B**) y con calcitriol (calcitriol vs vehículo: 16 h: $54,80 \pm 8,20$ % vs $32,81 \pm 3,00$ %, ** $p < 0,01$ - 21 h: $43,58 \pm 11,33$ % vs $21,99 \pm 2,61$ %, * $p < 0,05$; **Figura 25B**). La comparación de la migración entre el calcitriol y su análogo no demostró diferencias significativas.

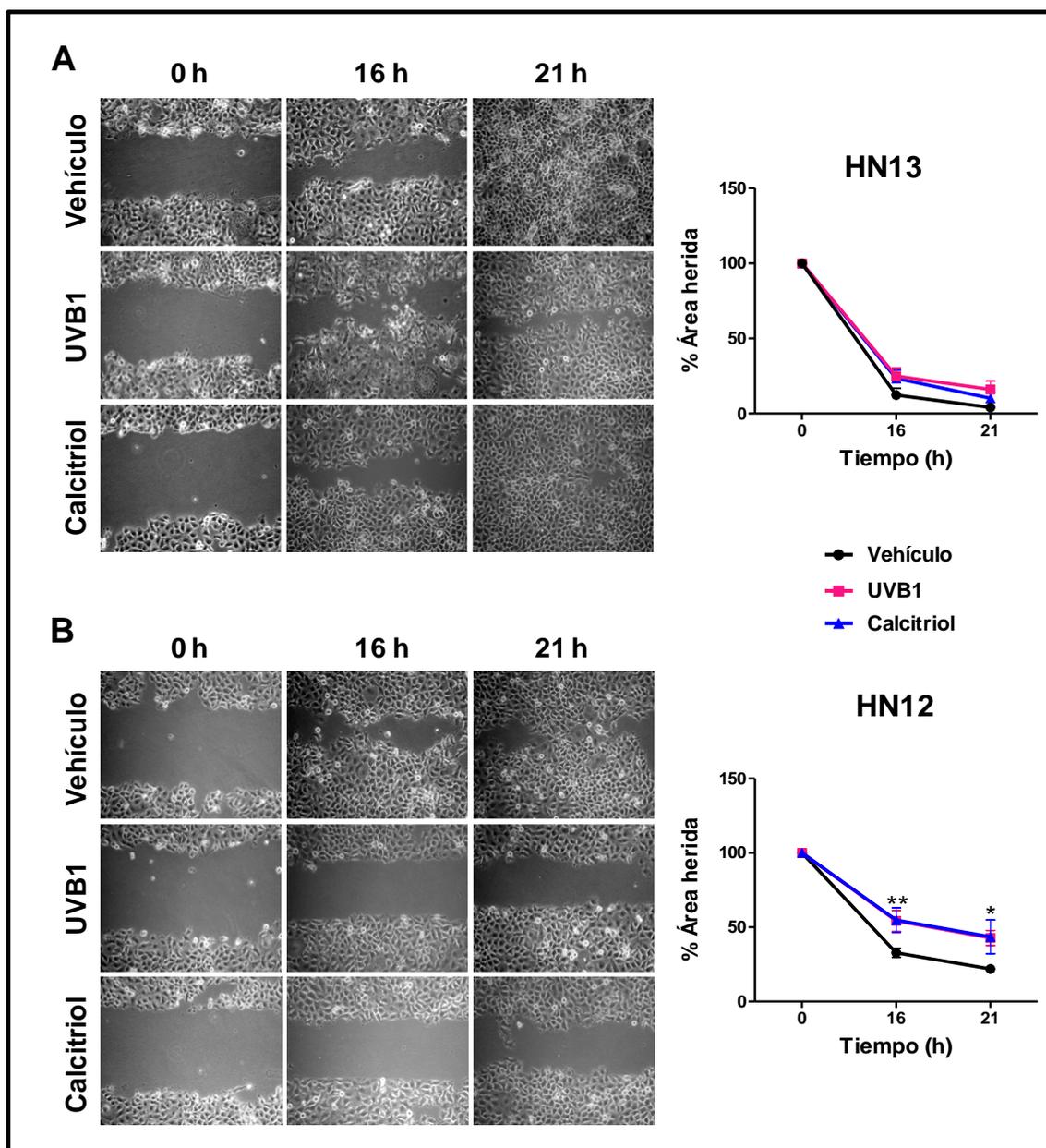


Figura 25. Evaluación de la migración celular luego del tratamiento con UVB1 y calcitriol sobre dos líneas celulares de CCECC. A) HN13 y B) HN12. Las células fueron expuestas a la concentración de 100 nM de UVB1, calcitriol o vehículo por un tiempo menor a 24 h. Se muestran fotos representativas a los distintos tiempos analizados (200x). El gráfico de líneas representa la media \pm SEM del porcentaje descubierto del área de la herida de tres ensayos independientes. Se aplicó el test de ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni, ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Efecto del análogo UVB1 en un modelo animal de xenotransplante subcutáneo con células de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello

Teniendo en cuenta los alentadores resultados obtenidos *in cultivo* con las líneas celulares de CCECC nos propusimos evaluar los efectos del análogo UVB1 en un modelo *in vivo*. Dado la imposibilidad de realizar un modelo animal con la línea celular HN13 debido a que esta última presenta una muy baja eficiencia de producción de tumores en ratones inmunosuprimidos (Yan *et al.*, 2013), decidimos evaluar la acción del UVB1 en un modelo *in vivo* de xenotransplante subcutáneo en ratones N: NIH(S)-*Fox1^{nu}* (nude) utilizando las células HN12. Como ya se describió, las células de esta línea proveniente de CCECC mostraron una disminución de la viabilidad y migración celular al ser tratadas con el análogo UVB1.

Los ratones fueron inoculados con las células y cuando los tumores medían aproximadamente 4 mm de diámetro los animales se dividieron al azar en dos grupos. El tratamiento con UVB1 o vehículo se realizó de la manera descrita en “Materiales y Métodos”. Como se observa en la **Figura 26C**, no se

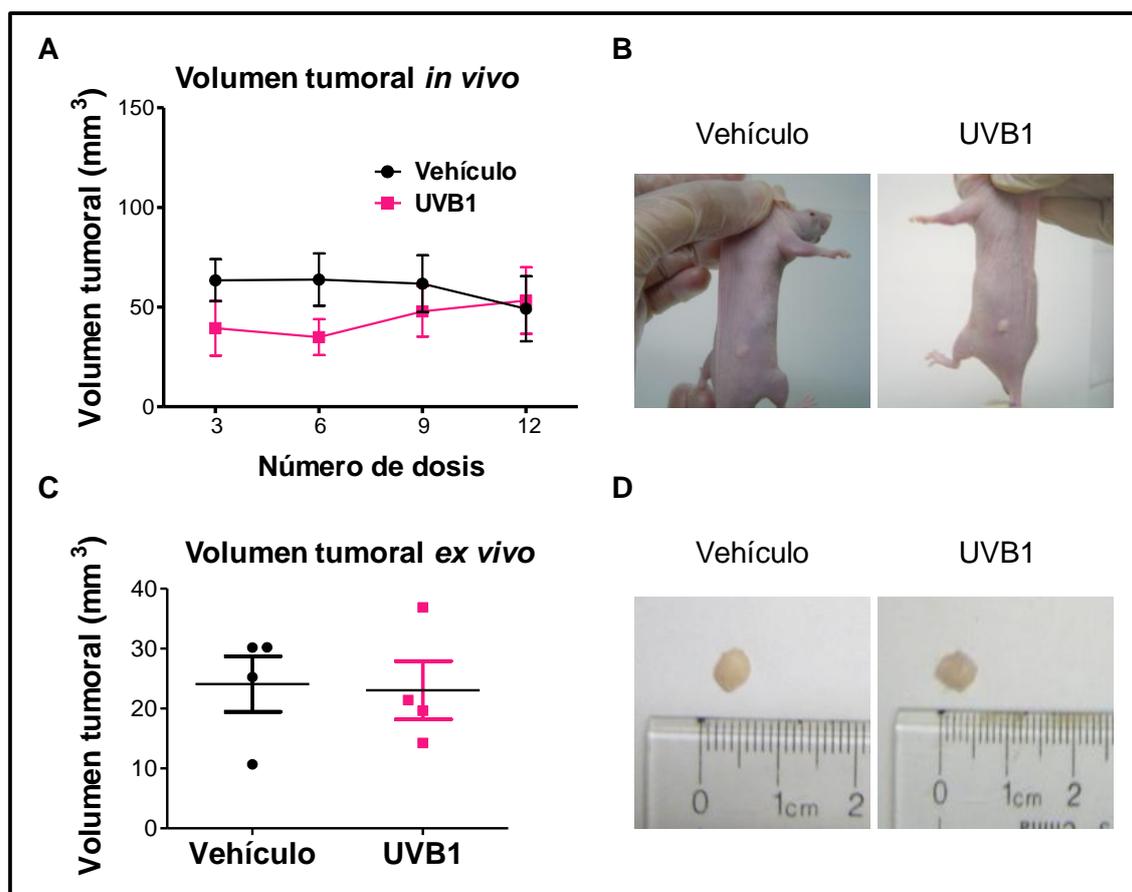


Figura 26. Modelo de xenotransplante subcutáneo con células HN12 en ratones N:NIH(S)-*Fox1^{nu}* (nude). Los animales fueron tratados con 12 dosis de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso de UVB1 o

vehículo. A) En el gráfico se representa el promedio del volumen tumoral de cada grupo \pm SD *in vivo*. Se aplicó el test de ANOVA con posterior test de Bonferroni, $p > 0,05$. B) Fotos representativas de un ratón de cada grupo experimental. C) En el gráfico se representa el promedio del volumen tumoral de cada grupo \pm SD *ex vivo*. Se realizó un test de *Student* para analizar las posibles diferencias en la carga tumoral entre los grupos. $p > 0,05$. D) Fotografías de tumores representativos de cada condición.

hallaron diferencias significativas en las dimensiones tumorales entre ambos grupos. Los volúmenes tumorales *ex vivo* de cada grupo fueron: vehículo: $24,08 \pm 4,62 \text{ mm}^3$ y UVB1: $23,10 \pm 4,83 \text{ mm}^3$, $p > 0,05$.

Cabe destacar que en este modelo animal observamos un comportamiento atípico de los tumores, ya que si bien eran sólidos, palpables y definidos, su tamaño se incrementó solo ligeramente con el paso del tiempo en ambos grupos (**Figura 26A**). Es posible entonces que este modelo animal no sea el adecuado para este tipo de estudios.

Para confirmar la ausencia de la actividad calcémica del análogo en los mismos animales de experimentación, se recogió plasma al final del tratamiento y se determinaron los niveles plasmáticos de calcio según lo descrito en “Materiales y Métodos”. Como se puede observar en la **Figura 27**, el tratamiento de los ratones con el análogo no provocó diferencias significativas en la calcemia (UVB1: $9,29 \pm 0,52 \text{ mg/dL}$ vs vehículo: $8,96 \pm 0,59 \text{ mg/dL}$, $p > 0,05$; **Figura 27A**), el hematocrito (UVB1: $41 \pm 1,10 \%$ vs vehículo: $42 \pm 2,38 \%$, $p > 0,05$; **Figura 27B**) o el peso (**Figura 27C**).

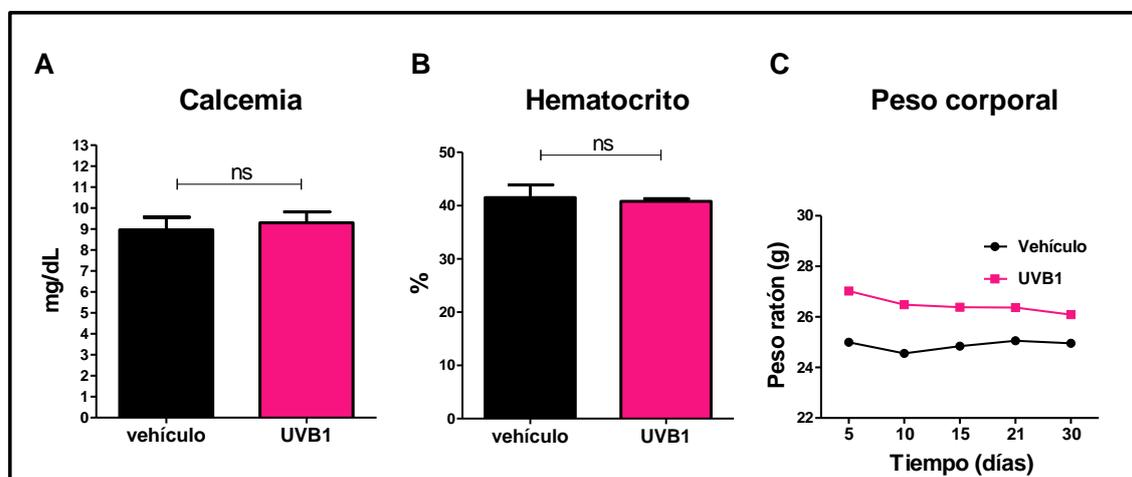


Figura 27. Calcemia, hematocrito y peso corporal de los ratones tratados con UVB1 o vehículo en el modelo animal de xenotransplante con células HN12. Se muestran los A) valores de calcemia, B) valores del hematocrito y C) peso de los ratones de cada grupo. Los animales fueron tratados con 12 dosis de 40 µg/kg de peso de UVB1 o vehículo durante 30 días. Se realizó el test de *Student* para la calcemia y el hematocrito. En los gráficos se representa el promedio ± SD de cada grupo. Se aplicó el test de ANOVA con posterior test de Bonferroni para peso corporal. Se muestra la media de cada grupo experimental. Ns: no significativo. $p > 0,05$.

Cabe entonces destacar que, a pesar de no haberse obtenido en este experimento una reducción del tamaño tumoral como resultado del tratamiento de los ratones con el análogo, los parámetros evaluados indican que el mismo no sería tóxico para estos animales. Teniendo en cuenta esto último y los resultados obtenidos en las líneas celulares de CCECC consideramos que sería adecuado continuar el estudio de los efectos antitumorales de este análogo en otros modelos animales y/o con otras modalidades de tratamiento.

2.3. Evaluación de los efectos antitumorales del análogo UVB1 en células de adenocarcinoma mamario

Estudio de los efectos del UVB1 sobre la viabilidad celular en las líneas de adenocarcinoma mamario

Dada la experiencia de nuestro grupo de investigación en el estudio del adenocarcinoma mamario, decidimos explorar los potenciales efectos del análogo en este tipo tumoral. De la misma manera que la descrita para las líneas celulares de glioblastoma multiforme y carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello, realizamos curvas de concentración – respuesta a 120 h de tratamiento con el análogo, calcitriol o vehículo tanto en líneas tumorales mamarias murinas LM3, como humanas T47D y MDA-MB-231. Teniendo en cuenta que es deseable en todo tratamiento oncológico la ausencia de efectos sobre células normales, y contando con la contraparte no maligna de las células LM3, la línea celular HC11, decidimos evaluar los efectos del análogo sobre estas células. Esta línea celular epitelial mamaria se originó a partir de ratones sanos BALB/c, al igual que las células LM3 (Williams *et al.*, 2009;

Ultreger *et al.*, 1997). Posteriormente, se calcularon las IC_{50} para las líneas que respondieron al tratamiento con el UVB1 y/o calcitriol (**Tabla 13**).

Como se muestra en la **Figura 28**, el UVB1, a diferencia del calcitriol, redujo la viabilidad celular de la línea tumoral murina LM3 (**Figura 28A**). Con respecto a la línea celular no maligna HC11, tanto el análogo UVB1 como el calcitriol provocaron una disminución de la viabilidad en estas células (**Figura 28B**), siendo sus IC_{50} 0,414 y 0,599 nM, respectivamente (**Tabla 13**).

En cuanto a la línea tumoral humana T47D, tanto el calcitriol como el UVB1 disminuyeron su viabilidad celular (**Figura 28C**) y la comparación de sus IC_{50} muestra un efecto más potente de la hormona natural con respecto al análogo (IC_{50} calcitriol: 0,54 nM vs IC_{50} UVB1: 5,76 nM). La viabilidad de las células de adenocarcinoma mamario humana MDA-MB-231 (**Figura 28D**) se redujo por presencia del calcitriol mientras que no se vieron afectadas por el tratamiento con el análogo durante 120 h.

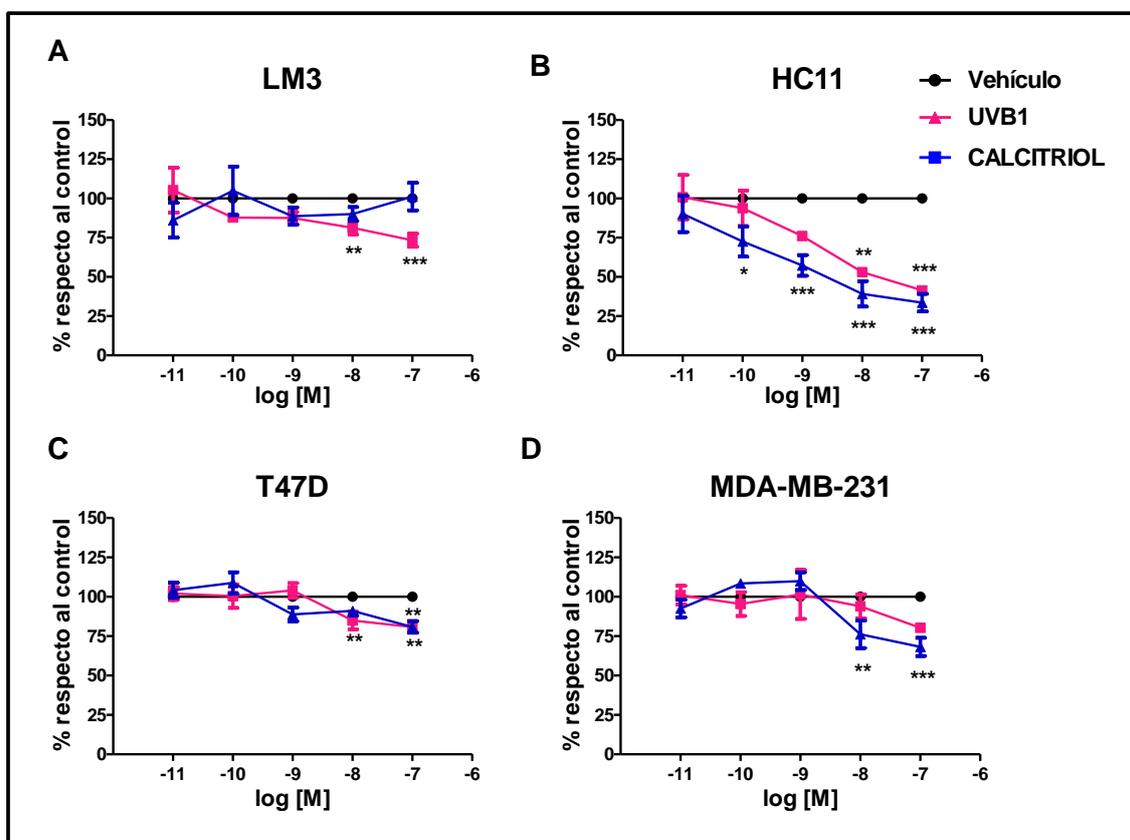


Figura 28. Ensayos de concentración - respuesta para el UVB1 y calcitriol evaluando la viabilidad celular de líneas celulares mamarias. A) LM3, B) HC11, C) T47D y D) MDA-MB-231.

Las células fueron expuestas a las concentraciones indicadas de análogo, calcitriol o vehículo por 120 h. Cada punto representa el promedio de cuatro réplicas de un mismo experimento \pm SD. El ensayo fue repetido 3 veces para cada línea. Se aplicó el test de ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Línea Celular	UVB1	Calcitriol
LM3	0,029	-
HC11	0,414	0,599
T47D	5,76	0,54
MDA-MB-231	-	7,58

IC₅₀: Concentración Inhibitoria 50: concentración de compuesto necesaria para reducir la viabilidad celular al 50 % (nM).

Tabla 13. IC₅₀ de las líneas celulares mamarias, tumorales (LM3, T47D y MDA-MB-231) y no malignas (HC11), que respondieron al tratamiento con UVB1 y/o calcitriol durante 120 h. Las IC₅₀ corresponden a un promedio de los tres ensayos independientes.

Como se puede observar tanto el análogo como el calcitriol presentaron efectos variables en la disminución de la viabilidad de las líneas tumorales y, contrariamente a lo deseable, redujeron en viabilidad de las células no malignas.

Estudio de los efectos del UVB1 sobre procesos celulares y mecanismos moleculares relacionados con la metástasis

A continuación, realizamos los ensayos de la herida para evaluar la capacidad migratoria de estas líneas celulares mamarias en presencia del análogo o calcitriol. En la **Figura 29** se presentan los resultados obtenidos.

En relación a la migración de las células de adenocarcinoma mamario murino LM3, estas presentaron una disminución de la migración celular cuando fueron tratadas con el UVB1 (UVB1 vs vehículo: 16 h: $45,48 \pm 3,65$ % vs $13,99 \pm 5,22$ %, *** $p < 0,001$ - 21 h: $27,76 \pm 5,79$ % vs $7,32 \pm 3,57$ %, ** $p < 0,01$; **Figura 29A**), no hallándose diferencias significativas en presencia de calcitriol ($p > 0,05$) comparado con la condición control. Con respecto a su contraparte no maligna, ni el calcitriol ni el análogo afectaron la capacidad migratoria de esta línea celular ($p > 0,05$; **Figura 29B**).

En cuanto a la capacidad migratoria de las líneas tumorales mamarias humanas T47D y MDA-MB-231, la misma no fue afectada por la presencia del análogo ni del calcitriol ($p > 0,05$; **Figura 29 C y D**).

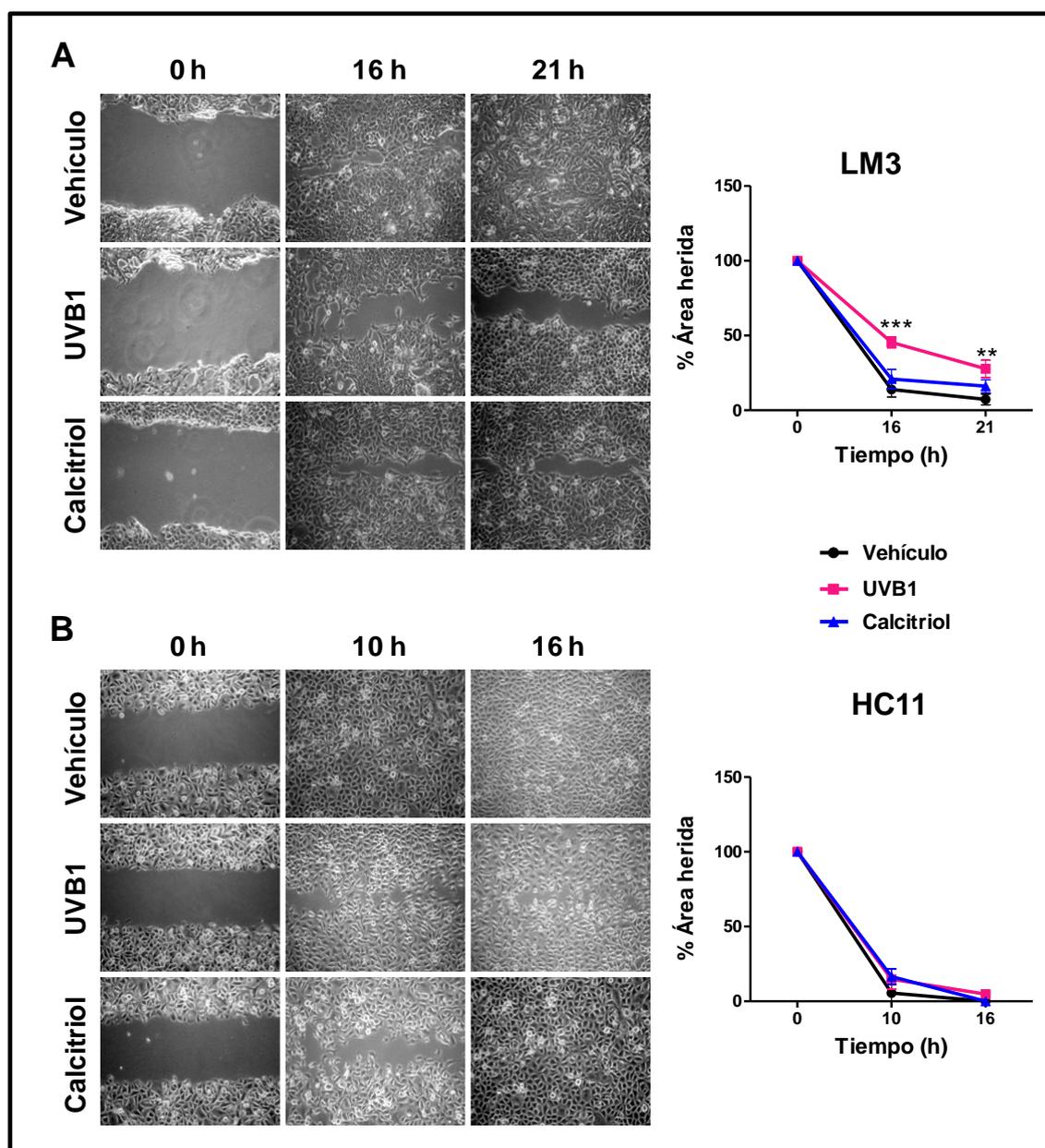


Figura 29. Evaluación de la migración celular luego del tratamiento con UVB1 y calcitriol sobre las líneas celulares mamarias A) LM3, B) HC11, C) T47D y D) MDA-MB-231. Las células fueron expuestas a la concentración de 100 nM de UVB1, calcitriol o vehículo por un tiempo menor a 24 h. Se muestran fotos representativas a los distintos tiempos analizados (200x). El gráfico de líneas representa la media \pm SEM del porcentaje descubierto del área de la herida de tres ensayos independientes. Se aplicó el test de ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

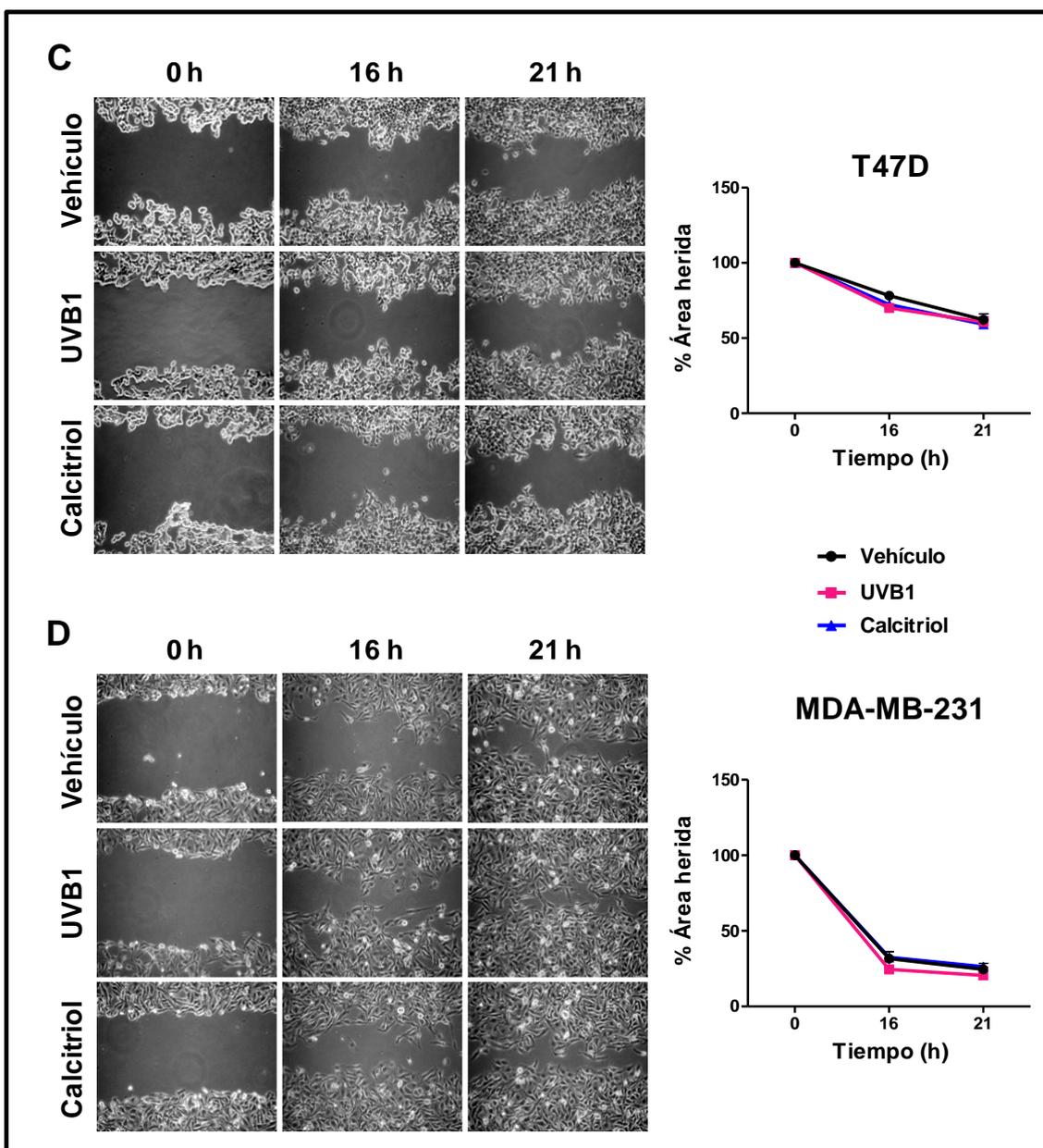


Figura 29 (continuación). Evaluación de la migración celular luego del tratamiento con UVB1 y calcitriol sobre las líneas celulares mamarias A) LM3, B) HC11, C) T47D y D) MDA-MB-231. Las células fueron expuestas a la concentración de 100 nM de UVB1, calcitriol o vehículo por un tiempo menor a 24 h. Se muestran fotos representativas a los distintos tiempos analizados (200x). El gráfico de líneas representa la media \pm SEM del porcentaje descubierto del área de la herida de tres ensayos independientes. Se aplicó el test de ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

En base a los resultados hasta aquí presentados se puede concluir que el calcitriol disminuyó la viabilidad celular en la línea HC11 sin afectar a la línea tumoral LM3. Además, no provocó efectos sobre la migración celular de la línea tumoral LM3 ni de su contraparte no maligna HC11. En cambio, el análogo UVB1 presenta un efecto diferencial sobre las células tumorales y las no

malignas. El compuesto fue capaz de disminuir la viabilidad de ambas líneas celulares con IC_{50} diferentes (IC_{50} LM3: 0,029 nM vs IC_{50} HC11: 0,414 nM) y de retrasar la migración celular de la línea tumoral LM3 sin afectar a las células HC11.

Como es sabido en el proceso de metástasis la célula no solo debe incrementar su capacidad migratoria sino también adquirir la capacidad de invadir la MEC. Dado que se ha reportado que este proceso es modulado por el calcitriol, decidimos evaluar los efectos del análogo sobre la invasión celular. Este ensayo se realizó en células LM3 y en su contraparte no maligna HC11, dado que, como se acaba de describir, observamos un efecto diferencial del análogo sobre la migración celular en estas líneas.

Para ello, se utilizó un ensayo de invasión a través de cámaras *transwell*. Con el mismo se detecta la capacidad de las células para atravesar una membrana cubierta con Matrigel®. Se seleccionó un tiempo de tratamiento de 16 h ya que con el mismo se observó un retraso de la migración celular en la línea LM3 y no se hallaron efectos en la línea no maligna HC11. Como se puede observar en la **Figura 30A** el análogo retrasó la invasión celular de la lí-

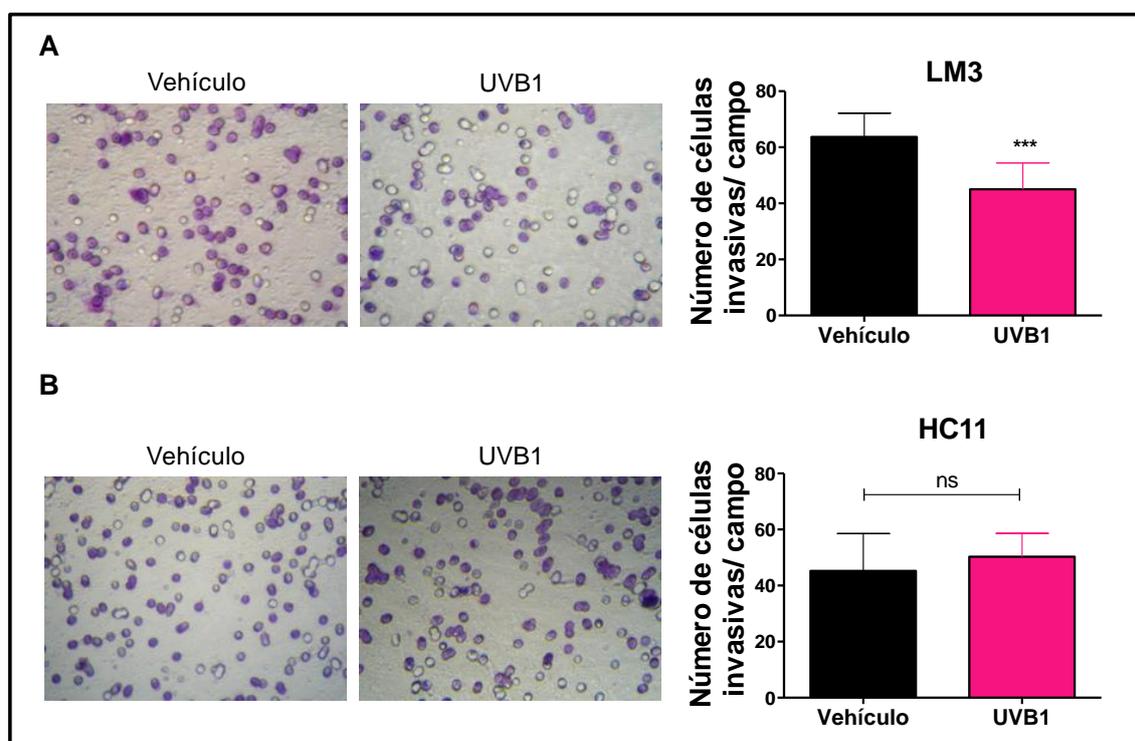


Figura 30. Efectos del UVB1 sobre la capacidad invasiva de las células LM3 y HC11. Las células fueron tratadas con UVB1 (100 nM) o vehículo por 16 h y se evaluó la capacidad invasiva utilizando cámaras *transwell* recubiertas con Matrigel®. Imágenes representativas del ensayo de invasión mostrando las células que atravesaron la capa de Matrigel®. Magnificación: 400x. El gráfico muestra la media \pm SD del número de células A) LM3 y B) HC11 invasivas por campo luego del tratamiento con UVB1 o vehículo. En ambos casos, el ensayo se realizó por triplicado y se analizaron diez campos al azar de cada condición. Se aplicó el test de *Student*. Ns: no significativo. *** $p < 0,001$.

-nea LM3 (número de células por campo: vehículo: $63,71 \pm 8,46$ vs UVB1: $45,02 \pm 9,39$; *** $p < 0,001$) mientras que la invasión de las células HC11 no resultó afectada (número de células por campo: vehículo: $45,22 \pm 13,37$ vs UVB1: $50,30 \pm 8,36$; $p = 0,331$; **Figura 30B**).

Estos resultados indican que el análogo presenta un efecto inhibitorio tanto sobre la migración celular como sobre la invasividad de las células tumorales mamarias murinas, sin afectar a las células no malignas, lo que sugiere su especificidad como agente anti-metastásico.

También es sabido que la MEC es una red compleja de proteínas y polisacáridos que contribuyen a la estructura y función de un tejido. La remodelación de la MEC se realiza de manera dinámica y continua tanto en los tejidos normales como en los tumorales (Giannelli *et al.*, 2016; Coronato *et al.*, 2012). En este proceso intervienen, entre otras familias de proteasas, las MMPs que facilitan la migración celular, la invasión tumoral y la metástasis (Bonnans *et al.*, 2014).

Dado que el análogo demostró afectar la migración y la invasión celular de la línea de adenocarcinoma mamario murino y teniendo en cuenta que en cáncer de mama niveles plasmáticos aumentados de las MMP-9 y MMP-2 se han relacionado con un peor pronóstico de las pacientes (Radisky & Radisky, 2015), decidimos estudiar si el UVB1 podría afectar la degradación de la MEC modulando la actividad de estas proteasas vinculadas al proceso de invasión de las células tumorales mamarias. Para ello, utilizamos la técnica de zimografía para medir la actividad proteolítica (gelatinasa) de las MMP-9 y MMP-2 liberadas por las células LM3 y HC11 luego del tratamiento con el análogo.

Los resultados indican que las actividades de las MMP-9 y MMP-2 no son afectadas por presencia del análogo en las dos líneas celulares mamarias estudiadas, LM3 y HC11 ($p > 0,05$, **Figura 31 A y B**).

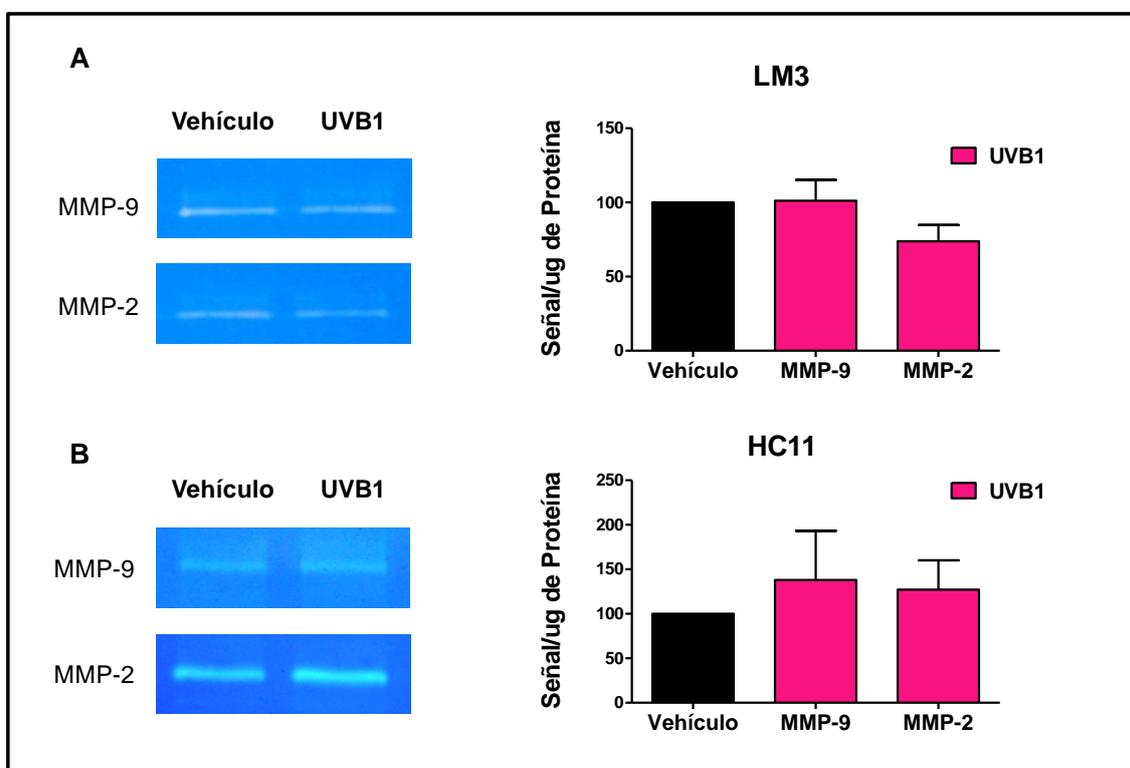


Figura 31. Efectos del UVB1 sobre la actividad de las MMP-9 y MMP-2 secretadas por las células LM3 y HC11. Zimografía realizada con el medio condicionado del cultivo de células A) LM3 y B) HC11 tratadas con UVB1 (100 nM) o vehículo durante 16 h. Se muestran los *blots* de visualización de la actividad de MMP-9 y MMP-2. Las bandas fueron cuantificadas usando el *software ImageJ* y normalizadas según la cantidad de proteína celular. La actividad se graficó como porcentaje respecto al control, considerándose a este como el 100 %. Se muestra la media \pm SEM de tres ensayos independientes. Se aplicó el test de *Student*; $p > 0,05$.

Como ya se comentó, detectamos un efecto del análogo sobre la migración de las células tumorales LM3. Se sabe que las modificaciones del citoesqueleto de actina son importantes para la motilidad celular. Estas modificaciones son reguladas mediante una compleja cascada de transducción de señales. La mutación en alguna de las proteínas involucradas en estas cascadas o alteración en su expresión puede conducir a procesos aberrantes. De hecho la invasión tumoral y la metástasis están cada vez más asociadas con la desregulación del citoesqueleto de actina (Lambrechts *et al.*, 2004). Para

poder migrar la célula reorganiza su citoesqueleto formando fibras de estrés, compuestas por moléculas de miosina II, la proteína motora que presenta la capacidad de contraerse. Esta contracción de las fibras de estrés es parte del proceso de locomoción celular (Alberts *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta lo antedicho y los efectos ejercidos por el UVB1 sobre la migración e invasión de las células LM3, se analizó el efecto del análogo sobre la remodelación del citoesqueleto de actina tal como se describió en “Materiales y Métodos”. Luego del tratamiento con UVB1, se observó que los filamentos de actina de la línea celular LM3 se reorganizan, reduciéndose de manera muy significativa la cantidad de células con fibras de estrés con respecto al control (% de células con fibras de estrés: vehículo: $91,33 \pm 2,65$ vs UVB1: $1,94 \pm 0,44$, *** $p < 0,001$; **Figura 32**).

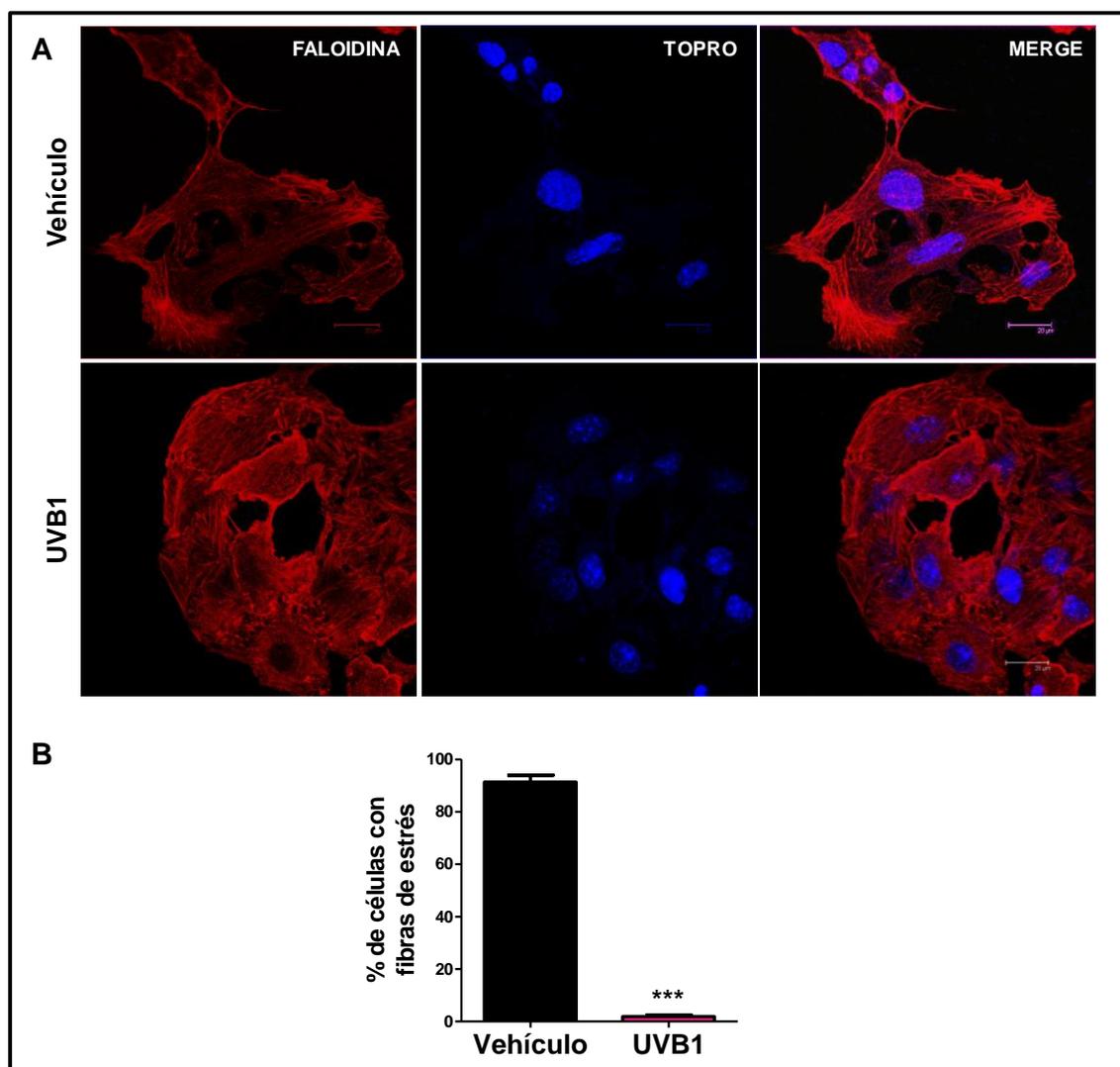


Figura 32. Evaluación de la cantidad de células con fibras de estrés del citoesqueleto de actina en la línea celular LM3. Las células fueron tratadas con UVB1 (100 nM) o vehículo durante 16 h. Se realizó la cuantificación de las células con presencia de fibras de estrés. A) Fotos representativas adquiridas por microscopia confocal (630x, barra de escala: 20 μ m). B) El gráfico de barras indica la media \pm SEM de dos ensayos independientes. Se aplicó el test de *Student*, *** $p < 0,001$.

También es sabido que durante la TEM, proceso necesario para que una célula de un carcinoma pueda realizar metástasis, las células cancerosas pierden la expresión de E-cadherina, se liberan del anclaje a las células vecinas, adquieren la expresión de marcadores mesenquimáticos, tales como vimentina, y alteran su morfología celular desde una forma poliédrica hacia una ahusada típica de un fibroblasto. Además, en relación con su función, se ha demostrado que la E-cadherina es un marcador importante del proceso de diferenciación celular (Giannelli *et al.*, 2016; Di Rosa *et al.*, 2013). En este sentido, también es importante destacar que se ha reportado que el calcitriol modula la expresión de proteínas involucradas en la TEM (Xu *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta estos antecedentes decidimos evaluar la expresión de E-cadherina y β -catenina en la línea celular LM3 luego del tratamiento de las células con el análogo o vehículo. Tal como se muestra en la **Figura 33**, el UVB1 provocó un aumento en los niveles de expresión de E-cadherina, tal como pudo comprobarse mediante las técnicas de IF (UVB1: $5,56 \pm 0,72$ % vs vehículo: $2,21 \pm 0,76$ %, $p = 0,005$; **Figura 33A**) y WB (**Figura 33B**). En cuanto a β -catenina, se evaluó su expresión mediante WB y se halló que el UVB1 no provocó diferencias significativas con respecto al control (**Figura 33B**).

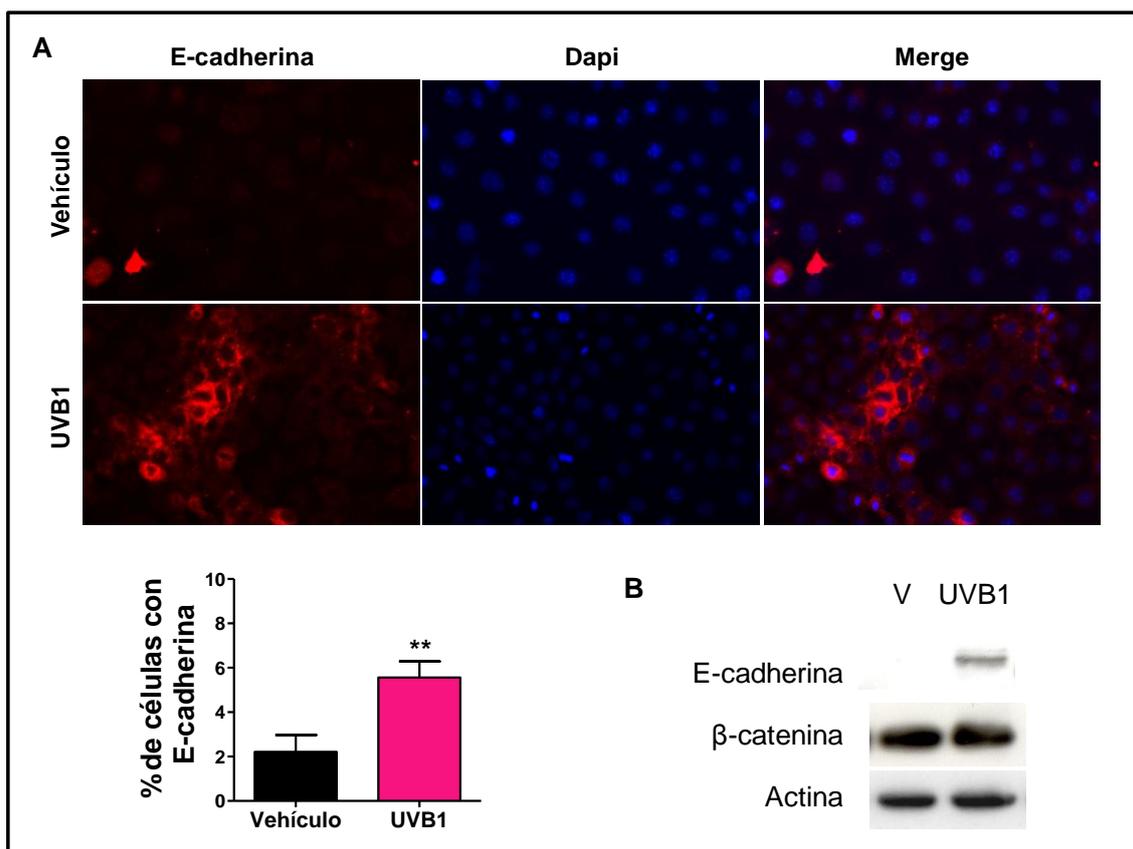


Figura 33. Efectos de UVB1 sobre la expresión de E-cadherina y β -catenina en la línea celular LM3. Las células fueron tratadas con UVB1 (100 nM) o vehículo durante 16 h. A) Evaluación de la expresión de E-cadherina mediante IF. Se muestran imágenes representativas del ensayo (Amplificación: 400x). El gráfico de barras muestra el porcentaje de células que expresan E-cadherina. Cada barra representa el promedio \pm SD de 10 campos al azar. Se realizó el test de *Student*. ** $p < 0,01$. B) Expresión de E-cadherina y β -catenina mediante WB. Los experimentos fueron repetidos tres veces.

Efectos del UVB1 sobre la expresión de p27 en la línea celular LM3

Se cuenta con abundante evidencia de los efectos inhibidores de la proteína p27 sobre el ciclo celular y de la relación entre sus niveles alterados y el cáncer (He *et al.*, 2012; Hershko, 2010). Por otro lado, como ya se comentó, el calcitriol también modula los niveles de este inhibidor (Christakos *et al.*, 2015). Además, en la actualidad se le atribuyen funciones sobre la migración celular cuando se encuentra localizado en citoplasma, sin embargo, su rol en este último proceso aún es controversial ya que se cuenta con bibliografía que reporta un papel tanto en la inhibición como en la estimulación de la movilidad celular (Berton *et al.*, 2009).

En base a estos antecedentes sobre los efectos en ambos procesos celulares, proliferación y migración celular, y a su relación con el calcitriol, nos propusimos evaluar la expresión de p27 en las células LM3 tratadas con el análogo dado que el tratamiento de estas células con el UVB1 produjo una disminución de la viabilidad celular y un retraso en la migración celular. La expresión de p27 fue evaluada mediante IF y WB en células LM3 tratadas con UVB1 o vehículo. Como se observa en la **Figura 34A** el tratamiento de las células LM3 con el análogo (100 nM, 16 h) provocó un aumento de la expresión de esta proteína tanto en núcleo como en citoplasma con respecto al control (vehículo: $74,62 \pm 8,18$ % vs UVB1: $98,70 \pm 0,46$ %; $p = 0,007$). Este aumento de la expresión de p27 fue confirmado mediante WB (**Figura 34B**).

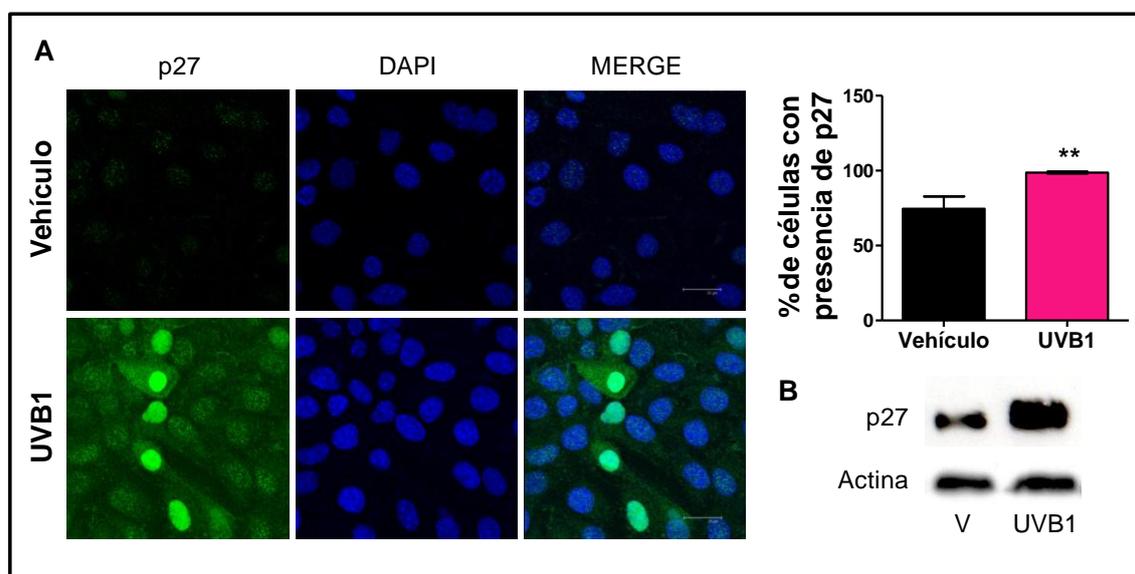


Figura 34. Efectos del UVB1 sobre la expresión de p27 en la línea celular LM3. Las células fueron tratadas con UVB1 (100 nM) o vehículo durante 16 h. A) Evaluación de la expresión de p27 mediante IF. Se muestran imágenes representativas adquiridas por microscopía confocal (630x, barra de escala: 20 μ m). El gráfico muestra el porcentaje de células que expresan p27. Cada barra representa el promedio \pm SD de 10 campos al azar. Se realizó el test de *Student*. ** $p < 0,01$. B) Expresión de p27 mediante WB. Los experimentos fueron repetidos dos veces.

En resumen, los ensayos *in cultivo* nos permiten concluir que el análogo UVB1 presenta efectos antitumorales sobre la viabilidad, migración e invasión celular en la línea tumoral mamaria LM3. Dichos efectos están ausentes o atenuados en su contraparte no maligna HC11. A un nivel molecular, y sin pretender haber agotado en esta tesis el estudio de los mecanismos de acción

de este análogo, estos efectos antineoplásicos parecen ser el resultado de la reorganización del citoesqueleto de actina, el aumento de la expresión de E-cadherina, proteína implicada en la unión intercelular epitelial y en la diferenciación celular, y el incremento de los niveles proteicos de p27.

Estudio de los efectos del UVB1 en un modelo animal de trasplante singeneico con células de adenocarcinoma mamario

En base a los efectos antitumorales del análogo UVB1 sobre las células LM3 *in cultivo*, decidimos evaluar sus efectos sobre dichas células *in vivo*. Para ello, utilizamos un modelo murino de implante subcutáneo de células LM3 en ratones hembras BALB/c (Urtreger *et al.*, 1997).

En primer término, evaluamos el efecto del análogo sobre la carga tumoral. Se realizó el tratamiento de los animales con el UVB1 o vehículo tal como se describió en “Materiales y Métodos”. La **Figura 35** muestra la ausencia de diferencias significativas en la carga tumoral entre los animales tratados con UVB1 comparado con los ratones tratados con vehículo. La media del volumen tumoral de los animales tratados con el análogo fue $2.828 \pm 1.352 \text{ mm}^3$ vs la media del volumen tumoral de los ratones tratados con vehículo: $3.297 \pm 1.363 \text{ mm}^3$, $p = 0,516$ (**Figura 35B**). Tampoco se hallaron diferencias significativas en cuanto al peso tumoral *ex vivo* entre ambos grupos (UVB1: $1,946 \pm 0,958 \text{ g}$ vs vehículo: $2,128 \pm 0,831 \text{ g}$, $p = 0,699$).

Como se describió anteriormente, el análogo afectó la migración e invasión en las células LM3 en cultivo. Estos resultados sugieren que el análogo UVB1 podría estar ejerciendo una acción inhibitoria sobre el proceso de metástasis. Dado que el modelo singeneico empleado es capaz de generar metástasis pulmonares (Urtreger *et al.*, 1997), estudiamos si el análogo tenía un efecto inhibitorio sobre este proceso. Para ello, realizamos la cuantificación de las metástasis pulmonares de los ratones de ambos grupos. Contrariamente a lo esperado, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo tratado con el análogo y el control (número de metástasis pulmonares por ratón: UVB1: media = $2,929 \pm 3,724$ vs media = $6,313 \pm 8,133$, $p = 0,3315$; **Figura 35C**).

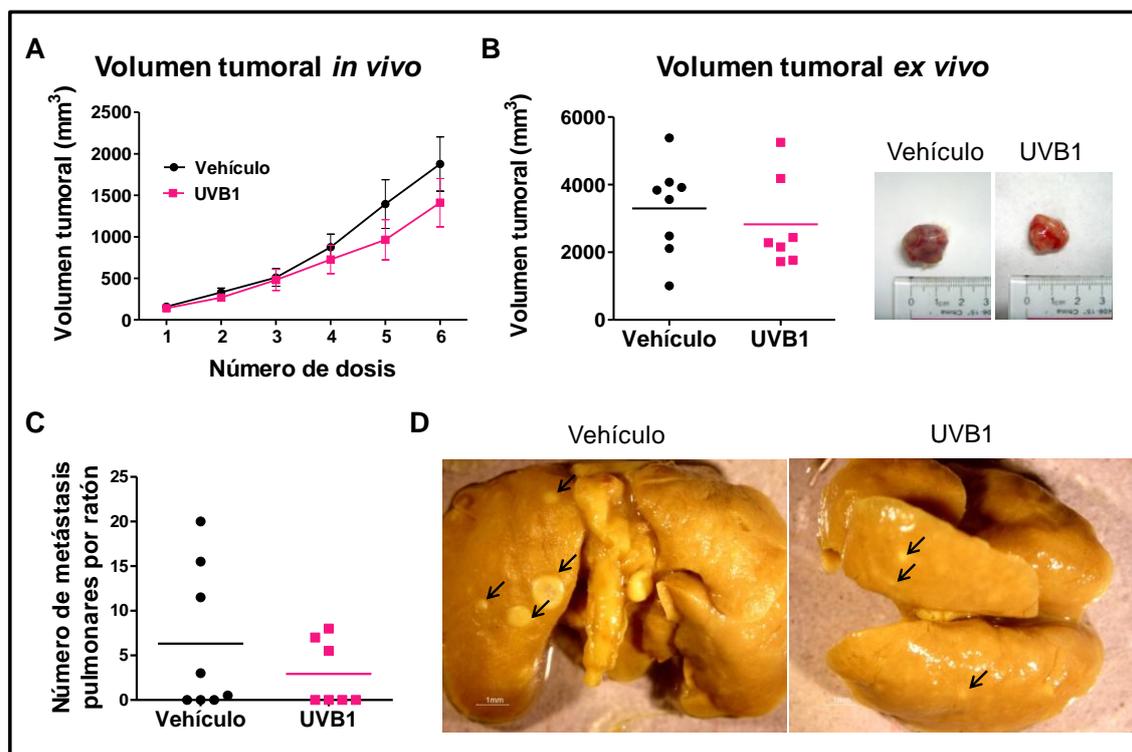


Figura 35. Efecto del UVB1 sobre el volumen tumoral y el número de metástasis pulmonares en un modelo murino de trasplante singeneico con células LM3. Hembras BALB/c portadoras de tumores fueron tratadas con 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso de UVB1 o vehículo. A) El gráfico muestra el volumen tumoral *in vivo* para cada grupo. B) El gráfico indica el volumen tumoral *ex vivo* para cada ratón. Se muestran imágenes representativas de los tumores *ex vivo* de los ratones tratados con UVB1 o vehículo. C) El gráfico presenta la cuantificación macroscópica del número de metástasis pulmonares por ratón. D) Imágenes representativas de las metástasis pulmonares en los dos grupos. En todos los gráficos se marca la media de cada grupo experimental. Se aplicó el test de *Student*. $p > 0,05$.

Si bien ya habíamos demostrado la ausencia de hipercalcemia a la dosis de análogo empleada en este modelo animal en los ensayos de calcemia realizados en los ratones nude y, además, por un tiempo de tratamiento mayor al comprendido en este ensayo, decidimos igualmente evaluar los niveles de calcemia para conocer si los mismos eran afectados por el análogo en esta cepa de ratón que no había sido estudiada anteriormente. Por lo tanto, analizamos los niveles de calcemia de los ratones antes de comenzar el experimento (niveles basales) y una vez finalizado el tratamiento con UVB1 o vehículo luego de dos semanas (6 dosis de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso). La **Figura 36A** muestra la ausencia de diferencias significativas en los niveles de calcemia al final del tratamiento entre los animales tratados con el análogo y el grupo control (UVB1: $10,61 \pm 1,53$ mg/dL vs vehículo: $10,16 \pm 0,76$ mg/dL, $p = 0,528$).

Tampoco los niveles plasmáticos de calcio de los animales variaron durante el período de tratamiento (calcemia basal: $10,02 \pm 0,3271$ mg/dL). Se analizaron los hematocritos de los dos grupos al final del tratamiento y no se hallaron diferencias significativas (**Figura 36B**), como tampoco se evidenció pérdida de peso corporal en cada uno de los grupos (**Figura 36C**).

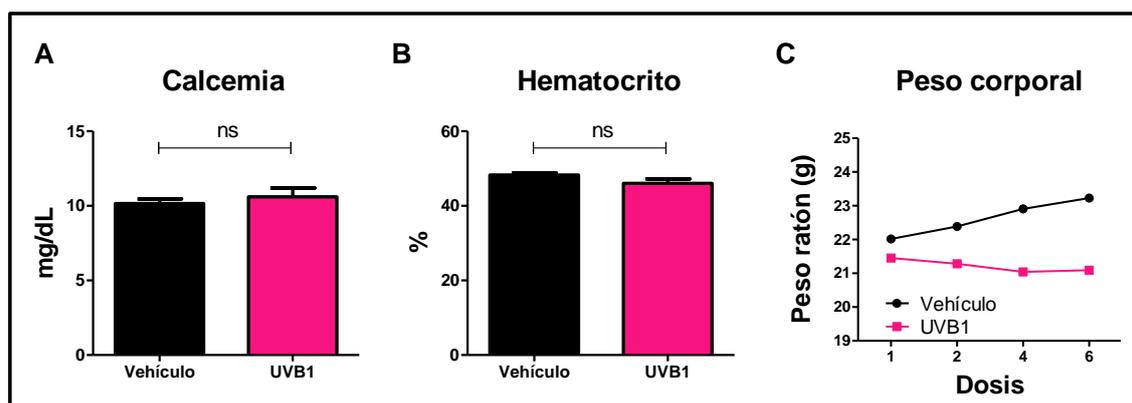


Figura 36. Calcemia, hematocrito y peso corporal de los ratones tratados con UVB1 o vehículo en el modelo animal de trasplante singéneo con células LM3. A) Valores de calcemia. B) Valores del hematocrito. C) Peso promedio de los ratones de cada grupo. Los animales fueron tratados con 6 dosis de $40 \mu\text{g/kg}$ de peso de UVB1 o vehículo durante dos semanas. Se realizó el test de *Student* para la calcemia y el hematocrito. En los gráficos se representa el promedio \pm SD de cada grupo. Se aplicó el test de ANOVA con posterior test de Bonferroni para el peso corporal. Ns: no significativo. $p > 0,05$.

Teniendo en cuenta los alentadores efectos obtenidos con el UVB1 en las líneas celulares de adenocarcinoma mamario es necesario continuar en el futuro los experimentos en este modelo animal con variaciones en las modalidades de tratamiento del análogo y con técnicas más refinadas que consideren no solo el número de metástasis pulmonares sino también el volumen de las mismas.

2.4. Evaluación de los efectos antitumorales del análogo UVB1 en células de carcinoma colorrectal

Estudio de los efectos del UVB1 sobre la viabilidad celular en la línea HCT116

El ensayo exploratorio inicial realizado sobre la línea celular de CCR HCT116 demostró que el análogo disminuye la viabilidad de estas células. Con el fin de comparar los efectos del UVB1 con los ejercidos por el calcitriol, repetimos los ensayos de viabilidad celular realizando esta vez las curvas de concentración - respuesta a 120 h de tratamiento en estas mismas células (**Figura 37A**).

La proteína p53 es un importante gen supresor tumoral que se encuentra mutado en aproximadamente la mitad de todos los tumores. Específicamente en CCR es un gen mutado en un 50 – 60 % (Müller *et al.*, 2016; Puerta-García *et al.*, 2015; Carethers & Jung, 2015). En condiciones normales p53 está presente en niveles casi indetectables. Ante situaciones de estrés celular sus niveles proteicos se incrementan e induce arresto del ciclo celular principalmente aumentando la expresión del inhibidor p21. Si el daño celular es irreparable la proteína p53 induce apoptosis. Teniendo en cuenta que en el ensayo de viabilidad celular exploratorio inicial el análogo indujo una reducción de la viabilidad y, contando con la línea celular HCT116 *wild type* y HCT116 p53 *-/-*, nos propusimos evaluar el efecto del UVB1 sobre la viabilidad en estas dos líneas celulares. De esta manera, la comparación de los efectos del UVB1 en una línea celular de CCR con presencia y ausencia de p53, nos permitiría conocer la posible implicancia de esta proteína en los efectos del análogo.

Como se puede observar en la **Figura 37** y la **Tabla 14**, tanto el UVB1 como el calcitriol afectaron la viabilidad de las células HCT116 con IC₅₀ similares. Sorprendentemente, el análogo no mostró efectos sobre la viabilidad celular de la línea HCT116 p53 *-/-* en ninguna de las concentraciones testeadas durante 120 h. En cambio, el calcitriol mantiene sus efectos sobre la reducción de la viabilidad celular en ausencia de p53 con una IC₅₀ de 19,32 nM.

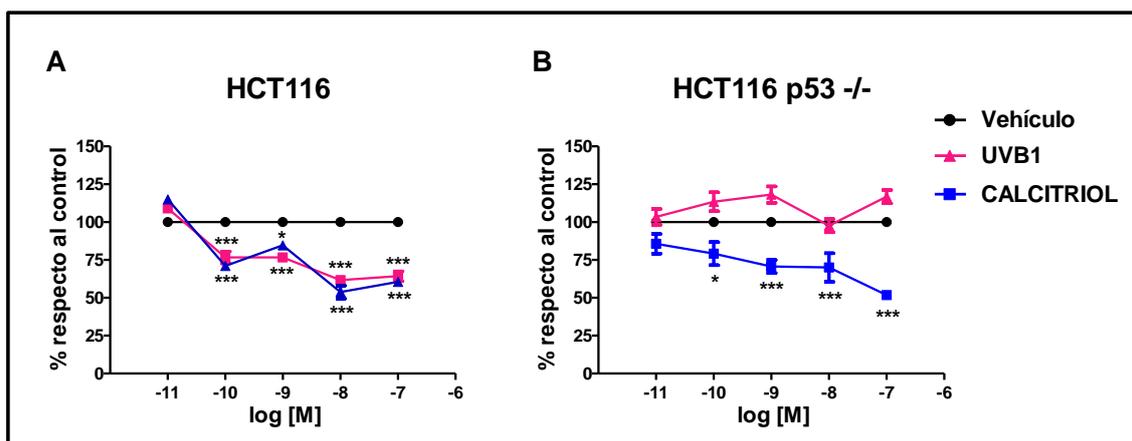


Figura 37. Ensayos de concentración - respuesta para el UVB1 y calcitriol evaluando la viabilidad celular de las líneas celulares A) HCT116 y B) HCT116 p53 -/-. Las células fueron expuestas a las concentraciones indicadas de análogo, calcitriol o vehículo por 120 h. Cada punto representa el promedio de cuatro replicas de un mismo experimento \pm SD. El ensayo fue repetido 3 veces para cada línea. Se aplicó el test de ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni, *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$.

Línea Celular	UVB1	Calcitriol
HCT116	0,103	0,403
HCT116 p53 -/-	-	19,32

IC₅₀: Concentración Inhibitoria 50: concentración de compuesto necesaria para reducir la viabilidad celular al 50 % (nM).

Tabla 14. IC₅₀ de las líneas celulares HCT116 y HCT116 p53 -/- tratadas con UVB1 o calcitriol durante 120 h. Las IC₅₀ corresponden al promedio de los tres ensayos independientes.

Estos resultados sugieren que, a diferencia del calcitriol, al menos en esta línea, los efectos del análogo sobre la viabilidad celular serían dependientes de p53. Este hecho establece una importante diferencia en su mecanismo de acción con respecto al calcitriol, ya que este último ejerce sus efectos sobre la viabilidad de una manera independiente de la presencia de p53.

Análisis de los efectos del análogo UVB1 sobre el ciclo celular y la apoptosis en la línea celular HCT116

Como se ha mencionado anteriormente, la variación en el número de células de una población tumoral puede deberse a cambios en la regulación del

ciclo celular (que conducen a una modificación correspondiente en la proliferación celular) o a variaciones en la muerte celular. Por lo tanto, teniendo en cuenta la disminución de la viabilidad celular producida por el UVB1 en la línea de CCR HCT116 se comenzó a investigar si esta reducción se debía a un efecto del análogo sobre la proliferación celular, la apoptosis o ambas. Con este objetivo analizamos el efecto del UVB1 sobre la progresión del ciclo celular. Para ello, las células HCT116 pre-tratadas con UVB1 o calcitriol en dos concentraciones distintas (100 y 1 nM) durante 120 h se sometieron al análisis de la distribución de la población de células en las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo utilizando la tinción con IP.

El tratamiento de las células HCT116 con UVB1 o calcitriol a la concentración más alta de 100 nM indujo un aumento muy pronunciado de la población de células en sub G0/G1 respecto al vehículo, lo que dificultó el análisis correcto de las fases del ciclo celular (UVB1: $80,49 \pm 0,24$ %; calcitriol: $87,39 \pm 1,12$ % vs vehículo: $4,53 \pm 0,14$ %, *** $p < 0,001$; **Figura 38A**). Por lo tanto, continuamos el análisis de la distribución de la población celular reduciendo la concentración de tratamiento del análogo a 1 nM.

Como se observa en la **Figura 38B**, luego del tratamiento de las células con UVB1 en una concentración de 1 nM, el porcentaje de células en sub G0/G1 aumentó muy significativamente con respecto al control ($50,69 \pm 1,22$ % vs $10,45 \pm 1,675$ %, *** $p < 0,001$). Este incremento en la región sub G0/G1 fue acompañado por una reducción de células en las fases G0/G1 ($30,99 \pm 0,53$ % vs $55,34 \pm 0,93$ %, *** $p < 0,001$) y S ($5,99 \pm 0,30$ % vs $16,39 \pm 0,90$ %, *** $p < 0,001$) del ciclo celular. Por su parte, el calcitriol también produjo un aumento de células en sub G0/G1 ($17,40 \pm 2,48$ % vs $10,45 \pm 1,675$ %, ** $p < 0,01$) con una disminución de células en la fase G2/M ($6,63 \pm 1,63$ % vs $15,79 \pm 1,08$ %, *** $p < 0,001$).

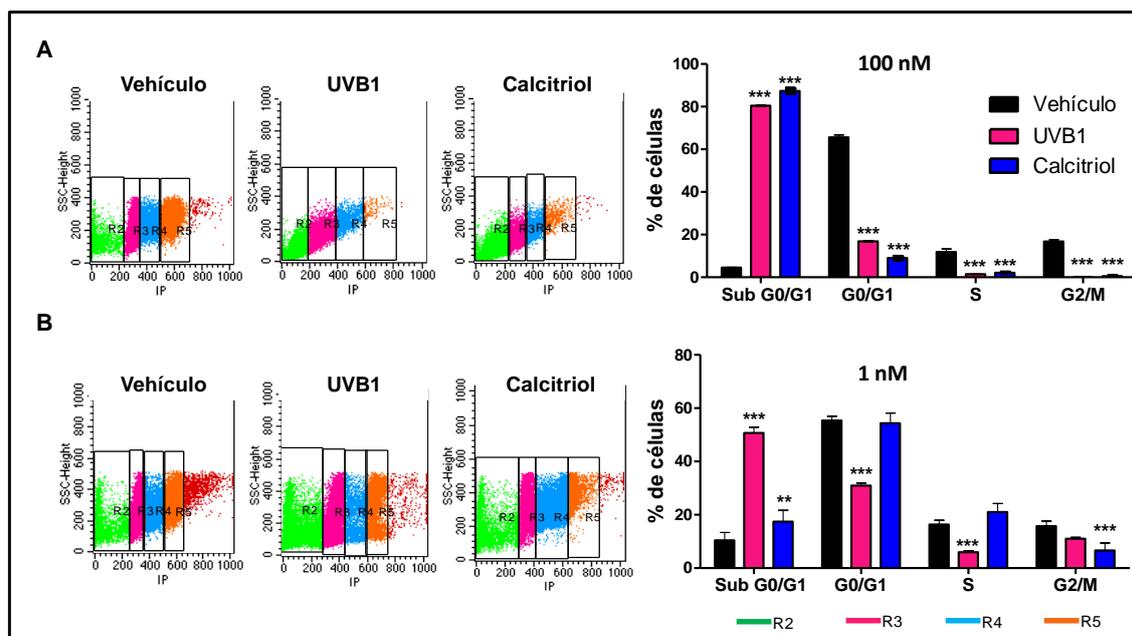


Figura 38. Análisis de la distribución de células HCT116 en las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo. Las células fueron expuestas al análogo UVB1, calcitriol o vehículo por 120 h. Se muestra la distribución de la población celular analizada por citometría de flujo luego de la tinción con IP a una concentración de A) 100 nM y B) 1 nM. El gráfico de barras representa el porcentaje de células en las fases indicadas. Cada barra representa el promedio de tres repeticiones \pm SD. Se aplicó el test de ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Estos resultados sugieren que la disminución en la viabilidad celular observada en los ensayos de concentración - respuesta al tratar las células con el análogo o el calcitriol puede deberse a un aumento de la muerte celular por apoptosis.

Más importante aún, el UVB1 demostró ser tres veces más potente que el calcitriol en producir este incremento del porcentaje de células en sub G0/G1 sugiriendo que podría ser más efectivo que la hormona natural en la inducción de muerte celular ($50,69 \pm 1,22$ % vs $17,40 \pm 2,48$ %; $p = 0,0003$).

Para confirmar que efectivamente el análogo estaba induciendo apoptosis realizamos ensayos de TUNEL.

Como se puede observar en la **Figura 39**, el análogo produjo un incremento del porcentaje de células TUNEL positivas con respecto al control ($9,86 \pm 1,01$ % vs $7,38 \pm 0,38$ %; $p = 0,026$) mientras que no se hallaron diferencias significativas en el porcentaje de células TUNEL positivas cuando

las células fueron tratadas con calcitriol con respecto al vehículo ($7,57 \pm 0,45$ % vs $7,38 \pm 0,38$ %; $p > 0,05$).

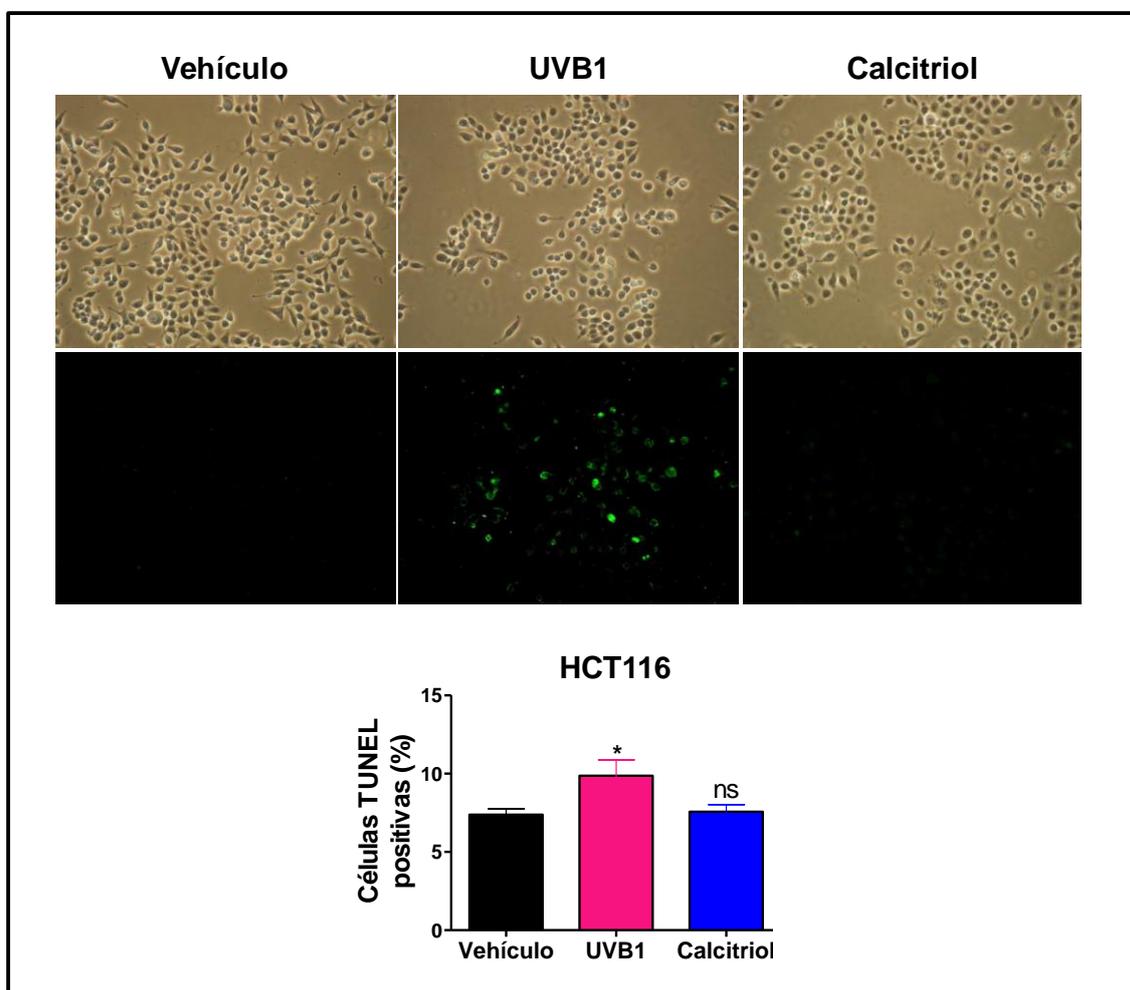


Figura 39. Ensayo de TUNEL en la línea celular HCT116. Las células fueron tratadas con vehículo, UVB1 o calcitriol (100 nM, 72 h). El gráfico de barras muestra el porcentaje de células TUNEL positivas. Cada barra representa el promedio de tres repeticiones \pm SD. Se realizó el test de ANOVA con posterior test de Bonferroni, * $p < 0,05$.

Los resultados previos nos demuestran que el UVB1 reduce la viabilidad celular en forma p53 dependiente y a través de la inducción de apoptosis. Sabiendo que p53 provoca apoptosis principalmente a través de un aumento de la proteína Bax, decidimos estudiar si el análogo modulaba la expresión de esta proteína pro-apoptótica.

Para ello, realizamos la técnica de WB luego de tratamiento de las células con el análogo o calcitriol a una concentración de 100 nM. Como se

observa en la **Figura 40** el UVB1, a diferencia del calcitriol, indujo un fuerte incremento en los niveles proteicos de Bax.

Aunque los resultados obtenidos en los experimentos descriptos previamente indican que el análogo no induce arresto del ciclo celular, igualmente evaluamos la expresión de dos importantes proteínas reguladoras del ciclo celular como son las ciclinas D1 y E y, tal como era de esperar, no se detectaron diferencias en los niveles de expresión de estas proteínas luego del tratamiento con 1 nM de UVB1 o calcitriol con respecto al control (**Figura 40**).

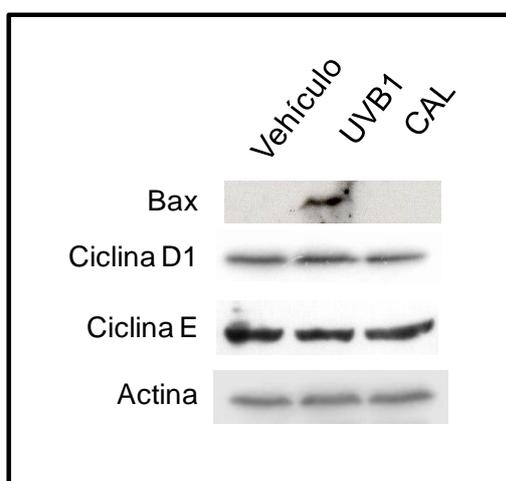


Figura 40. WB de células HCT116 tratadas con UVB1, calcitriol o vehículo. Se analizó la expresión de las proteínas Bax, ciclina D1 y ciclina E en las células luego del tratamiento con vehículo, UVB1 o calcitriol durante 96 h.

Efectos del UVB1 sobre procesos celulares y mecanismos moleculares relacionados con la metástasis

Al igual que en los otros tipos tumorales estudiados en esta tesis, evaluamos los efectos del análogo sobre los procesos celulares relacionados con la metástasis en las células de CCR. Con este fin comenzamos estudiando la influencia del UVB1 sobre la migración celular.

En cuanto a la línea celular HCT116, el UVB1 produjo un retraso de la migración celular a las 18 h de tratamiento comparado con el control (UVB1 vs vehículo: $67,40 \pm 3,54$ % vs $48,66 \pm 3,87$ %, ** $p < 0,01$; **Figura 41A**). A diferencia del análogo, no se observaron efectos sobre la migración celular en las células tratadas con calcitriol con respecto al vehículo ($p > 0,05$). Por lo

tanto, el análogo presentó una mayor capacidad que la hormona natural para la inhibición de la migración en esta línea celular.

Para investigar si el efecto del análogo sobre la migración celular también era dependiente de p53, evaluamos este proceso en la línea HCT116 p53 ^{-/-} tratada con el UVB1 o calcitriol. En la **Figura 41B** se observa que el tratamiento con el UVB1 no provocó diferencias significativas en la tasa de migración con respecto al control indicando que también este efecto del análogo-

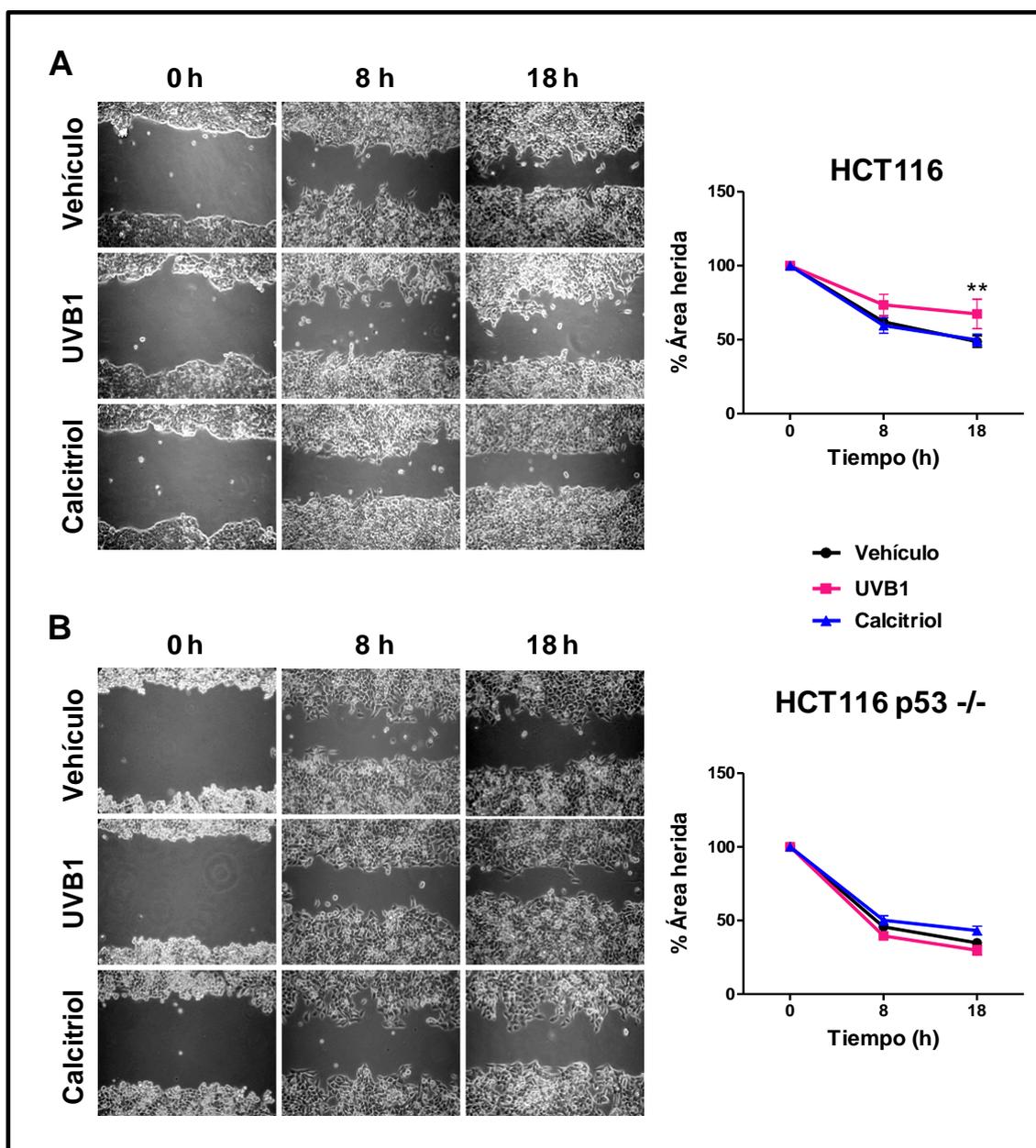


Figura 41. Evaluación de la migración celular luego del tratamiento con UVB1 y calcitriol sobre las líneas celulares de CCR. A) HCT116 y B) HCT116 p53 ^{-/-}. Las células fueron

expuestas a la concentración de 100 nM de UVB1, calcitriol o vehículo por un tiempo menor a 24 h. Se muestran fotos representativas a los distintos tiempos analizados (200x). El gráfico de líneas representa la media \pm SEM del porcentaje descubierto del área de la herida de tres ensayos independientes. Se analizó mediante el test de ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni, ** $p < 0,01$.

-go es dependiente de p53. Además, el calcitriol, a diferencia del UVB1, no provocó efectos sobre la migración celular en la línea HCT116 independientemente que esta exprese o no el gen supresor tumoral p53.

Teniendo en cuenta que el análogo UVB1 inhibió la migración celular de la línea HCT116 y sabiendo que el proceso de metástasis requiere tanto de un incremento en la capacidad migratoria como invasiva de las células tumorales, capacidades que se han reportado moduladas por el calcitriol y sus análogos en varios tipos celulares tumorales (Salomón *et al.*, 2014, Leysens *et al.*, 2013), nos propusimos evaluar si el tratamiento con UVB1 o calcitriol afectaba la capacidad invasiva de las células HCT116.

Para ello, empleamos el ensayo de invasión a través de cámaras *transwell* que detecta la capacidad de las células para atravesar una membrana cubierta con Matrigel[®], tal como se describió en “Materiales y Métodos”. Como se observa en la **Figura 42**, el tratamiento con el análogo o calcitriol redujo significativamente la capacidad invasiva de las células de la línea HCT116 en comparación con el vehículo (promedio del número de células invasivas \pm SD: UVB1: $77,23 \pm 2,74$; calcitriol: $84,93 \pm 1,66$ vs vehículo: $107,70 \pm 4,21$, *** $p < 0,001$).

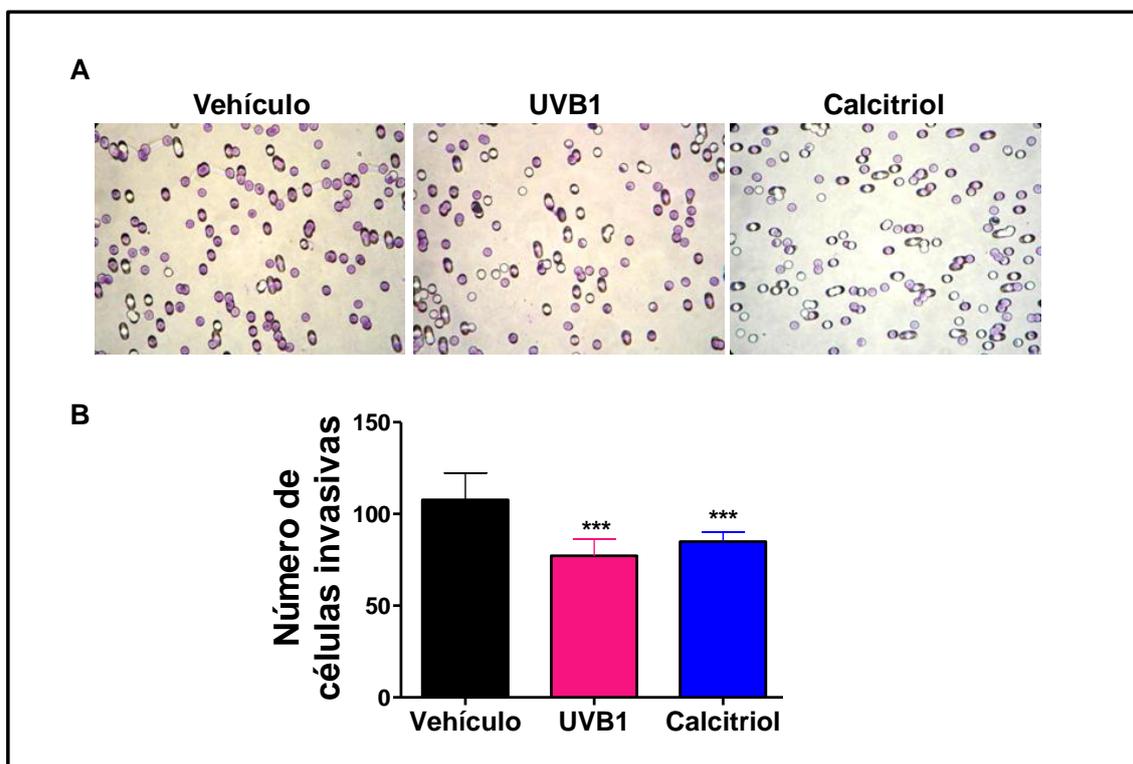


Figura 42. Ensayo de invasión celular en células HCT116. Las células fueron tratadas con vehículo, UVB1 o calcitriol (100 nM, 18 h) y se evaluó la capacidad invasiva utilizando cámaras *transwell* recubiertas con Matrigel®. A) Imágenes representativas del ensayo de invasión mostrando las células HCT116 que atravesaron la capa de Matrigel®. Magnificación: 400x. B) Cuantificación del número de células invasivas por campo luego del tratamiento. El gráfico muestra la media \pm SD. El ensayo se realizó por triplicado y se analizaron diez campos al azar de cada condición. Se aplicó el test de ANOVA con posterior test de Bonferroni. *** $p < 0,001$.

Como se mencionó anteriormente, el proceso de metástasis requiere de un incremento de la capacidad de las células tumorales para invadir la MEC. Parte de esta capacidad se logra aumentando la expresión y/o la activación de diferentes proteasas. Estas enzimas proteolíticas incluyen, entre otras, a las MMPs tales como las MMP-1, MMP-2, MMP-9, MT-MMP. En este sentido, en estudios con pacientes con CCR se encontró que los mismos presentaban niveles séricos altos de la MMP-2 (Roy *et al.*, 2009) y esta MMP junto con la MMP-9 son biomarcadores pronósticos de este tipo de carcinoma (Araújo *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta estos antecedentes y con el objetivo de determinar si el análogo UVB1 modulaba la actividad de estas dos MMPs, evaluamos mediante la técnica de zimografía la actividad proteolítica (gelatinasa) de las MMP-2 y MMP-9 en las células HCT116 tratadas con 100 nM de UVB1 o calcitriol o vehículo durante 18 h.

Como se observa en la **Figura 43**, el análogo inhibió la actividad de ambas MMPs, dado que redujo la actividad de las MMP-2 y MMP-9 ($82,32 \pm 2,42 \%$ y $76,12 \pm 4,05 \%$ respectivamente, con respecto al control considerado 100%). Por su parte el calcitriol también provocó una disminución de la actividad de las MMP-2 y MMP-9 ($71,17 \pm 4,32 \%$ y $78,26 \pm 7,07 \%$ respectivamente, con respecto al control considerado 100%).

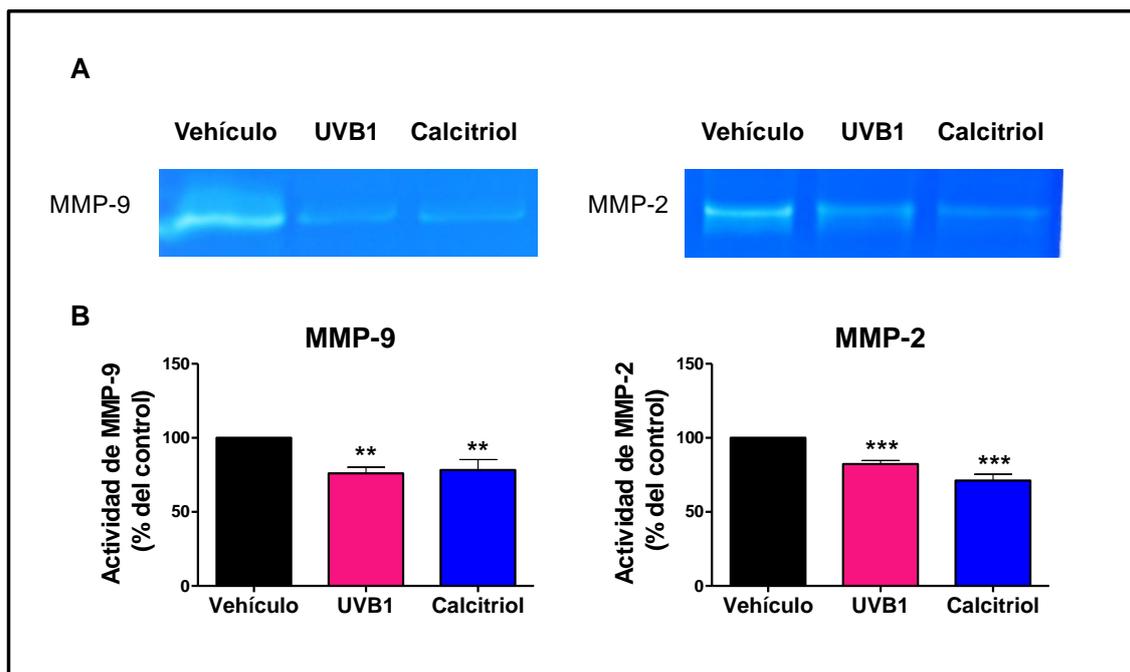


Figura 43. Evaluación de la actividad de las MMP-9 y MMP-2 secretadas por las células HCT116. Zimografía realizada con el medio condicionado del cultivo de células HCT116 tratadas con vehículo, UVB1 o calcitriol (100 nM, 18 h). A) Visualización de la actividad de las MMP-9 y MMP-2. B) Cuantificación de las bandas usando el *software ImageJ* y normalizadas con la cantidad de células del pocillo. El gráfico muestra la media \pm SEM de tres ensayos independientes. Se analizó mediante el test de ANOVA con posterior test de Bonferroni, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Estos resultados indican que el análogo UVB1 conserva la capacidad del calcitriol de inhibir, al menos en la línea celular HCT116, la actividad de estas dos MMPs implicadas en el desarrollo de metástasis en el CCR.

El calcitriol y algunos de sus análogos han demostrado promover la diferenciación epitelial de células de cáncer de colon humano mediante la inducción de la expresión de E-cadherina y la inhibición de la vía Wnt/ β -

catenina (Larriba *et al.*, 2011). Además, se ha reportado que la unión del calcitriol al VDR provoca que este último mantenga a β -catenina en citoplasma impidiendo su translocación a núcleo y la consecuente formación del complejo de transcripción β -catenina / TCF (Pálmer *et al.*, 2001). En base a estos antecedentes decidimos evaluar la expresión de E-cadherina, β -catenina y VDR en las células HCT116 luego del tratamiento con el análogo o calcitriol.

Al analizar la expresión de E-cadherina mediante IF, se registró un aumento de la proteína cuando las células fueron tratadas con UVB1 con respecto al control ($38,32 \pm 0,70$ % vs $17,00 \pm 5,70$ %; $p = 0,012$) mientras que el tratamiento con calcitriol no provocó diferencias significativas ($23,01 \pm 8,61$ % vs $17,00 \pm 5,70$ %; $p > 0,05$; **Figura 44A**). Estos resultados fueron corroborados mediante WB (**Figura 44C**).

A continuación se evaluaron los niveles proteicos de β -catenina luego del tratamiento de las células con UVB1 o calcitriol. Mediante IF, se registró un aumento de su expresión tanto con UVB1 ($61,50 \pm 8,08$ % vs $27,05 \pm 3,28$ %, *** $p < 0,001$) como con calcitriol ($45,65 \pm 4,31$ % vs $27,05 \pm 3,28$ %, * $p < 0,05$) con respecto al control (**Figura 44B**). Estos resultados fueron corroborados mediante WB (**Figura 44C**). Es importante destacar que también se detectó una mayor localización citoplasmática de β -catenina (**Figura 44B**) luego de tratar las células con UVB1 ($59,75 \pm 7,78$ % vs $20,16 \pm 3,06$ %, *** $p < 0,001$) o con calcitriol con respecto al control ($44,00 \pm 4,41$ % vs $20,16 \pm 3,06$ %, ** $p < 0,01$).

En cuanto a la expresión de VDR, detectamos mediante ensayo de WB que el análogo provocó un aumento del receptor mientras que el tratamiento de las células con la hormona no produjo cambios significativos con respecto al control (**Figura 44C**).

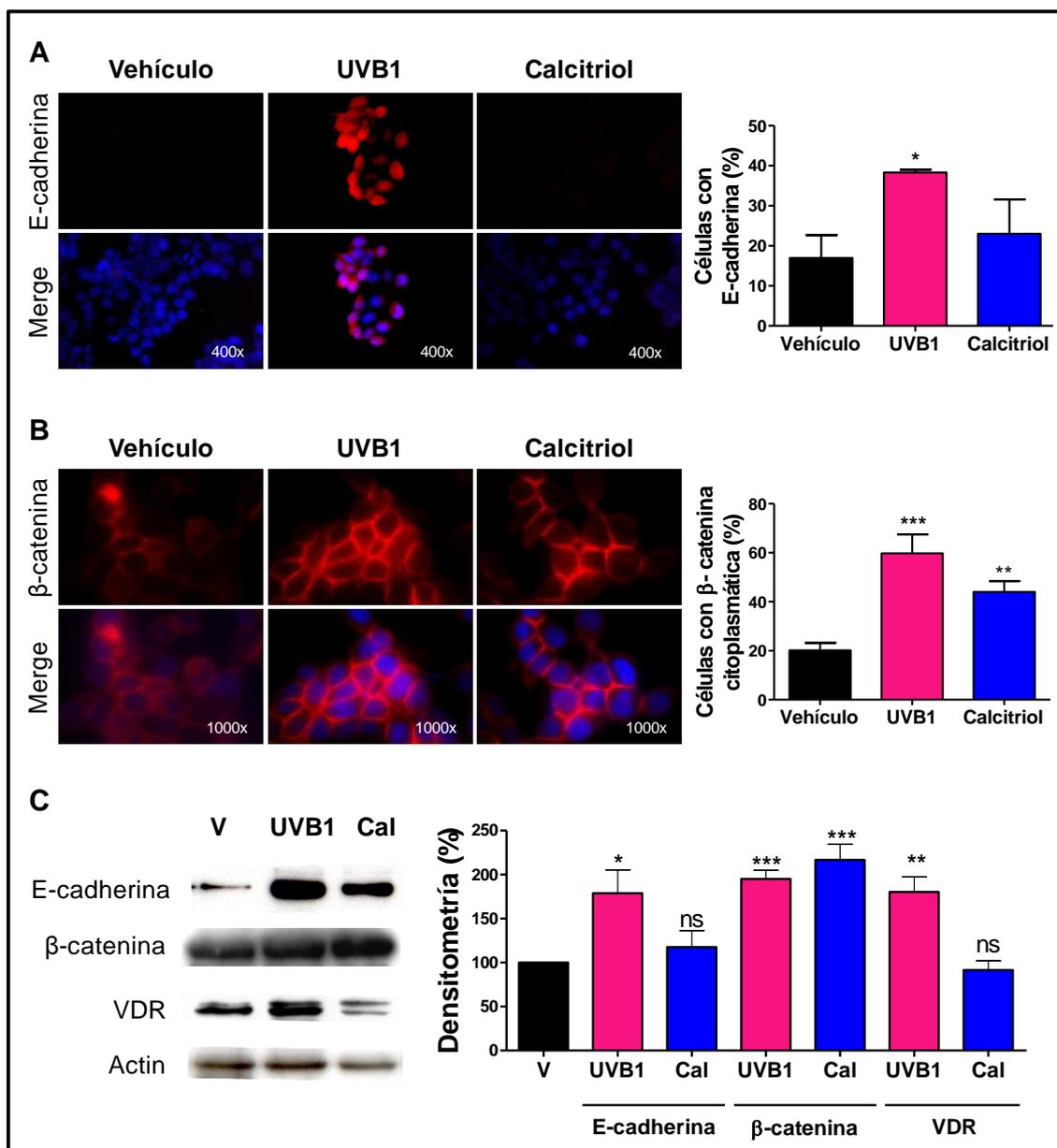


Figura 44. Estudio de los efectos de UVB1 o calcitriol sobre la expresión de E-cadherina, β-catenina y VDR. Las células HCT116 fueron tratadas con vehículo, UVB1 o calcitriol (100 nM, 96 h). Evaluación de la expresión de A) E-cadherina y B) β-catenina mediante IF. Cada barra representa el promedio ± SD de 10 campos al azar de cada condición. El ensayo se realizó por triplicado. C) Expresión de E-cadherina, β-catenina y VDR mediante WB. Las proteínas fueron normalizadas con actina. El gráfico de barras muestra la media ± SEM de tres experimentos independientes. Se analizó mediante el test de ANOVA con posterior test de Bonferroni. Ns: no significativo. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Estos hallazgos sugieren que el análogo puede inducir la diferenciación celular incrementando la adhesión célula - célula a través del aumento de la expresión de E-cadherina. Además, muestran que el UVB1 inhibiría la

proliferación celular reteniendo a β -catenina en el citoplasma, probablemente mediante la acción del VDR, e inhibiendo consecuentemente la vía de Wnt.

Estudio de los efectos del UVB1 en un modelo animal de xenotransplante subcutáneo con células de carcinoma colorrectal

El comportamiento de las células en cultivo puede ser diferente al de las células cuando se encuentran formando parte integral de los tejidos en los organismos. Por esta razón, es conveniente analizar, como parte de los ensayos preclínicos, si las respuestas a drogas antitumorales observadas en líneas celulares se repiten también en modelos animales. En este sentido, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos *in cultivo* con el análogo UVB1 en la línea celular HCT116, nos propusimos evaluar los efectos del análogo en el modelo animal de CCR. Para ello, las células HCT116 fueron implantadas subcutáneamente en ratones N:NIH(S)-*Fox1^{nu}* (nude). Cuando uno de los diámetros del tumor alcanzó los 4 - 5 mm, los animales se dividieron al azar en dos grupos y se trataron con vehículo o UVB1 (40 μ g/kg de peso).

Como se observa en la **Figura 45**, el tratamiento de los animales con UVB1 produjo una reducción significativa del volumen tumoral tanto *in vivo* como *ex vivo*. Los volúmenes tumorales *in vivo* antes del sacrificio fueron: vehículo: $3.467 \pm 813 \text{ mm}^3$ vs UVB1: $1.885 \pm 407 \text{ mm}^3$, ** $p < 0,01$; **Figura 45A**. Los volúmenes tumorales *ex vivo* de cada grupo fueron: vehículo: $2.563 \pm 703 \text{ mm}^3$ vs UVB1: $916 \pm 153 \text{ mm}^3$, * $p < 0,05$; **Figura 45B**.

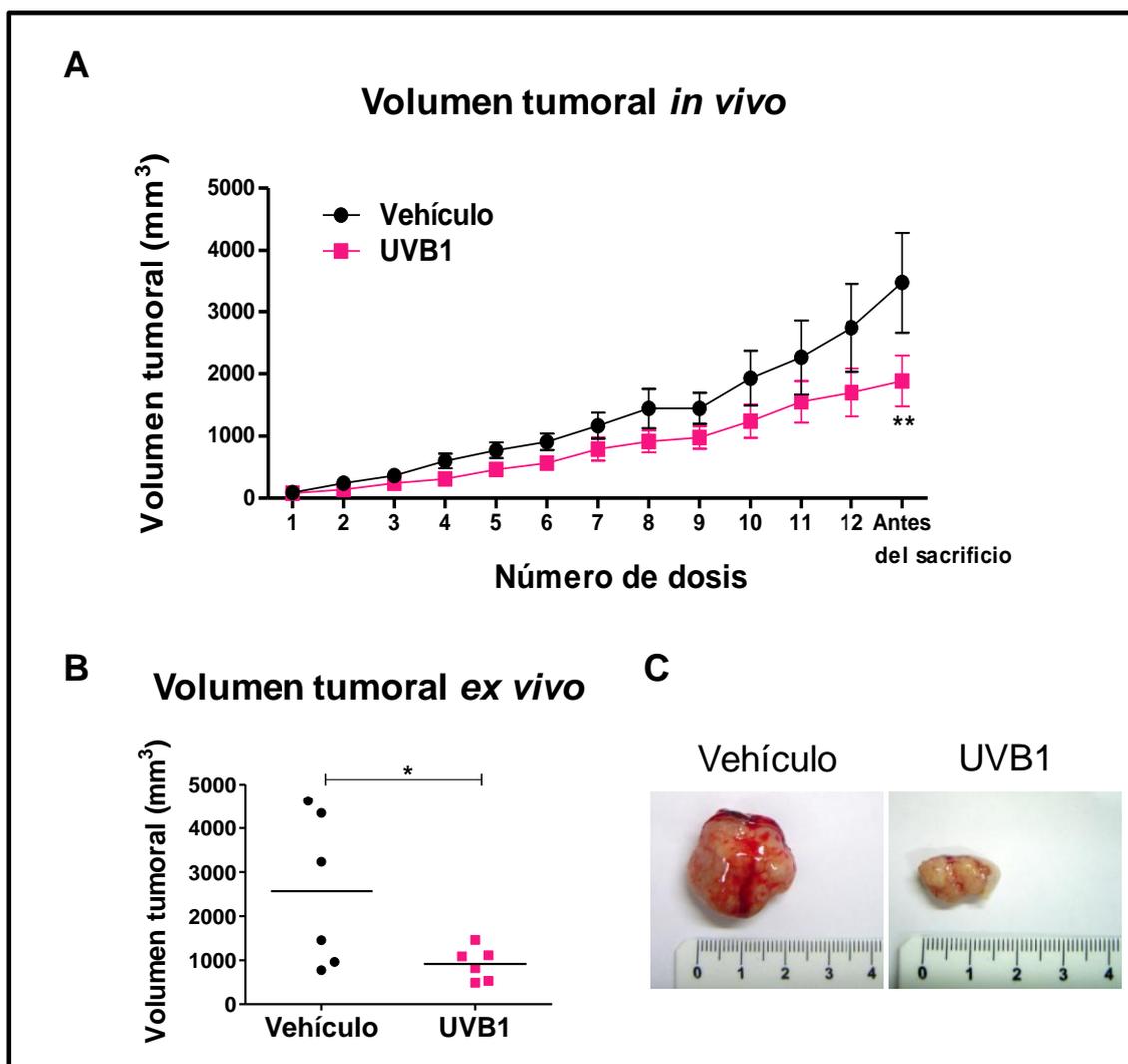


Figura 45. Efecto del análogo UVB1 en un modelo animal de xenotransplante subcutáneo de células HCT116 en ratones N:NIH(S)-Fox1^{nu} (nude). Los animales fueron tratados con 12 dosis de 40 µg/kg de peso de UVB1 o vehículo. A) El gráfico muestra el crecimiento del volumen tumoral *in vivo* para cada grupo. Se realizó un test de ANOVA con posterior test de Bonferroni, ** $p < 0,01$. B) El gráfico muestra el volumen tumoral *ex vivo* para cada grupo experimental. Se aplicó el test de Student, * $p < 0,05$. C) Fotografías representativas de tumores de cada condición.

A partir de este importante efecto antitumoral observado en los ratones tratados con UVB1, decidimos comenzar a investigar si los mecanismos subyacentes implicados en la reducción del tamaño tumoral eran coincidentes que los observados en los experimentos con las células HCT116 en cultivo. Con este objetivo analizamos si el análogo produjo efectos sobre los procesos de proliferación y/o apoptosis en los tumores primarios de estos animales. Para evaluar la proliferación celular, se cuantificó el número de figuras mitóticas en cortes teñidos con H&E y se analizó la expresión de Ki-67 por IHQ. También

evaluamos los niveles de expresión de las proteínas pro-apoptóticas p53 y Bax mediante IHQ.

Como se observa en la **Figura 46A** no se hallaron diferencias significativas en el número de figuras mitóticas entre ambos grupos (media del número de figuras mitóticas en los tumores de los animales tratados con UVB1: 67 ± 10 vs vehículo: 68 ± 8 ; $p > 0,05$). En concordancia con este resultado, la expresión de Ki-67, un marcador de proliferación, fue similar en ambos grupos (media del score promedio de cada ratón tratado con: UVB1: $0,842 \pm 0,87$ vs vehículo: $0,915 \pm 0,27$; $p > 0,05$; **Figura 46B**).

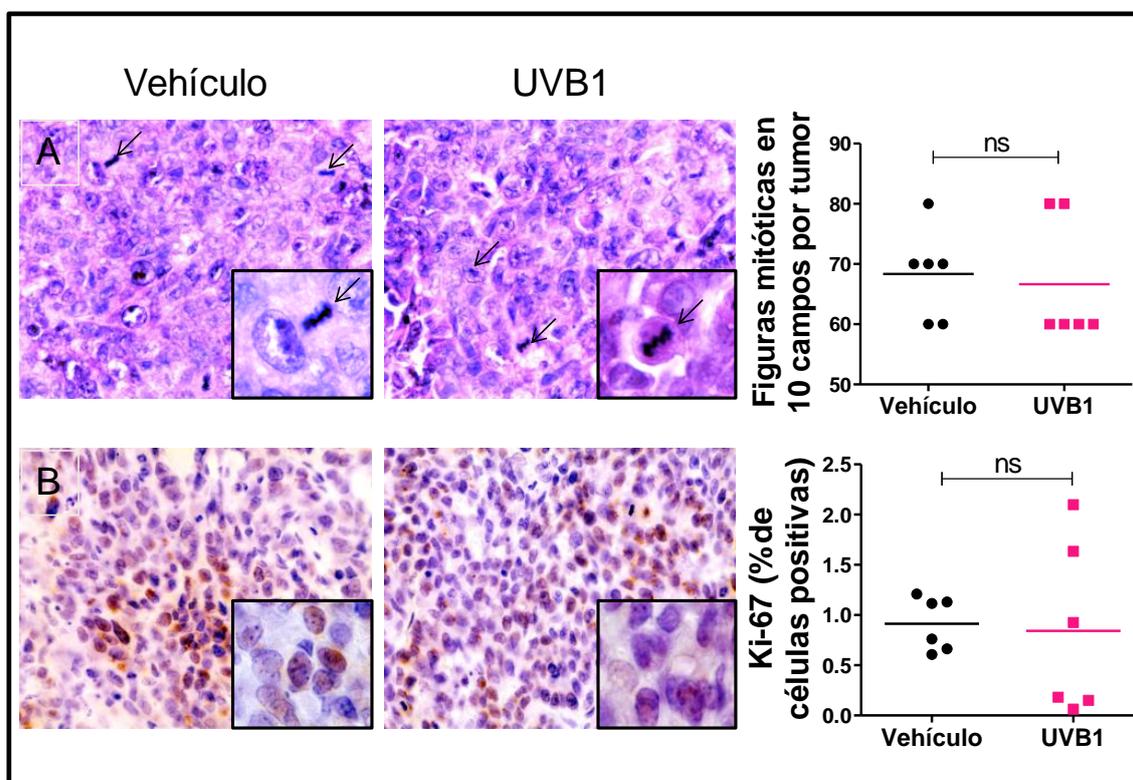


Figura 46. Efecto del UVB1 sobre el índice mitótico y la expresión de Ki-67 en los tumores del modelo animal. A) Evaluación de las figuras mitóticas en preparados coloreados con la técnica de H&E y de B) la expresión de Ki-67 detectada por IHQ. Se muestran fotomicrográficas representativas (izquierda) y sus correspondientes semicuantificaciones (derecha). Magnificación: 400x y 1000x. Se aplicó el test de *Student*. Ns: no significativo. $p > 0,05$.

Como se puede observar en la **Figura 47**, en relación a las proteínas pro-apoptóticas p53 y Bax, se pudo detectar un incremento significativo en los niveles de expresión de ambos supresores tumorales en los tumores de los

animales tratados con UVB1 con respecto al control (media del IRS para p53 de los tumores tratados con UVB1 vs vehículo: $1,02 \pm 0,47$ vs $0,38 \pm 0,40$; $p = 0,031$; **Figura 47A**; media del IRS para Bax de los tumores tratados con UVB1 vs vehículo: $2,90 \pm 3,02$ vs $0,57 \pm 1,09$; $p = 0,030$; **Figura 47B**)

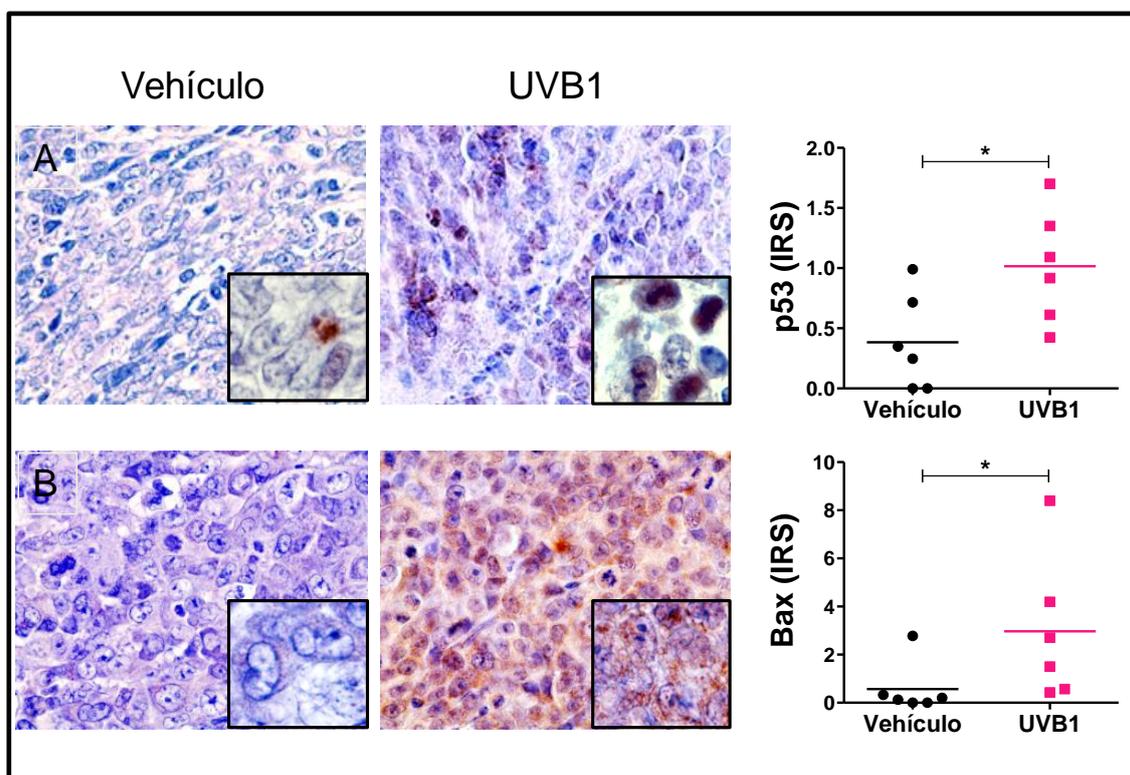


Figura 47. Efecto del UVB1 sobre las proteínas pro-apoptóticas p53 y Bax en los tumores del modelo animal. Evaluación de la expresión de A) p53 y B) Bax mediante IHQ. Se muestran fotomicrografías representativas (izquierda) y sus correspondientes semicuantificaciones (derecha). Magnificación: 400x y 1000x. Se aplicó el test de *Student*. * $p < 0,05$.

Como se describió, los resultados obtenidos *in cultivo* mostraron que el análogo puede inducir la diferenciación celular a través del aumento de la expresión de E-cadherina y limitar la acción de β -catenina en el núcleo probablemente mediante su interacción con VDR. Por esta razón, decidimos evaluar la expresión de las proteínas E-cadherina, β -catenina y VDR en los tumores de los ratones tratados con el análogo con respecto a los tumores de los animales control.

Como se muestra en la **Figura 48A**, el tratamiento de los ratones con UVB1 produjo un aumento de la expresión de E-cadherina en los tumores con respecto al control (media del IRS de los tumores tratados con UVB1: $1,69 \pm 0,84$ vs vehículo: $0,97 \pm 0,37$; $p = 0,004$; **Figura 48A**). Además se halló una reducción de la expresión de β -catenina nuclear con respecto al control (media del IRS de los tumores tratados con UVB1: $0,90 \pm 0,70$ vs vehículo: $2,04 \pm 0,84$; $p = 0,015$, **Figura 48B**), conjuntamente con un aumento de la expresión de β -catenina citoplasmática en los tumores tratados con UVB1 (media del IRS

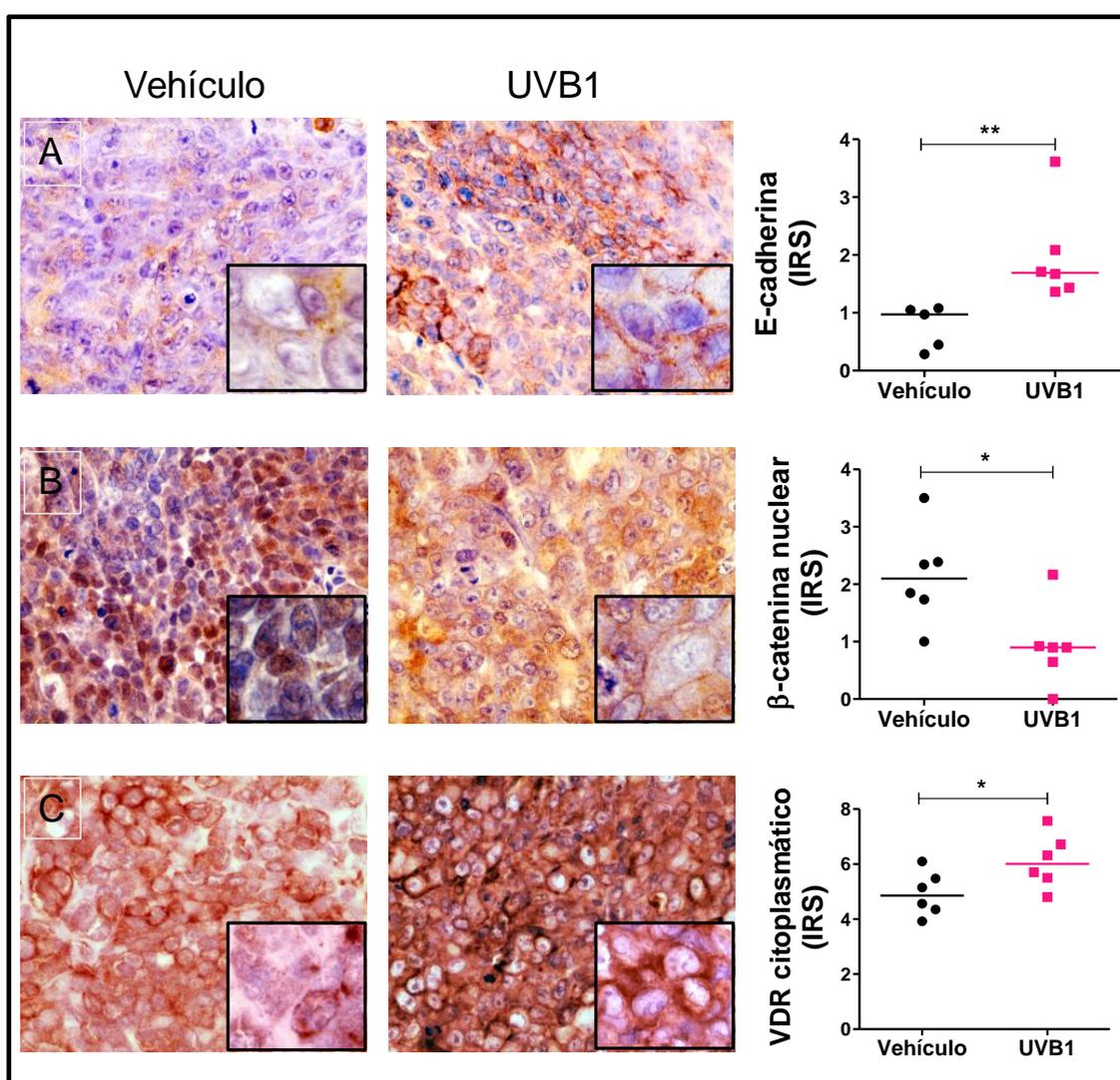


Figura 48. Efecto de UVB1 sobre la expresión de E-cadherina, β -catenina y VDR en los tumores del modelo animal. Evaluación de la expresión de A) E-cadherina, B) β -catenina y C) VDR mediante IHQ y sus correspondientes semicuantificaciones. Se muestran fotomicrografías representativas. Magnificación: 400x y 1000x. Se aplicó el test de Mann Whitney. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

de los tumores tratados con UVB1: $2,38 \pm 1,17$ vs vehículo: $1,22 \pm 1,01$; $p = 0,036$). En relación a la expresión del receptor VDR, el análogo provocó un aumento de su expresión total (media del IRS de los tumores tratados con UVB1: $8,52 \pm 0,75$ vs vehículo: $7,16 \pm 0,99$; $p = 0,041$) y un aumento de la expresión de VDR citoplasmático (media del IRS de los tumores tratados con UVB1: $6,01 \pm 0,98$ vs vehículo: $4,93 \pm 0,80$; $p = 0,046$; **Figura 48C**).

Por lo tanto los resultados obtenidos *in vivo* se encuentran en concordancia con los resultados obtenidos *in cultivo* y sugieren que el análogo impide el crecimiento tumoral mediante la inducción de apoptosis o de diferenciación celular.

Con la finalidad de determinar si el tratamiento de los ratones con UVB1 durante el ensayo de xenotransplante subcutáneo con células HCT116 generaba algún efecto secundario o tóxico indeseable, también aquí monitoreamos el peso corporal de los animales a lo largo del ensayo, la calcemia, el hematocrito y la histología de los órganos de los animales.

Como se puede observar en la **Figura 49 A y B**, los valores de calcemia y hematocrito de los ratones se mantuvieron dentro de los parámetros normales. En cuanto al peso corporal de los ratones no se detectaron variaciones significativas entre el peso promedio de los animales tratados con UVB1 o vehículo (**Figura 49C**). Por otro lado, el análisis histológico de hígado, riñones y bazo de los ratones no evidenció lesiones o alteraciones patológicas al final del período de tratamiento con el análogo, reafirmando la evidencia que la dosis de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso administrada durante un mes no resultaría nociva para estos animales (**Figura 49D**).

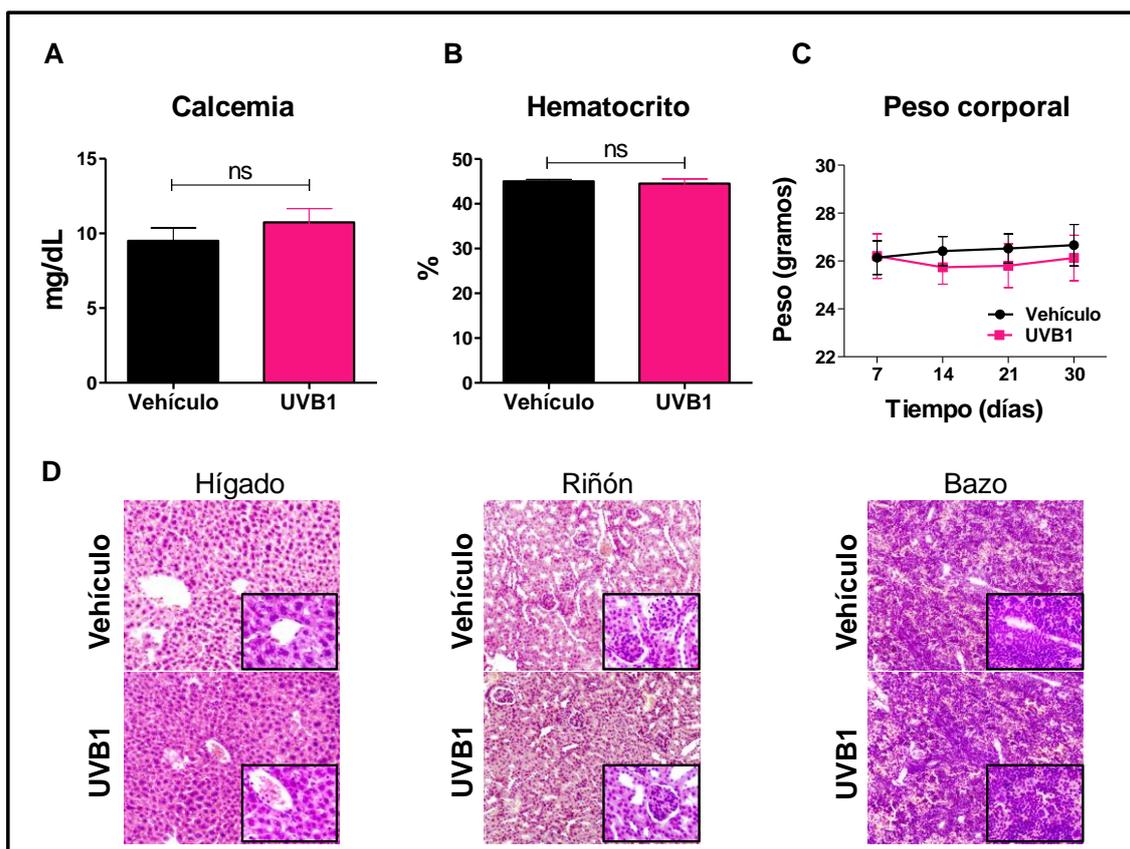


Figura 49. Estudios preliminares de toxicidad del UVB1. Los animales fueron tratados con 12 dosis de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso de UVB1 o vehículo. Se muestran los A) valores de calcemia, B) valores del hematocrito, C) peso de los ratones durante el tratamiento y D) histología de hígado, riñón y bazo de los ratones. Magnificación: 100x y 400x. En los gráficos se representa el promedio de los niveles de calcio plasmático, hematocrito y peso de los ratones de cada grupo \pm SD. Se aplicó el test de *Student* para la calcemia y el hematocrito y ANOVA de dos vías con posterior test de Bonferroni para el peso corporal. Ns: no significativo. $p > 0,05$.

3. Análisis bioinformático de la interacción molecular entre el análogo UVB1 y el VDR

Como se describió en la sección “Introducción”, las acciones biológicas del calcitriol pueden estar mediadas por el receptor VDR, tanto a nivel genómico como no genómico (Feldman *et al.*, 2014). Nos propusimos evaluar mediante estudios computacionales si el análogo UVB1 era capaz de unirse al VDR y, de ser posible su unión, describir sus interacciones con el receptor comparándolas con las establecidas por el calcitriol.

Los estudios de modelado molecular entre el UVB1 y el dominio de unión a ligando del VDR (LBD - VDR) se realizaron mediante la aplicación de técnicas computacionales, tales como *docking* molecular, dinámica molecular (DM) y análisis de la energía libre de unión. También se llevó a cabo el estudio comparativo entre los patrones de interacción intermoleculares del UVB1 y calcitriol con el VDR con el objeto de establecer una relación estructura - actividad con los resultados experimentales presentados anteriormente.

La estructura cristalina de LBD - VDR unido a su ligando natural, el calcitriol, ha sido reportada por Rochel y col. (Rochel *et al.*, 2000) y corresponde a la conformación activa del VDR (es decir, contiene un dominio AF-2 activado), por lo que se decidió realizar los estudios de *docking* molecular del UVB1 sobre esta estructura cristalográfica. La **Figura 50** presenta las interacciones intermoleculares entre el calcitriol y el VDR en la estructura cristalina correspondiente (**Figura 50C**) y las identificadas para el UVB1 con el VDR (**Figura 50D**) obtenidas mediante la aplicación de los procedimientos de acoplamiento molecular. En la **Figura 50C** se muestran las interacciones intermoleculares establecidas en el complejo calcitriol - LBD - VDR, las cuales corresponden a interacciones críticas previamente reportadas para la modulación alostérica del VDR por el metabolito activo (Malinska *et al.*, 2015; Rochel *et al.*, 2000). Entre las interacciones que presentan especial interés cabe citar una red de enlaces puentes de hidrógeno que involucran los residuos Ser237, Arg274, Ser278, Tyr143, His305 y His397. Además, varias interacciones de Van der Waals se establecen entre el calcitriol y los residuos Ser275, Cys288, Leu233, Ile271, Trp286, Ile268, Leu309, Leu227 y Met272 del VDR. Con excepción de Ile268, todos estos residuos también interactuaron con el análogo UVB1 (**Figura 50D**). Asimismo, varias interacciones de Van der Waals adicionales se establecieron con el análogo, a saber: los residuos Tyr147, Val234, Leu404, Leu230, Leu313, Val300, Tyr401 y Leu414 (**Figura 50E**). Así, estas observaciones demuestran que el UVB1 es capaz de acoplarse al sitio de unión a ligando del VDR, estableciendo interacciones homólogas a las del calcitriol y, por lo tanto, provocar una modulación alostérica del receptor.

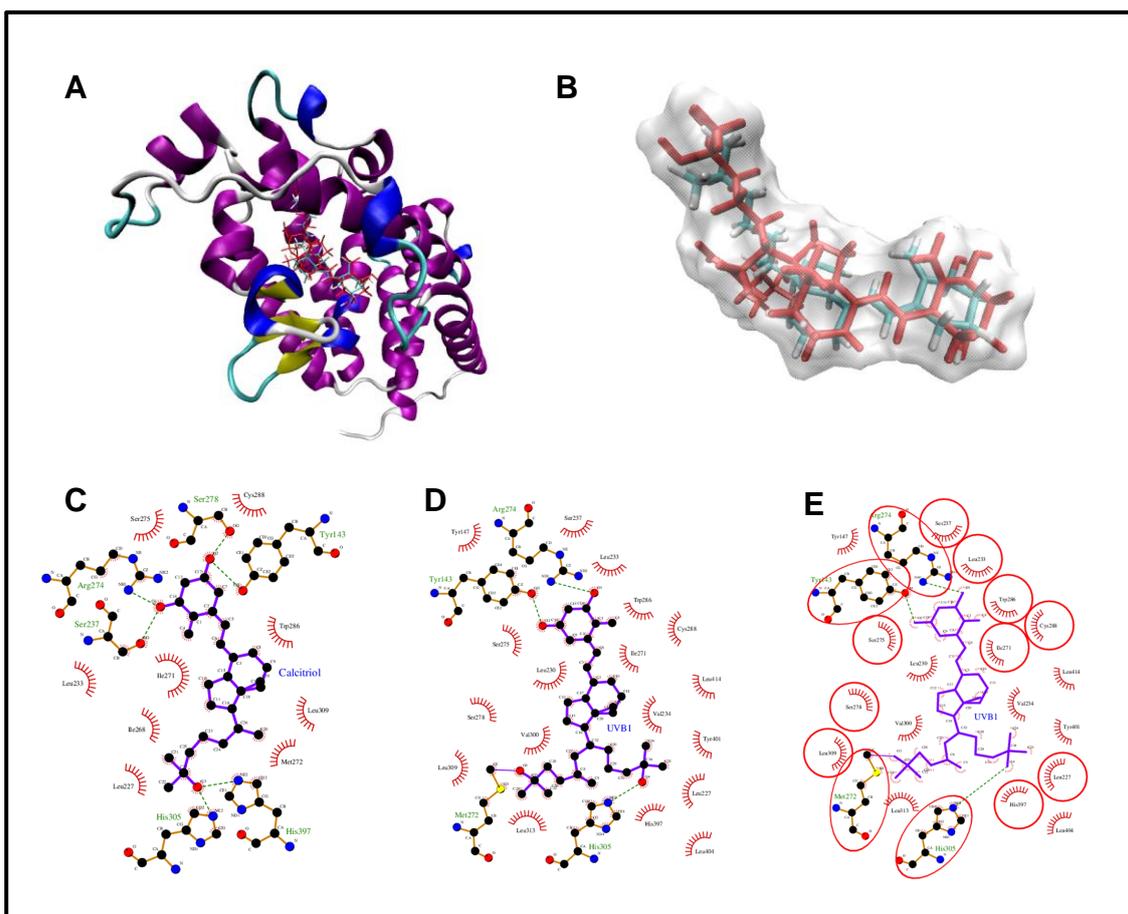


Figura 50. Docking molecular del UVB1 a la estructura cristalina del LBD - VDR. A) Comparación general de los modos de unión del UVB1 (rojo) o del calcitriol (celeste) al receptor VDR. B) Vista ampliada de las moléculas. Se puede ver que el modo de unión del UVB1 (rojo) al VDR es homólogo al del calcitriol (celeste). C) Interacciones intermoleculares entre el calcitriol y VDR. D) Interacciones intermoleculares entre UVB1 y VDR. E) Interacciones intermoleculares compartidas entre el calcitriol y UVB1 (círculos) y aquellas particulares para el UVB1 (elipses).

Para profundizar los estudios en cuanto a la afinidad del UVB1 por el VDR, así como los cambios estructurales ocurridos luego de la unión del análogo al receptor, se llevaron a cabo simulaciones de DM en condiciones explícitas de solvente. Los resultados indican que tanto el calcitriol como el UVB1 mantienen su unión al LBD - VDR durante los 20 ns de la trayectoria establecida en la DM. Las energías totales de interacción para cada ligando se presentan en la **Tabla 15**. El UVB1 exhibió una energía de interacción total menor en comparación con el calcitriol (-82,1 kcal/mol vs -74,4 kcal/mol), indicando una afinidad aumentada por el LBD - VDR. Esta característica se

origina como consecuencia del establecimiento de mayores interacciones de Van der Waals entre el UVB1 - LBD - VDR comparadas con el calcitriol.

Tabla 15. Componentes energéticos calculados por DM para la interacción intermolecular entre el calcitriol o el UVB1 con VDR.		
Componente	Calcitriol (Kcal/mol)	UVB1 (Kcal/mol)
Van der Waals	-63,2	-77,6
Electrostáticas	-28,5	-24,2
Gas	-91,7	-101,8
Solvatación polar	25,7	29,8
Solvatación no polar	-8,4	-10,1
Total	-74,4	-82,1

Con el fin de analizar los patrones de interacción intermoleculares por cada residuo para el UVB1 y calcitriol, se calcularon los perfiles de energía de interacción por residuo y la afinidad diferencial entre el calcitriol y el UVB1 (**Figura 51**). Como se puede observar en la **Figura 51 A y B**, el UVB1 exhibió un patrón de interacciones intermoleculares por residuos similar al del calcitriol, sugiriendo firmemente un modo de unión homólogo al LBD - VDR. La **Figura 51C** muestra la diferencia por residuo entre las energías de interacción calculadas para calcitriol y UVB1. El calcitriol mostró una mejor interacción con residuos polares (Ser237, Ser275, Ser278 y Tyr295), y el UVB1, a diferencia del calcitriol, exhibió interacciones energéticamente más estables con residuos tanto polares (Arg274, Glu277, His305 y His397) como apolares (Leu227, Val234, Val300, Ala303, Leu309, Ile310 y Leu404). Como se ha mencionado anteriormente, la mayor afinidad de unión del UVB1 en comparación con el calcitriol hacia LBD - VDR se debe principalmente a una mejor interacción con residuos apolares del receptor.

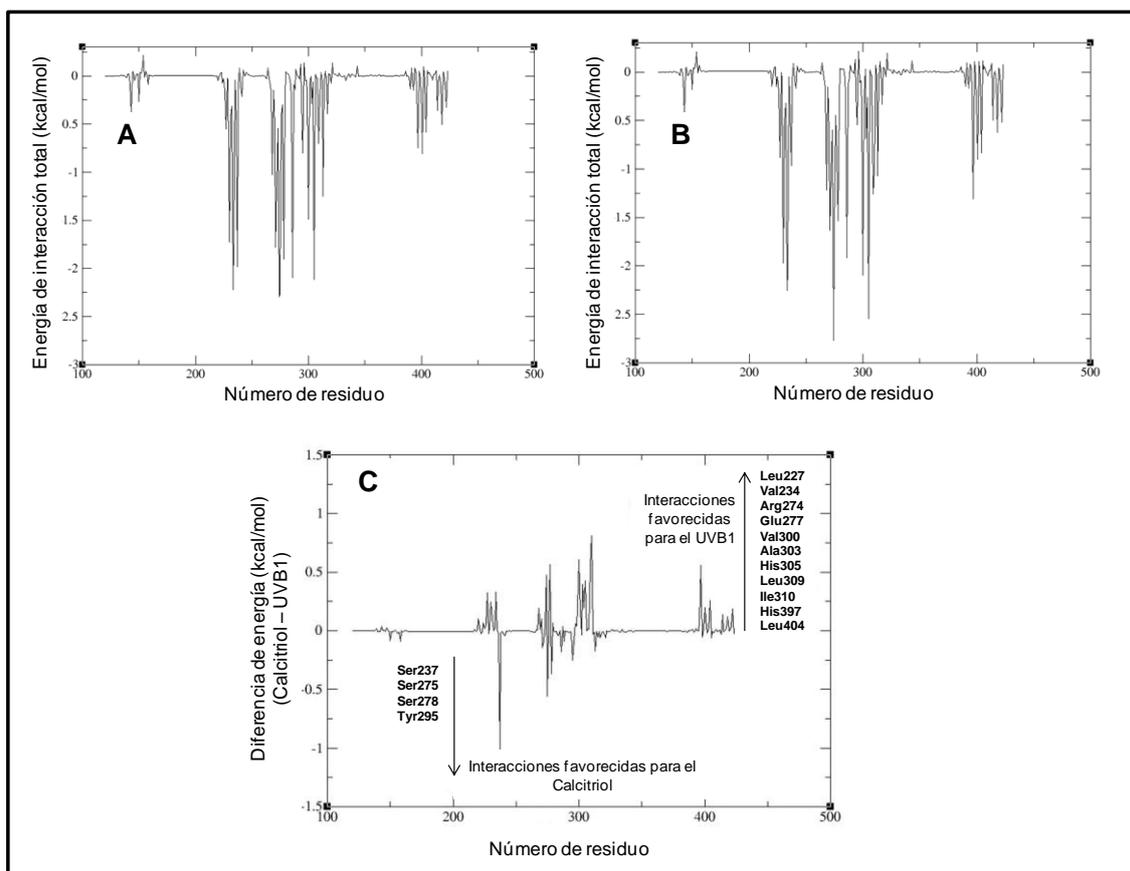


Figura 51. Patrones de interacción intermoleculares por residuo del UVB1 o calcitriol a VDR. Descomposición de la energía de interacción por residuos para la interacción entre A) calcitriol - VDR, B) UVB1 - VDR y C) Energías de interacción por residuos para el calcitriol - UVB1 que demuestran los puntos de contacto favorecidos para cada ligando.

Con el objetivo de profundizar los estudios sobre los efectos estructurales provocados por el UVB1 al unirse a la estructura tridimensional del VDR, se monitorearon las fluctuaciones posicionales atómicas (RMSF, del inglés *Root Mean Square Fluctuation*) a lo largo de la trayectoria de DM para la hélice H12 del VDR, utilizando como referencia la estructura cristalográfica reportada que corresponde a la conformación activada del VDR por encontrarse unida al calcitriol. Reportes previos relacionados con la activación alostérica del VDR han identificado el papel importante de esta hélice para mantener el dominio funcional AF-2 activado (Rochel *et al.*, 2000; Malinska *et al.*, 2015).

Como se muestra en la **Figura 52A**, el UVB1 fue capaz de mantener una disposición conformacional similar a la del calcitriol sobre la hélice H12. Este resultado sugiere que el UVB1 podría ser capaz de mantener una conformación

homóloga a la del calcitriol sobre AF-2. Estos hallazgos son un importante soporte a favor de la participación del VDR en los efectos antitumorales del UVB1.

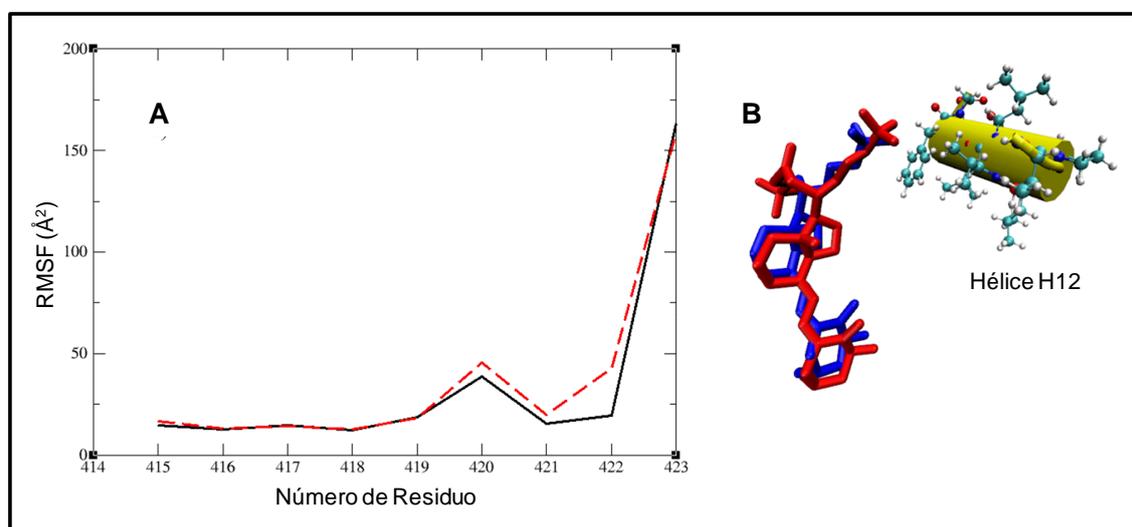


Figura 52. Fluctuaciones atómicas posicionales (RMSF) monitoreadas durante la simulación de DM para la hélice H12. A) RMSF respecto a los residuos de la H12 de la estructura cristalográfica activada del VDR, obtenidas durante las trayectorias de DM del calcitriol (línea negra continua) y UVB1 (línea roja punteada). B) Posiciones relativas del calcitriol (azul) y del UVB1 (rojo) a la hélice H12.

Por último, se calcularon los valores de las RMSF para el conjunto de las estructuras correspondientes a las trayectorias de DM del calcitriol y del UVB1 (**Figura 53**). Se registraron diferencias en varios residuos en los perfiles de RMSF correspondientes a los complejos de VDR con calcitriol o UVB1. Es de destacar que el UVB1 fue capaz de restringir las fluctuaciones de posición de dos residuos de la región de bisagra (His140 y Val159) en comparación con el calcitriol y de varias correspondientes al LBD (Arg252, His326, Leu378 y Phe406-Cys410). Varios trabajos en la bibliografía consultada sugieren que la región bisagra puede participar en facilitar el posicionamiento del LBD al ADN y modular la accesibilidad de la hélice H12 para reclutar co-reguladores (Orlov *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta que es necesario considerar la capacidad del ligando para reclutar co-activadores o co-represores luego de la unión al receptor y de esta manera modular la transcripción génica (Christakos *et al.*, 2015) se requieren estudios adicionales para evaluar si las características

estructurales que se presentan en la **Figura 53** pueden estar involucradas en las propiedades biológicas observadas para el UVB1 en cuanto a sus efectos antineoplásicos como sobre la actividad calcémica.

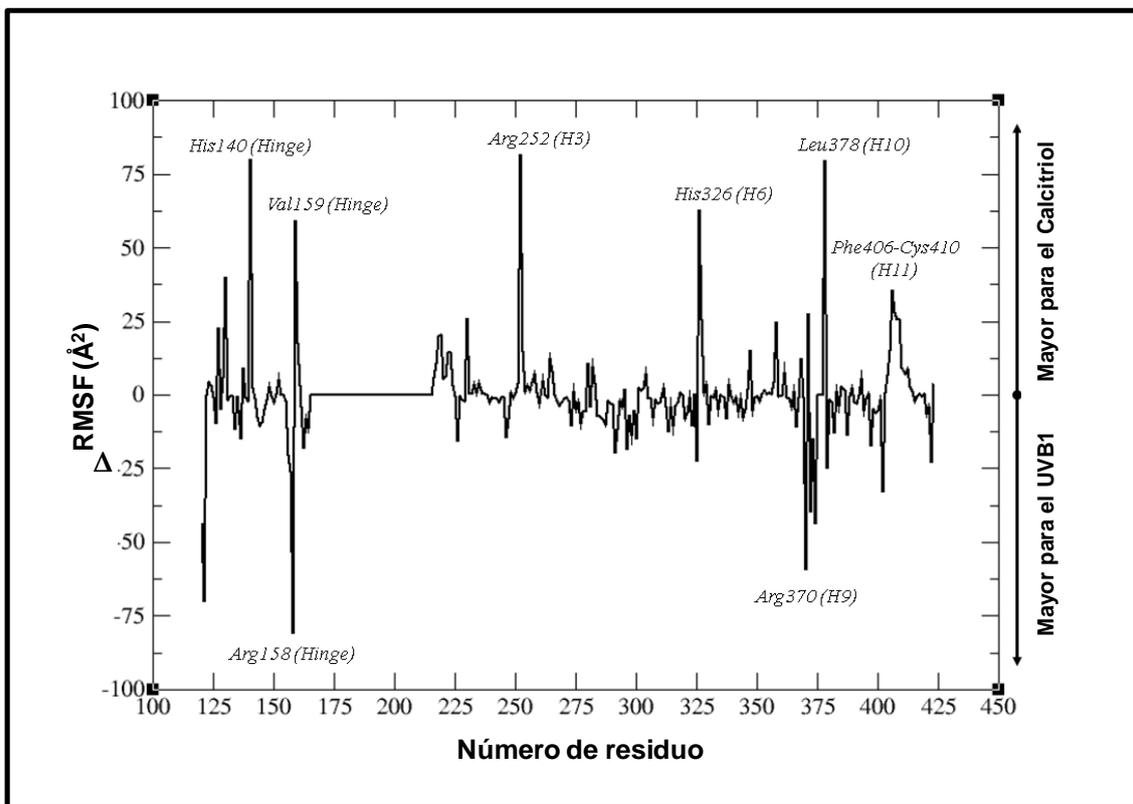


Figura 53. Diferencias entre las fluctuaciones estructurales posicionales moleculares (RMSF) calculadas para el calcitriol y el UVB1 sobre el VDR mediante simulaciones de DM.

DISCUSIÓN

Y

CONCLUSIONES

Como se ha mencionado en la sección “Introducción”, el descubrimiento de las propiedades pro-diferenciantes y anti-proliferativas del calcitriol en la década del '80 (Abe *et al.*, 1981; Colston *et al.*, 1981) constituyeron el estímulo para investigar nuevas aplicaciones terapéuticas de la hormona especialmente en el área del cáncer. Sin embargo, los efectos secundarios tóxicos, como la hipercalcemia, producidos por las dosis antitumorales efectivas o administradas en los ensayos clínicos, estimuló la búsqueda de análogos del calcitriol que conservaran o superaran las actividades biológicas del metabolito activo pero que carecieran de la actividad hipercalcémica. De esta manera se han sintetizado numerosos análogos del calcitriol. Sin embargo, solo un número limitado de ellos han sido probados en ensayos clínicos, obteniéndose, en ciertos casos, resultados promisorios (Leyssens *et al.*, 2013; Mehta *et al.*, 2013). Es por ello que se continúa con el diseño, la síntesis y la evaluación biológica de nuevos análogos, y, tal como se describió en la “Introducción”, varios de ellos se encuentran en ensayos clínicos en fase I y II. En este trabajo de tesis hemos estudiado los efectos antitumorales y la actividad calcemiente del nuevo análogo de calcitriol UVB1, que se caracteriza por ser un derivado tipo gemini, es decir presenta una estructura química similar a la del calcitriol con la novedad de poseer dos cadenas laterales unidas al C-20. El análogo fue obtenido a través de una ruta sintética flexible y versátil desarrollada en colaboración con el laboratorio Química Orgánica de la universidad de Vigo (España) y, actualmente, se está trabajando para dilucidar la lógica mecanicista detrás de la formación de la cadena lateral del UVB1 y el diseño de una síntesis estereoselectiva.

Como acabamos de mencionar, las dosis necesarias de calcitriol para inducir los efectos antitumorales producen hipercalcemia. Por esta razón, uno de los primeros ensayos preclínicos que se deben realizar con todo análogo del calcitriol es el estudio de su capacidad calcemiente. Los resultados de esta tesis indican que el UVB1 no produce hipercalcemia administrado a las dosis de 5 y 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, en forma repetida y durante un período prolongado de tiempo (30 días). Tampoco se observaron cambios en el comportamiento de los ratones ni efectos sobre el hematocrito, peso e histología de los órganos de los animales, tanto en los ensayos iniciales de

evaluación de la calcemia como en los modelos animales de cáncer desarrollados, indicando que el análogo resulta bien tolerado sin presentar efectos nocivos. Por el contrario, los ratones tratados con calcitriol evidenciaron efectos hipercalcemiantes a partir de las 24 h de su administración a la dosis de 5 µg/kg de peso corporal. Nuestros hallazgos concuerdan con los estudios reportados en la bibliografía sobre la hipercalcemia producida por el metabolito activo en ratones (Saito & Harada, 2014; Carballa *et al.*, 2012; Sharabani *et al.*, 2006). Es importante resaltar que el análogo fue administrado a tres cepas diferentes de ratones (CF1, nude y BALB/c) en dosis repetidas y, en una de ellas, durante un período de tiempo correspondiente al de los estudios subagudos de toxicidad, sin encontrarse signos adversos. Sin embargo, sería necesario continuar con los ensayos de toxicidad crónica conjuntamente con la estimación de los rangos terapéuticos y tóxicos del análogo para poder conocer cualquier tipo de efecto adverso a largo plazo y establecer la relación entre eficacia y toxicidad; estudios que se planifican llevar a cabo en el período postdoctoral.

Se ha reportado que el calcitriol tiene efectos diferenciales en distintos tipos de cáncer. Además, el análogo UVB1 ha sido recientemente sintetizado por nuestro grupo de investigación por lo que no contábamos con ningún conocimiento previo relacionado con sus posibles efectos antitumorales. Teniendo en cuenta estos hechos decidimos estudiar sus efectos antineoplásicos sobre diferentes líneas celulares correspondientes a cuatro tipos tumorales: glioblastoma multiforme, carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello, adenocarcinoma mamario y carcinoma colorrectal. Los resultados obtenidos demostraron que el UVB1 presentó algún grado de eficacia antitumoral en los cuatro tipos de tumores investigados y que su mecanismo de acción antineoplásico es dependiente del tipo tumoral en estudio.

Con respecto al glioblastoma multiforme los experimentos realizados con líneas celulares demostraron que tanto el UVB1 como el calcitriol disminuyen la viabilidad celular de líneas tumorales humanas (U251) y murinas (GL26). Sin embargo la comparación de las IC₅₀ obtenidas a partir de las curvas de concentración - respuesta a 120 h de tratamiento nos permite concluir que el

análogo presenta un efecto más potente que el calcitriol sobre la viabilidad de las células U251, mientras que la hormona ejerce un mayor efecto que el UVB1 sobre la viabilidad de las células GL26. En cuanto a la migración celular, ni el análogo ni el calcitriol provocaron efectos sobre estas dos líneas celulares. Con respecto a la línea de glioblastoma multiforme humana T98G ninguno de los dos compuestos afectó su viabilidad celular y solo el UVB1 disminuyó su capacidad migratoria. En relación a la falta de efecto del calcitriol sobre la viabilidad de estas últimas células, Zou y col. sugieren que se necesitaría una IC_{50} mayor a 100 nM para reducir la viabilidad celular (Zou *et al.*, 2000). Nosotros confirmamos esta hipótesis ya que en otras investigaciones de nuestro laboratorio utilizando una concentración de 1 μ M de calcitriol obtuvimos la reducción de la viabilidad celular de esta línea tumoral (Salomón *et al.*, 2014). Como se puede observar en este tipo tumoral obtuvimos distintas respuestas con el análogo o con el calcitriol en las diferentes líneas celulares. Como se mencionó en la “Introducción” se plantean varias hipótesis como consecuencia de la variabilidad de respuestas halladas entre líneas celulares tratadas con el calcitriol o sus análogos (Brown & Slatopolsky, 2008). Una de ellas involucra al catabolismo de los compuestos. Específicamente, la enzima 24-hidroxilasa se ha visto que, si bien presenta una mayor localización y actividad en riñón, se expresa en casi todos los tipos celulares (Luo *et al.*, 2013; Trump *et al.*, 2010), incluso en las células tumorales (Horváth *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2006). Cada vez se cuenta con mayor evidencia que relaciona la expresión elevada de esta enzima con una estimulación de la degradación del calcidiol y calcitriol (Luo *et al.*, 2013), lo que podría afectar sus acciones antitumorales, como también la de sus análogos. En relación a esto, resultados previos de nuestro laboratorio demostraron una mayor transcripción de la enzima en células T98G luego del tratamiento con calcitriol (Ferronato *et al.*, 2015). Esto sugiere que la falta de efectos sobre la viabilidad de estas células tratadas con la hormona, a concentraciones menores o iguales a 100 nM, podría deberse a que está siendo activamente degradada localmente por la 24-hidroxilasa. Este efecto podría también estar ocurriendo en las células T98G tratadas con el análogo. Dado que de los cuatro tipos tumorales analizados en esta tesis, los resultados obtenidos en las líneas celulares de glioblastoma multiforme fueron los más variables, y teniendo en cuenta el

tiempo de desarrollo habitual de una tesis, decidimos continuar con los estudios de los efectos antineoplásicos del análogo sobre los otros tipos tumorales anteriormente descritos. Los resultados obtenidos con el UVB1 sobre las líneas de glioblastoma multiforme (reducción de la viabilidad celular de las líneas GL26 y U251 y disminución de la capacidad migratoria de las células T98G) quedan como antecedentes para futuros estudios del laboratorio.

Como se detalló en la sección “Introducción”, el calcitriol puede ejercer sus efectos sobre la viabilidad celular a través de acciones anti-proliferativas y/o pro-apoptóticas que dependen del tipo tumoral y de su contexto. En concordancia con esta forma de acción, el análogo demostró la capacidad de provocar efectos sobre la inhibición de la proliferación o la inducción de la apoptosis dependiendo del tipo tumoral donde actúe, es decir, en células de CCECC, el análogo indujo un arresto del ciclo celular y, en cambio, en células de CCR el UVB1 redujo la viabilidad celular a través de la estimulación del proceso apoptótico. Estos resultados obtenidos con el análogo son coincidentes con reportes previos que muestran que el calcitriol también ejerce sus acciones anti-proliferativas mediante arresto del ciclo celular en otras líneas de CCECC (Kriebitzsch *et al.*, 2009; Gedlicka *et al.*, 2006; Satake *et al.*, 2003) y a través de efectos pro-apoptóticos en otras líneas de CCR (González Sancho *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2000).

En relación a los efectos anti-proliferativos sobre las células de CCECC, demostramos que el análogo provoca aumento de las ROS, especies oxidantes que podrían contribuir con el arresto del ciclo celular. Se ha visto que los niveles de ROS elevados pueden conducir a una toxicidad que conlleve a un arresto del ciclo celular o a la muerte celular por apoptosis (Lennicke *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2012). En particular, en células tumorales de mama, la generación de ROS es uno de los mecanismos propuestos que mediaría los efectos antitumorales del calcitriol ya que el metabolito activo inhibe el crecimiento de las células MCF-7 por la producción de un desequilibrio en el estado redox celular produciendo un arresto del ciclo celular y apoptosis (Bohl *et al.*, 2012; Marchionatti *et al.*, 2009; Koren *et al.*, 2001). Si bien se trata de otro tipo tumoral, el UVB1 podría estar actuando en el CCECC de una manera similar al calcitriol en cáncer de mama. De esta manera en las células HN13 el

análogo estaría induciendo arresto del ciclo celular como consecuencia del aumento de las ROS. Esto explicaría el aumento de la expresión de la enzima antioxidante HO-1 como probable mecanismo compensatorio. Por otro lado, los efectos anti-proliferativos del análogo en estas células también podrían estar mediados por el VDR, ya que encontramos un aumento en la expresión del receptor temporalmente coincidente con la reducción de la viabilidad celular, el arresto del ciclo celular y el incremento de las ROS provocados por UVB1. Como se ha descrito, el análogo produjo una disminución de la expresión de ciclina D1 en este tipo tumoral lo que sin duda está relacionado con el arresto de las células en la fase G1 del ciclo celular. Dado que se ha reportado que el VDR activado por unión a su ligando inhibe la transcripción del gen *CCND1* es probable que este efecto del análogo este mediado por el receptor.

Conjuntamente con la inhibición de las ciclinas, se ha demostrado que el calcitriol ejerce sus efectos anti-proliferativos modulando la expresión de los inhibidores del ciclo celular (Christakos *et al.*, 2015). Como ya hemos mencionado, se cuenta con evidencia de la participación del p27 en la inhibición del ciclo celular y/o en efectos relacionados con la migración celular. En este sentido se ha reportado que el calcitriol es capaz de inducir la síntesis y / o estabilización de esta proteína (Brown *et al.*, 2008). En cuanto a la modulación de este inhibidor por parte del análogo UVB1, si bien este compuesto no afectó su expresión en células de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello, produjo un aumento pronunciado de p27 en células de adenocarcinoma mamario. Este efecto del análogo sobre p27 podría explicar tanto sus acciones sobre la reducción de la viabilidad como de la migración celular. En relación a este último proceso, se ha descrito que la interacción de p27 con proteínas que regulan la dinámica del citoesqueleto es, al menos en parte, independiente de su acción inhibidora de complejos CDK - ciclinas. Si bien dependiendo del tipo y contexto celular o del enfoque experimental, el p27 citoplasmático puede inhibir o promover la motilidad celular (Besson *et al.*, 2004), Berton y col. probaron en cultivos tridimensionales de fibroblastos que el silenciamiento genético de p27 induce el cambio hacia un fenotipo con una morfología ameboide con mayor motilidad celular (Berton *et al.*, 2009). Coincidentemente en esta tesis se ha detectado una mayor expresión de p27

en células LM3 tratadas con el análogo y se pudo observar por IF su localización tanto en núcleo como en citoplasma. Este hallazgo podría relacionarse con la reorganización de los filamentos de actina de la línea celular LM3 luego del tratamiento con el análogo, dado que se evidenció una reducción significativa de la cantidad de células con fibras de estrés en todo el cuerpo celular indicativo de una disminución de la migración celular. De esta manera, el aumento de la expresión de p27 y su localización citoplasmática, sumado a la disminución de las fibras de estrés son eventos relacionados con los efectos anti-migratorios provocados por el análogo en estas células. Sin embargo, es necesario ampliar estos estudios ya que muchas de las modificaciones del citoesqueleto de actina que son necesarias para la migración celular están mediadas por distintas GTPasas de la familia Rho (Guo & Giancotti, 2004), algunas de las cuales se han visto moduladas por el calcitriol (Ordóñez Morán *et al.*, 2010). Dentro de esta familia se encuentran a Rho, Rac1 y Cdc42, que inducen la formación de fibras de estrés, lamellipodios y filopodios, respectivamente (Schenk *et al.*, 2015; Quintela-Fandino *et al.*, 2010; Christofori, 2006). Teniendo en cuenta esto, y que p27 ha demostrado bloquear la acción de RhoA (Besson *et al.*, 2004), es factible pensar que el UVB1 podría estar afectando la organización del citoesqueleto de actina mediante distintas Rho GTPasas, a través de su acción sobre p27.

Una de las características deseadas de los agentes antineoplásicos es su capacidad de actuación diferencial sobre las células tumorales con respecto a las células normales. En este sentido, demostramos que tanto el calcitriol como su análogo presentaron efectos semejantes sobre los procesos celulares estudiados en la línea epitelial no maligna HC11, es decir, ambos compuestos provocaron disminución de la viabilidad celular pero no afectaron la motilidad de las células HC11, la contraparte normal de las células LM3. Si bien la disminución de la viabilidad de las células no malignas es una respuesta indeseable de cualquier agente antineoplásico, el análogo afecta en menor medida a la línea celular HC11 dado que la IC_{50} para estas células resultó ser 14 veces superior a la IC_{50} de las células tumorales LM3. Esta diferencia que indica cierta especificidad en su acción sobre las células tumorales, conjuntamente con su capacidad de reducir la migración e invasión en estas

células sin afectar a las no malignas, son características atractivas para su potencial uso terapéutico. Con respecto al calcitriol, nuestros hallazgos sobre la reducción de la viabilidad de las células HC11 tratadas con la hormona concuerdan con los reportados por Katayama y col., quienes también demostraron que la exposición de las células HC11 a una concentración de 100 nM durante 72 h provoca una disminución del crecimiento de la línea por arresto en el ciclo celular en G0/G1 (Katayama *et al.*, 2003). En cuanto a la migración celular, nuestros resultados indican que el calcitriol no provoca efectos sobre la motilidad de la línea tumoral LM3 ni de su contraparte no maligna HC11.

Como ya se ha descrito, el análogo inhibió la migración e invasión celular de la línea tumoral mamaria murina LM3. En relación a estos efectos, es sabido que las MMPs contribuyen con el crecimiento del tumor primario y su capacidad de migración, invasión, angiogénesis y metástasis (Yadav *et al.*, 2014; Gialeli, 2011). Actualmente la familia de MMPs humana cuenta con 23 miembros (Radisky & Radisky, 2015; Yadav *et al.*, 2014); algunos de los cuales se han asociado con características pro- o anti-tumorales en diferentes estadios de la progresión del cáncer (Yadav *et al.*, 2014; Bottino *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2008; Scorilas *et al.*, 2001). Específicamente en cáncer de mama, niveles plasmáticos aumentados de las MMP-9 y MMP-2 se han relacionado con un peor pronóstico de las pacientes. Como se ha reportado, la actividad de estas dos MMPs no fue modulada por el tratamiento de las células LM3 con el UVB1. En este sentido hay que destacar que otras MMPs también han sido relacionadas con la progresión de este tipo tumoral, como las MMP-1 (Kulić *et al.*, 2012; Golubkov *et al.*, 2010; Hess *et al.*, 2003; Sternlicht *et al.*, 2000; Sympson *et al.*; 1995), MMP-3 (Wiseman *et al.*, 2003; Ahmad *et al.*, 1998), MMP-11 (González *et al.*, 2009), MMP-13 (Zhang *et al.*, 2008) y MMP-14 (Golubkov *et al.*, 2014 y 2012) que también contribuyen con la progresión tumoral mamaria y, por ende, afectan la sobrevida de las pacientes. Es posible que el UVB1 este modulando una o varias de estas MMPs para dar las características anti-invasivas demostradas en las células LM3. Por lo tanto, surge la necesidad de continuar con el estudio de la acción del análogo sobre estas otras MMPs.

Como se comentó en la “Introducción” de esta tesis, es sabido que alteraciones en la adhesión célula - célula y célula - componentes de la MEC tienen un rol central en facilitar la migración celular y, por consiguiente, promover la invasión y la diseminación metastásica. En este trabajo demostramos que el UVB1 aumenta la expresión de E-cadherina tanto en células tumorales mamarias LM3 como de carcinoma colorrectal HCT116; hecho que contribuye a justificar la disminución en la migración e invasión al tratar estas células con el análogo. Considerando también que la pérdida de expresión de E-cadherina en los tumores epiteliales es considerada el paso desencadenante del proceso de la TEM (Kalluri & Weinberg, 2009) este es un resultado alentador para comenzar a estudiar la influencia del análogo sobre dicha transición.

Como se detalló en la sección “Resultados”, el análogo demostró efectos variables sobre la viabilidad celular de líneas tumorales de adenocarcinoma mamario humano. Por un lado, el UVB1 redujo la viabilidad celular de la línea tumoral T47D y, por otro, no provocó efectos sobre las células MDA-MB-231. Esta variabilidad en los resultados podría deberse a diferencias en la expresión de los receptores hormonales de estrógeno y progesterona y del HER2 en estas líneas celulares. Así, la ausencia de efectos del UVB1 sobre la viabilidad en las células MDA-MB-231 puede deberse a la falta de estos receptores, los cuales se encuentran presentes en la línea tumoral mamaria T47D, respondedora al tratamiento con el análogo (ATCC HTB-133; Kritsanawong *et al.*, 2016). Indudablemente, se abre a partir de aquí una interesante línea de investigación de la posible interacción del análogo UVB1 con estos receptores que explique esta diferencia en los resultados obtenidos entre las dos líneas celulares humanas. Con respecto al calcitriol, nuestros hallazgos sobre la reducción de la viabilidad celular de ambas líneas de adenocarcinoma mamario concuerdan con los reportados en la bibliografía (Hillyer *et al.*, 2012; Kriebitzsch *et al.*, 2009; Pelczynska *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 1994).

Si bien los experimentos con líneas celulares constituyen una herramienta valiosa para evaluar la respuesta de las células a nuevas drogas, siempre es importante tratar de complementar estos estudios con modelos animales de cáncer como una aproximación al desarrollo de esta patología en

un organismo completo. Por esta razón, decidimos evaluar los efectos del UVB1 en un modelo animal para cada tipo tumoral estudiado. Los resultados obtenidos *in vivo* fueron variables dado que, a pesar de los efectos antitumorales obtenidos *in cultivo*, solo en un modelo animal, el correspondiente al CCR, el análogo reprodujo sus efectos antineoplásicos. En este sentido, si bien el UVB1 demostró efectos antitumorales en las líneas celulares de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello y adenocarcinoma mamario, no hallamos efectos sobre el volumen tumoral ni el proceso metastásico en los modelos animales correspondientes a estos dos tipos tumorales. Entre las posibles explicaciones de la falta de respuesta de los tumores de estos dos modelos animales de cáncer al tratamiento con el análogo, se encuentran las interacciones heterotípicas que se establecen entre las células tumorales y las del estroma, ausentes en los cultivos celulares (Hanahan & Coussens, 2012). Estas interacciones cooperativas pueden volver a las células cancerosas más resistentes a los efectos antitumorales del UVB1. De esta manera, puede ocurrir que las dosis administradas de análogo no resulten suficientes para contrarrestar estas acciones. Otras razones que pueden justificar la falta de efectos en los modelos animales corresponden a características propias de estos modelos murinos. En el caso del modelo animal utilizado para el CCECC, se pudo observar que, independientemente del tratamiento administrado, los tumores no se desarrollaron a lo largo del tiempo más allá del tamaño mínimo alcanzado inicialmente. Por esta razón, podría ser un modelo animal inadecuado para el esquema de tratamiento realizado. En cuanto al modelo animal de trasplante singeneico con células LM3 el desarrollo de los tumores primarios y de la implantación de metástasis en los pulmones es sumamente rápida. Por esta razón, el periodo de tratamiento es necesariamente corto (15 días) y podría estar ocurriendo que no resulte suficiente para evidenciar los efectos antitumorales del UVB1 presentados *in cultivo*. También es necesario remarcar que si bien en este modelo no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos se observó una tendencia a un menor número de metástasis en los animales tratados con el análogo. Por todas estas razones pensamos que sería necesario continuar con el estudio de los efectos del UVB1 en modelos animales de adenocarcinoma mamario y carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello

probando variaciones como un incremento en el número de animales empleado y/o en los esquemas de tratamiento del análogo (tiempo, dosis, vía de administración y pre-tratamiento) y/o trabajar con modelos murinos alternativos. De todos modos, cabe resaltar la importancia de la ausencia de efectos hipercalcemiantes en las dos cepas de ratones empleadas en los modelos murinos estudiados. Al igual que en los ensayos iniciales de calcemia, se confirmó nuevamente la falta de efectos sobre los niveles plasmáticos de calcio, el hematocrito y el peso corporal de los ratones. Cabe destacar que en la bibliografía existe evidencia de la falta de reproducibilidad de los resultados obtenidos en líneas celulares en los modelos animales, ya sea con calcitriol (Brüggemann *et al.*, 2010) o sus análogos (Eisman *et al.*, 1987).

Como se mencionó en la sección “Introducción”, el CCR es la tercera causa de mortalidad por cáncer en todo el mundo (IARC, GLOBOCAN 2012; Siegel *et al.*, 2014). En la actualidad, el tratamiento de los pacientes con esta patología incluye terapias combinadas. Los análisis moleculares que se realizan hoy para la elección de algunos de los quimioterápicos a utilizar incluyen la evaluación de la expresión del EFGR y la presencia del gen *KRAS* mutado (Caserras & Martínez, 2012). A pesar de esta caracterización existe una gran variabilidad entre los pacientes a las respuestas de los tratamientos y, en la mayoría de los casos, se manifiesta una elevada toxicidad. Por lo tanto, continúa resultando importante hallar nuevos fármacos para diseñar tratamientos novedosos combinados para el CCR. En relación a este tipo de tumor, demostramos que el análogo UVB1 presenta efectos antitumorales importantes. Nuestros estudios se realizaron sobre la línea celular de CCR humana HCT116, la cual se caracteriza por presentar los genes *APC* y *TP53* *wild type*, y *KRAS* mutado (Ahmed *et al.*, 2013; Alvarez-Díaz *et al.*, 2012). Si bien las células presentan *APC* *wild type*, la vía de señalización de Wnt se encuentra exacerbada dado que el gen *CTNNB1* (codificante de la proteína β -catenina) está mutado (Redondo Blanco *et al.*, 2014; Alvarez-Díaz *et al.*, 2012; Nutakul *et al.*, 2011). Los estudios realizados *in cultivo* y en modelos *in vivo* empleando estas células nos llevan a concluir que el UVB1: i) incrementa la muerte celular por apoptosis dependiente de la presencia de p53, ii) induce diferenciación celular y iii) posee efectos anti-metastásicos.

Específicamente, el UVB1 provoca una reducción de la viabilidad celular mediante la inducción de apoptosis dado que observamos que el análogo aumentó los porcentajes de células en sub G0/G1 del ciclo celular y TUNEL positivas con respecto al control. Este efecto pro-apoptótico sería dependiente de la presencia de p53 *wild type*, ya que, por un lado, la respuesta antitumoral desaparece al evaluar los efectos del análogo sobre la línea celular HCT116 p53 *-/-* y, por otro, hallamos una mayor expresión de esta proteína en los tumores de los animales que experimentaron una reducción del volumen tumoral al ser tratados con el análogo. Como hemos mencionado, si bien más del 50 % de los pacientes con CCR presentan mutaciones en *TP53* (Carethers & Jung, 2015), identificar compuestos con capacidad antitumoral que puedan ser empleados para aquellos pacientes con este gen supresor tumoral activo nos acerca a la estrategia de las terapias individualizadas. El UVB1 podría ser un potencial agente antineoplásico para ser utilizado en los esquemas de quimioterapia de estos pacientes. Igualmente, el análogo ha demostrado, además de su acción pro-apoptótica dependiente de p53, otros mecanismos de acción antitumorales que podrían ser empleados para el tratamiento de los pacientes que presenten *TP53* mutado. Además, la proteína pro-apoptótica Bax posiblemente se encuentre implicada en el mecanismo molecular de acción del UVB1 dado que el análogo aumentó su expresión tanto en los ensayos *in cultivo* como en los tumores del modelo animal. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el análogo induce apoptosis incrementado los niveles de p53 (¿a través de la inducción de ROS?), y este factor de transcripción induce la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax (**Figura 54**). Con respecto al calcitriol, como se pudo observar en los experimentos de citometría de flujo (**Figura 38**), los resultados sugieren que la hormona induce muerte celular por apoptosis (aunque en menor medida que el análogo). Esto contrasta con los resultados mostrados en la **Figura 39** en la que no se observa un incremento en el porcentaje de células TUNEL positivas cuando la línea celular HCT116 es tratada con el calcitriol. Sin embargo, esto puede deberse a la diferencia en los tiempos de tratamiento utilizados en los experimentos (120 h en la citometría de flujo y 72 h en el ensayo de TUNEL). En la bibliografía existen antecedentes de la capacidad del calcitriol de sensibilizar a otras células de adenoma y

carcinoma colorrectal a sufrir apoptosis al regular diferentes proteínas pro-apoptóticas (Barnes *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2000).

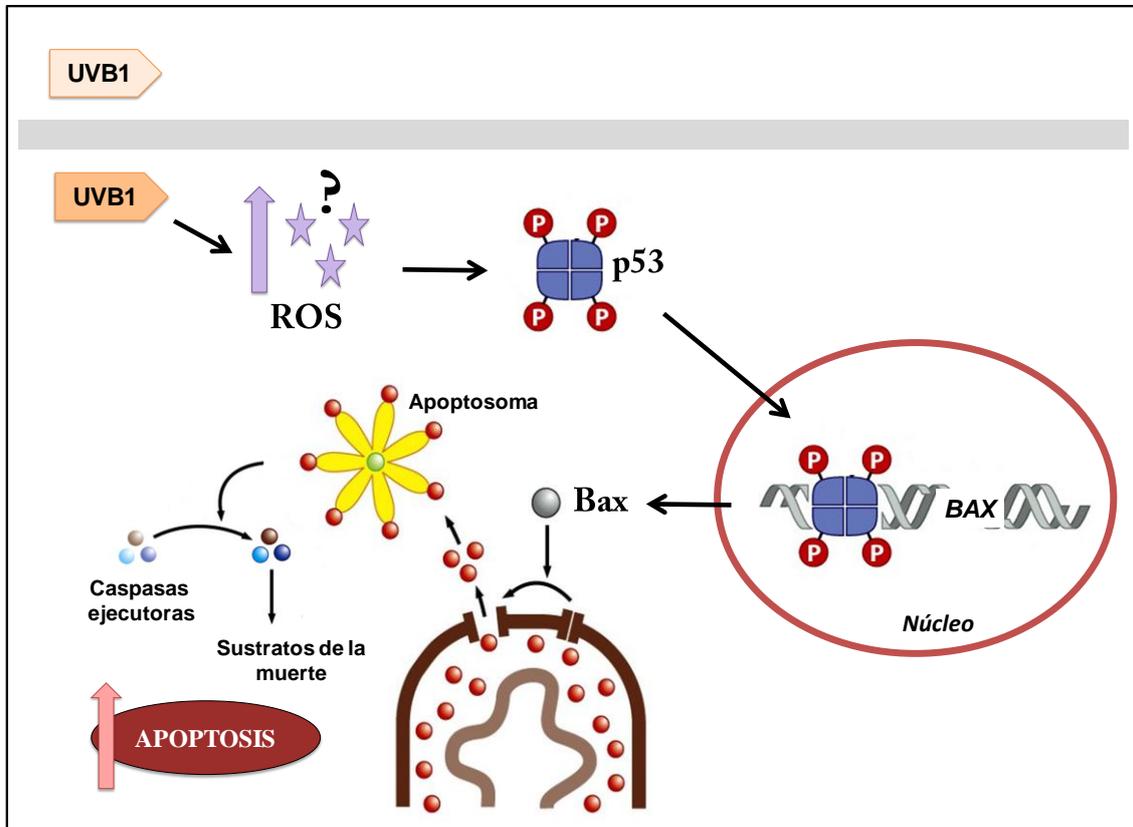


Figura 54. Modelo de mecanismo de acción propuesto para el efecto pro-apoptótico del análogo UVB1 en células de CCR (parcialmente tomado de Weinberg, 2013).

En relación a las características pro-diferenciantes del análogo en las células de CCR, como hemos mencionado, el UVB1 fue capaz de aumentar la expresión de E-cadherina tanto en los ensayos *in cultivo* como en los tumores del modelo animal. Este mecanismo de acción antitumoral es similar al demostrado por la hormona natural ya que se ha reportado la capacidad del calcitriol de promover la diferenciación en células de carcinoma de colon SW480 mediante la inhibición de la señalización de β -catenina y la inducción de la expresión de proteínas de adhesión, tales como E-cadherina, ocludina y vinculina (Larriba *et al.*, 2011).

Conjuntamente con los efectos antitumorales sobre la apoptosis y la diferenciación celular, el análogo demostró características anti-metastásicas al

disminuir la capacidad migratoria e invasiva de las células HCT116. En cuanto al retraso en la migración celular, demostramos que el UVB1 provoca sus efectos también de una manera dependiente de la presencia de p53 ya que reduce la motilidad de la línea HCT116 con p53 *wild type* y no la afecta en las células HCT116 p53 *-/-*. Además, como hemos mencionado, el tratamiento del análogo UVB1 induce incrementos en los niveles del receptor VDR tanto en las células en cultivo como en los tumores del modelo animal. Recientemente se ha demostrado que el calcitriol provoca una sobre-expresión de Cistatina D, proteína inhibidora de cisteín proteasas, a través de un aumento en la expresión de VDR (Hüntén & Hermeking, 2015). El gen supresor tumoral p53 induce directamente el aumento de la expresión de VDR (Kommagani *et al.*, 2007; Maruyama *et al.*, 2006), así como del gen *CST5*, codificante de Cistatina D (Hüntén & Hermeking, 2015). Esta proteína se ha visto incrementada en células de CCR tratadas con calcitriol y, como consecuencia, se ha observado inhibición de la proliferación y la migración celular (Alvarez-Díaz *et al.*, 2009). Hunten y Hermeking reportaron que en células de CCR la combinación de la activación de p53 y el tratamiento con calcitriol resulta en una mayor expresión de *CST5* y una represión de la TEM, a través de una disminución de SNAIL (Hüntén & Hermeking, 2015). Teniendo en cuenta estos antecedentes y los resultados de esta tesis se puede plantear la hipótesis que el análogo induce a VDR y a p53, y esta última proteína, a su vez también induce al receptor VDR; ambos finalmente estimularían la expresión de Cistatina D (**Figura 55**). Dado lo reciente de la publicación que muestra la relación entre Cistatina D y p53, estudios adicionales son necesarios para comprobar la posible participación de esta proteína en el mecanismo de acción del UVB1, dado que el análogo fue capaz de sobre-expresar al receptor VDR y aumentar la expresión de p53 en los tumores de los animales, con la consecuente inhibición del crecimiento tumoral del modelo animal y la observación de las características anti-metastásicas *in cultivo*.

Como ya se describió, el análogo produjo aumento de la expresión de: i) VDR, ii) E-cadherina y iii) β -catenina citoplasmática, con disminución de la expresión de β -catenina nuclear, tanto en las células de CCR como en los tumores primarios de los animales. Por otra parte, Pálmer y col. (Pálmer *et al.*,

2001) mostraron que el calcitriol al unirse a VDR, induce la unión de este último a β -catenina reteniéndola en citoplasma e impidiendo la formación de complejos transcripcionalmente activos de β -catenina / TCF en el núcleo, con la consecuente inhibición de la expresión de genes implicados en la proliferación celular. Además, el VDR unido a su ligando natural induce la expresión de E-cadherina, lo que sumado al aumento de β -catenina citoplasmática, provocado por el mismo receptor, conduce a una re-localización de β -catenina en las uniones adherentes. Teniendo en cuenta nuestros resultados y estos antecedentes se puede plantear la hipótesis que el análogo estaría actuando en forma similar al calcitriol aunque de manera más potente. Es decir, el UVB1 estimularía una mayor formación de complejos de E-cadherina - β -catenina, evitando de esta manera la pérdida de la adhesión celular y la adquisición de características migratorias e invasivas. Al mismo tiempo, el análogo estimularía la interacción entre VDR y β -catenina por lo que el receptor mantendría una mayor cantidad de esta proteína en citoplasma cooperando con su relocalización en las uniones adherentes (**Figura 55**). Coincidentemente con esta hipótesis hay reportes que indican que en células CCR que no expresan VDR (SW480-R y SW620) se detectan altos niveles de β -catenina en el núcleo (Johnson *et al.*, 2015; Larriba *et al.*, 2013). En el mismo sentido, se ha reportado que β -catenina regula positivamente la expresión de genes que codifican para MMPs, por ejemplo las MMP-2, 3, 7, 9, 13 (Mantilla *et al.*, 2015). En base a este antecedente podemos suponer que la disminución de la actividad de las MMP-2 y MMP-9 en células HCT116 tratadas con el análogo, o el calcitriol, detectada en esta tesis podría deberse también a la disminución de la actividad transcripcional de β -catenina al encontrarse reclutada en el citoplasma y/o formando parte de las uniones adherentes.

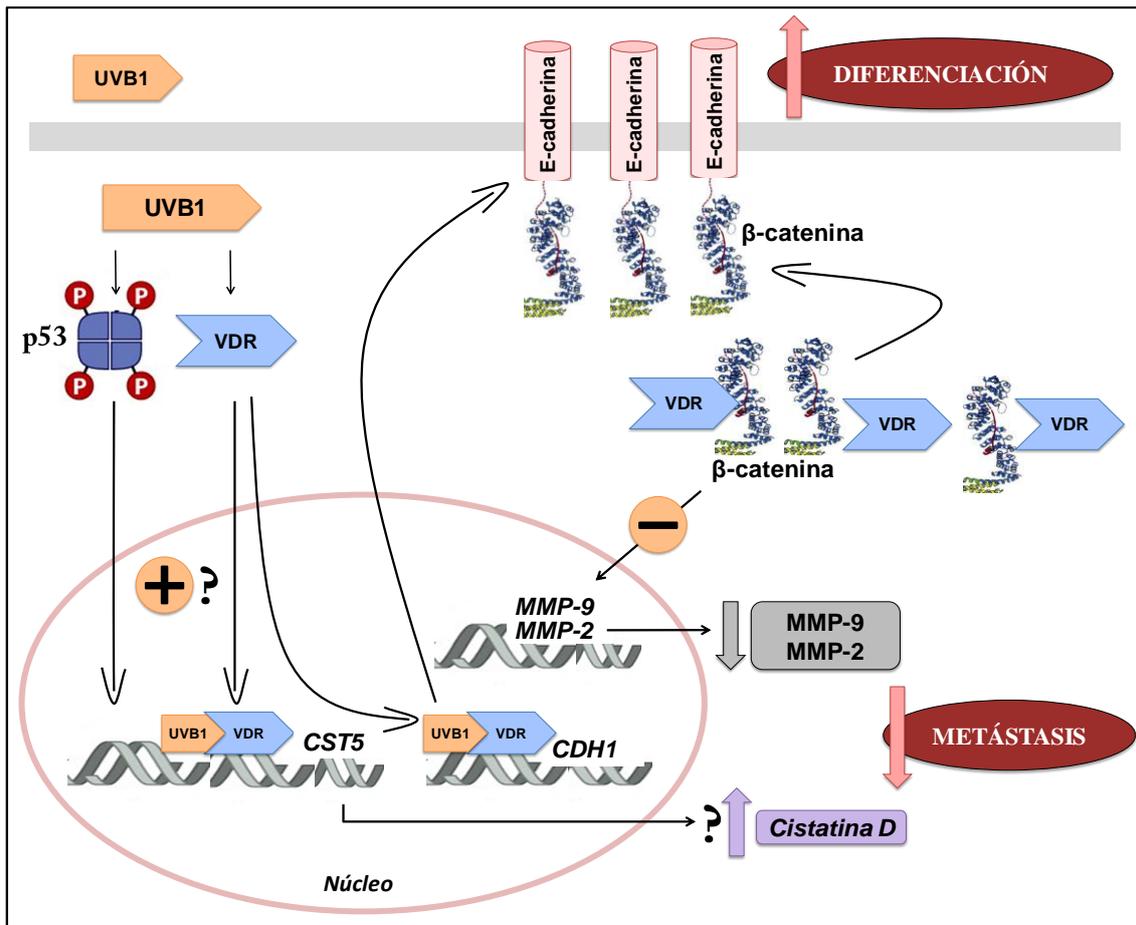


Figura 55. Modelo de mecanismos propuestos para la acción del análogo UVB1 estimulando la diferenciación e inhibiendo la metástasis en células de CCR.

Teniendo en cuenta los antecedentes que sugieren que el receptor VDR puede estar implicado en la progresión del CCR, dado que se ha reportado que sus niveles proteicos disminuyen en etapas avanzadas de esta enfermedad (Stubbins *et al.*, 2012) y que la baja expresión del receptor o su ausencia se correlaciona con un pronóstico desfavorable (Pálmer *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 1998), es de suponer que sería de utilidad clínica identificar candidatos terapéuticos que aumenten la expresión de VDR. Teniendo en mente que la activación de este receptor por parte de su ligando conduce a su propia transcripción es probable que los efectos terapéuticos atribuidos al calcitriol y/o algunos de sus análogos en el cáncer de colon se deban a este incremento en los niveles de expresión del VDR (Welsh, 2012; Stubbins *et al.*, 2012). Como hemos mencionado, el UVB1 fue capaz de aumentar la expresión del VDR en células de CCR y de CCECC. Es sabido que tanto el calcitriol como sus

análogos pueden tener efectos genómicos y no genómicos o rápidos mediados por su unión al receptor. En este contexto es muy importante conocer los detalles de la interacción molecular entre el UVB1 y el VDR. Con este objetivo y como parte de esta tesis hemos realizado estudios bioinformáticos sobre esta interacción. Nuestros resultados demostraron que el análogo puede unirse al sitio LBD del VDR con una mayor afinidad que el calcitriol. Los estudios computacionales del presente trabajo de tesis se realizaron con el receptor cristalizado depositado en el PDB por Rochel y col. (Rochel *et al.*, 2000). Esta estructura ha sido utilizada en numerosas investigaciones desde el año 2000 (Kulesza *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2014; Carballa *et al.*, 2012; Ciesielski *et al.*, 2012; Gonzalez *et al.*, 2003). Las simulaciones de DM exploraron las características estructurales del calcitriol y del UVB1 en la conformación tridimensional del VDR y permitieron identificar una serie de particularidades para el nuevo análogo sintético que podrían justificar las propiedades antitumorales del UVB1 y que a su vez pueden constituir puntos importantes para el diseño de nuevos análogos de calcitriol con características antineoplásicas más potentes. El UVB1 exhibió interacciones con residuos del LBD - VDR tanto polares como apolares, siendo estos últimos los responsables de la mayor afinidad de unión del análogo. Además, el UVB1 ha demostrado la interacción con los residuos His397 e His305 y su capacidad para mantener una disposición conformacional similar a la del calcitriol sobre la hélice H12 del LBD - VDR. Los residuos His397 e His305 son claves en la unión que establece el calcitriol con el VDR, ambos participan en los enlaces puentes de hidrógeno con el grupo hidroxilo de la posición 25 del calcitriol (Malinska *et al.*, 2015; Carlberg, 2004; Rochel *et al.*, 2000), grupo que también se encuentra presente en nuestro análogo tipo gemini. La hélice H12, cuya posición es crítica para la unión de co-activadores transcripcionales, es estabilizada por varios contactos hidrofóbicos establecidos con el UVB1, algunos de los cuales también han sido reportados por Rochel y col. para el calcitriol como Val234, Ile268, His397 y Tir401 (Rochel *et al.*, 2000). Sumado a esto, el UVB1 es capaz de restringir las posiciones de dos residuos de la región de bisagra (His140 y Val159) y de varios correspondientes al LBD (Arg252, His326, Leu378 y Phe406-Cys410) en comparación con calcitriol, y de favorecer el posicionamiento de otros residuos como Arg158 y Arg370. La bibliografía

consultada sugiere que la región bisagra puede participar en facilitar el posicionamiento correcto del LBD y modular la accesibilidad de la hélice H12 para reclutar co-moduladores necesarios para la activación o represión génica (Orlov *et al.*, 2012). Estudios adicionales son necesarios para determinar si las particularidades encontradas en el posicionamiento de estos residuos determinan efectos diferentes en el reclutamiento de cofactores transcripcionales. Los resultados de los ensayos *in silico* sugieren que estas particularidades pueden estar involucradas en las características antineoplásicas y no hipercalcemiantes halladas con el análogo.

En este sentido, en la bibliografía existen varios reportes de las conformaciones inducidas en el receptor VDR por análogos de calcitriol, como también de las interacciones con co-activadores transcripcionales y la consecuente transactivación génica. En lo referente a análogos del calcitriol de tipo gemini, Norman y col. informaron de un análogo (1 α ,25-dihydroxy-21-(3-hydroxy-3-methylbutyl) vitamin D₃) con una capacidad de unión al VDR menor que el calcitriol (38 % con respecto a la hormona natural), el cual generó cambios conformacionales únicos en el VDR, estimuló la transcripción de genes en las células ROS 17/2.8 e inhibió el crecimiento clonal de manera similar o con mayor potencia que el calcitriol, dependiendo de la línea celular estudiada (Norman *et al.*, 2000). En concordancia con esto, Herdick y col. reportaron que la caracterización de las conformaciones del VDR luego de su unión a ligandos, es insuficiente para la extrapolación de su potencial en la regulación de genes (Herdick *al et.*, 2000). Este grupo demuestra las propiedades antitumorales de un análogo de tipo gemini (Ro27-2310) que se comporta como un agonista débil del VDR *in vitro* y luego, en ensayos *in vivo*, presenta una potencia más alta que el calcitriol. La mayoría de los ligandos de VDR se han clasificado como agonistas o antagonistas. Carlberg y col. informaron que los análogos tipo gemini son capaces de cambiar de un agonista inverso a un super-agonista, cuando las células son expuestas a altos niveles de co-activadores (Carlberg & Molnár, 2006). En este sentido Huet y col. demostraron que dos análogos tipo gemini, Gemini-0072 y Gemini-0097, inducen una cavidad extra dentro del LDB del VDR, reclutan al co-activador SRC-1 con una mayor afinidad que su análogo parental y son capaces de

actuar como super-agonistas gracias a una mayor estabilización de la hélice H12 (Huet *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta estos antecedentes y que los sistemas celulares difieren en sus niveles endógenos de expresión de co-activadores (Carlberg & Molnár, 2006; Germain *et al.*, 2002), sería de importancia central que la evaluación de i) la afinidad al VDR, ii) la potencia de transactivación y iii) los estudios biológicos de los efectos antitumorales, se desarrollaran en el mismo tipo celular, para poder correlacionar los efectos obtenidos *in silico*, *in cultivo* e *in vivo*. Teniendo esto en cuenta nuestro objetivo es continuar los experimentos con el UVB1 sobre el CCR.

En conclusión, en esta tesis hemos demostrado que el análogo de tipo gemini denominado UVB1 presenta efectos antineoplásicos en varias líneas celulares de cáncer provenientes de tumores tanto murinos como humanos, afectando diferentes capacidades celulares implicadas en la progresión del cáncer. Estos efectos parecen tener mecanismos de acción que dependen del tipo de tumor. El análogo redujo la viabilidad celular a través de acciones anti-proliferativas en células de CCECC y pro-apoptóticas en células de CCR. Dentro de estas acciones se encuentra la capacidad del análogo de generar un aumento de las ROS, es decir de provocar estrés oxidativo, lo cual conduciría al arresto del ciclo celular observado en células de CCECC, o a la apoptosis provocada en células de CCR. El inicio del estudio de los mecanismos moleculares implicados en las acciones antineoplásicas del UVB1 muestra que el análogo actúa a través de un aumento de p27 y una disminución de ciclina D1 en células de adenocarcinoma mamario y carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello, respectivamente. Además, en células de CCR el análogo provoca sus efectos de una manera dependiente de la presencia de p53 e induce un aumento de la proteína pro-apoptótica Bax. También aportamos evidencia que el análogo UVB1 presenta características pro-diferenciantes, al aumentar la expresión de E-cadherina en células tumorales mamarias y de carcinoma colorrectal, y anti-metastásicas, al disminuir la capacidad migratoria e invasiva de diferentes líneas celulares tumorales. En relación al último proceso, hemos mostrado que el análogo inhibe la actividad de las MMP-2 y MMP-9 en las células de CCR. También hemos demostrado que el UVB1

posee efectos antineoplásicos en un modelo animal de CCR. Coincidiendo con los resultados obtenidos *in cultivo*, la importante inhibición del crecimiento tumoral en los animales tratados con el análogo es resultado de la inducción de apoptosis, aumento de la expresión de E-cadherina y disminución de la expresión nuclear de β -catenina. En relación a la actividad calcemianta, los ensayos *in vivo* indican que el análogo no provoca hipercalcemia a las dosis y tiempos evaluados, ni tampoco efectos tóxicos como disminución del peso corporal de los ratones, cambios en el hematocrito o en la histología de los órganos. Por último, los resultados de los estudios computacionales permiten predecir que el UVB1 es capaz unirse con gran afinidad al VDR, induciendo cambios conformacionales en el receptor que podrían afectar su interacción con los correspondientes cofactores transcripcionales. En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis aportan evidencia que indica que este nuevo compuesto podría ser, solo o en combinación con otros tratamientos, un posible agente terapéutico efectivo contra, al menos, el cáncer colorrectal.

BIBLIOGRAFÍA

A

Abe E., Miyaura C., Sakagami H., Takeda M., Konno K., Yamazaki T., Yoshiki S., Suda T. (1981). Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D₃. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 78(8), 4990-4994.

Adams, J. S., & Hewison, M. (2008). Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*, 4(2), 80-90.

Adams, J. S., & Hewison, M. (2010). Update in vitamin D. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(2), 471-478.

Ahmad, A., Hanby, A., Dublin, E., Poulson, R., Smith, P., Barnes, D., ... & Hart, I. (1998). Stromelysin 3: an independent prognostic factor for relapse-free survival in node-positive breast cancer and demonstration of novel breast carcinoma cell expression. *The American journal of pathology*, 152(3), 721.

Ahmed, D., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Danielsen, S. A., Eknæs, M., Hektoen, M., ... & Lothe, R. A. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, 2(9), e71.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). *Molecular biology of the cell*. Garland science. (5^a ed.) Cytoskeleton, p. 965-105.

Allavena, P., Garlanda, C., Borrello, M. G., Sica, A., & Mantovani, A. (2008). Pathways connecting inflammation and cancer. *Current opinion in genetics & development*, 18(1), 3-10.

Alvarez-Díaz, S., Valle, N., Ferrer-Mayorga, G., Lombardía, L., Herrera, M., Domínguez, O., ... & Muñoz, A. (2012). MicroRNA-22 is induced by vitamin D and contributes to its antiproliferative, antimigratory and gene regulatory effects in colon cancer cells. *Human molecular genetics*, dds031.

Álvarez-Díaz, S., Valle, N., García, J. M., Peña, C., Freije, J. M., Quesada, V., Astudillo, A., ... & Muñoz, A. (2009). Cystatin D is a candidate tumor suppressor gene induced by vitamin D in human colon cancer cells. *The Journal of clinical investigation*, 119(8), 2343-2358.

Anderson, L. N., Cotterchio, M., Knight, J. A., Borgida, A., Gallinger, S., & Cleary, S. P. (2013). Genetic variants in vitamin d pathway genes and risk of pancreas cancer; results from a population-based case-control study in ontario, Canada. *PLoS One*, 8(6), e66768.

Anderson, M. G., Nakane, M., Ruan, X., Kroeger, P. E., & Wu-Wong, J. R. (2006). Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 57(2), 234-240.

Araújo Jr, R. F., Lira, G. A., Vilaca, J. A., Guedes, H. G., Leitão, M. C. A., Lucena, H. F., & Ramos, C. C. O. (2015). Prognostic and diagnostic implications of MMP-2, MMP-9, and VEGF-expressions in colorectal cancer. *Pathol Res Pract*, 211(1):71-77.

Artaza, J. N., Sirad, F., Ferrini, M. G., & Norris, K. C. (2010). 1, 25 (OH) 2 vitamin D 3 inhibits cell proliferation by promoting cell cycle arrest without inducing apoptosis and modifies cell morphology of mesenchymal multipotent cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 119(1), 73-83.

Avila, E., Garcia-Becerra, R., Rodríguez-Rasgado, J. A., Diaz, L., Ordaz-Rosado, D., Zuegel, U., ... & Camacho, J. (2010). Calcitriol down-regulates human ether a go-go 1 potassium channel expression in cervical cancer cells. *Anticancer research*, 30(7), 2667-2672.

B

Bao, B. Y., Yao, J., & Lee, Y. F. (2006). 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 suppresses interleukin-8-mediated prostate cancer cell angiogenesis. *Carcinogenesis*, 27(9), 1883-1893.

Barnes, J. D., Arhel, N. J., Lee, S. S., Sharp, A., Al-Okail, M., Packham, G., Hague, A., Paraskeva C., & Williams, A. C. (2005). Nuclear BAG-1 expression inhibits apoptosis in colorectal adenoma-derived epithelial cells. *Apoptosis*, 10(2), 301-311.

Beckman, M. J., Tadikonda, P., Werner, E., Prah, J., Yamada, S., & DeLuca, H. F. (1996). Human 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase, a multicatalytic enzyme. *Biochemistry*, 35(25), 8465-8472.

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

Beer, T. M., Munar, M., & Henner, W. D. (2001). A phase I trial of pulse calcitriol in patients with refractory malignancies. *Cancer*, 91(12), 2431-2439.

Benada, J., & Macurek, L. (2015). Targeting the checkpoint to kill cancer cells. *Biomolecules*, 5(3), 1912-1937.

Ben-Eltriki, M., Deb, S., Adomat, H., & Guns, E. S. T. (2016). Calcitriol and 20 (S)-protopanaxadiol synergistically inhibit growth and induce apoptosis in human prostate cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 158, 207-219.

Ben-Shoshan, M., Amir, S., Dang, D. T., Dang, L. H., Weisman, Y., & Mabeesh, N. J. (2007). 1α , 25-dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol) inhibits hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway in human cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(4), 1433-1439.

Bermeo, A., Charry, A. P., & Vernot, J. P. (2001). Vitamina D y cáncer. *Revista de la Facultad de Medicina*, 49(2), 100-104.

Bernardi, R. J., Johnson, C. S., Modzelewski, R. A., & Trump, D. L. (2002). Antiproliferative effects of 1α , 25-dihydroxyvitamin D₃ and vitamin D analogs on tumor-derived endothelial cells. *Endocrinology*, 143(7), 2508-2514.

Berton, S., Belletti, B., Wolf, K., Canzonieri, V., Lovat, F., Vecchione, A., Colombatti, A., Friedl, P., & Baldassarre, G. (2009). The tumor suppressor functions of p27kip1 include control of the mesenchymal/amoeboid transition. *Molecular and cellular biology*, 29(18), 5031-5045.

Bertone-Johnson, E. R., Chen, W. Y., Holick, M. F., Hollis, B. W., Colditz, G. A., Willett, W. C., & Hankinson, S. E. (2005). Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1, 25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 14(8), 1991-1997.

Bessler, H., & Djaldetti, M. (2012). 1α , 25-Dihydroxyvitamin D₃ modulates the interaction between immune and colon cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 66(6), 428-432.

Besson, A., Gurian-West, M., Schmidt, A., Hall, A., & Roberts, J. M. (2004). p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes & development*, 18(8), 862-876.

Bikle D.D., Gee E., Halloran B., Kowalski M.A., Ryzen E., Haddad J.G. (1986). Assessment of free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D binding protein. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 63(4): 954-959

Bocci, G., Francia, G., Man, S., Lawler, J., & Kerbel, R. S. (2003). Thrombospondin 1, a mediator of the antiangiogenic effects of low-dose metronomic chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(22), 12917-12922.

Bohl, L. P., Liaudat, A. C., Picotto, G., Marchionatti, A. M., Narvaez, C. J., Welsh, J., Rodriguez, V.A., & Tolosa de Talamoni, N. G. (2012). Buthionine sulfoximine and 1, 25-dihydroxyvitamin D induce apoptosis in breast cancer cells via induction of reactive oxygen species. *Cancer investigation*, 30(8), 560-570.

Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(12), 786-801.

Bottino, J., Gelaleti, G. B., Maschio, L. B., Jardim-Perassi, B. V., & de Campos Zuccari, D. A. P. (2014). Immunoexpression of ROCK-1 and MMP-9 as prognostic markers in breast cancer. *Acta histochemica*, 116(8), 1367-1373.

Bouillon, R., Allewaert, K., Xiang, D. Z., Tan, B. K., & Van Baelen, H. (1991). Vitamin D analogs with low affinity for the vitamin D binding protein: enhanced in vitro and decreased in vivo activity. *Journal of Bone and Mineral Research*, 6(10), 1051-1057.

Bouillon, R., Eelen, G., Verlinden, L., Mathieu, C., Carmeliet, G., & Verstuyf, A. (2006). Vitamin D and cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 102(1), 156-162.

Bouillon, R., Verstuyf, A., Zhao, J., Tan, B. K., & Van Baelen, H. (1996). Nonhypercalcemic vitamin D analogs: interactions with the vitamin D-binding protein. *Hormones*, 45(3-5), 117-121.

Bower, M., Stein, R. C., Hedley, A., Coombes, R. C., Colston, K. W., Gazet, J. C., & Ford, H. T. (1991). Topical calcipotriol treatment in advanced breast cancer. *The Lancet*, 337(8743), 701-702.

Bristol, M. L., Di, X., Beckman, M. J., Wilson, E. N., Henderson, S. C., Maiti, A., Fan, Z., & Gewirtz, D. A. (2012). Dual functions of autophagy in the response of breast tumor cells to radiation: Cytoprotective autophagy with radiation alone and cytotoxic autophagy in radiosensitization by vitamin D3. *Autophagy*, 8(5), 739-753.

Brown, A. J., & Slatopolsky, E. (2008). Vitamin D analogs: therapeutic applications and mechanisms for selectivity. *Molecular aspects of medicine*, 29(6), 433-452.

Brown, A., Dusso, A., & Slatopolsky, E. (2008) Vitamin D. *The Kidney*, p. 1803-1850

Brüggemann, L. W., Queiroz, K. C., Zamani, K., Straaten, A. V., Spek, C. A., & Bijlsma, M. F. (2010). Assessing the efficacy of the hedgehog pathway inhibitor vitamin D3 in a murine xenograft model for pancreatic cancer. *Cancer biology & therapy*, 10(1), 79-88.

Buitrago, C., Pardo, V. G., & Boland, R. (2013). Role of VDR in 1 α , 25-dihydroxyvitamin D 3-dependent non-genomic activation of MAPKs, Src and Akt in skeletal muscle cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 136, 125-130.

C

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

Carballa, D. M., Seoane, S., Zacconi, F., Pérez, X., Rumbo, A., Álvarez-Díaz, S., ... & Mouriño, A. (2012). Synthesis and biological evaluation of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 analogues with a

long side chain at C12 and short C17 side chains. *Journal of medicinal chemistry*, 55(20), 8642-8656.

Cardus, A., Panizo, S., Encinas, M., Dolcet, X., Gallego, C., Aldea, M., Fernandez, E., & Valdivielso, J. M. (2009). 1, 25-dihydroxyvitamin D 3 regulates VEGF production through a vitamin D response element in the VEGF promoter. *Atherosclerosis*, 204(1), 85-89.

Cardus, A., Parisi, E., Gallego, C., Aldea, M., Fernandez, E., & Valdivielso, J. M. (2006). 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway. *Kidney international*, 69(8), 1377-1384.

Carethers, J. M., & Jung, B. H. (2015). Genetics and genetic biomarkers in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology*, 149(5), 1177-1190.

Carlberg, C. (2004). Ligand-mediated conformational changes of the VDR are required for gene transactivation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 89, 227-232.

Carlberg, C., & Molnár, F. (2006). Detailed molecular understanding of agonistic and antagonistic vitamin D receptor ligands. *Current topics in medicinal chemistry*, 6(12), 1243-1253.

Case, D. A., Berryman, J. T., Betz, R. M., Cerutti, D. S., Cheatham, I. T. E., Darden, T. et al. (2015). AMBER 2015, University of California, San Francisco.

Caserras B, Martínez J. Cáncer Colorrectal. (2012) Disponible:<http://www.elsevierinstituciones.com/ficheros/booktemplate/files/Capítulo31.pdf>

Cázares-Ordoñez, V., Gonzalez-Duarte, R. J., Diaz, L., Ishizawa, M., Uno, S., Ortiz, V., Ordonez-Sanchez, M.L., Makishima, M., Larrea, F., & Avila, E. (2014). A cis-acting element in the promoter of human ether a go-go 1 potassium channel gene mediates repression by calcitriol in human cervical cancer cells. *Biochemistry and Cell Biology*, 93(1), 94-101.

Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331(6024), 1559-1564.

Chen, K. S., Prah, J. M., & DeLuca, H. F. (1993). Isolation and expression of human 1, 25-dihydroxyvitamin D3 24-hydroxylase cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(10), 4543-4547.

Cheng, J. B., Levine, M. A., Bell, N. H., Mangelsdorf, D. J., & Russell, D. W. (2004). Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(20), 7711-7715.

Chiang, K. C., & C Chen, T. (2013). The anti-cancer actions of vitamin D. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 13(1), 126-139.

Chick, H., Dalyell, E., Hume, M., Smith, H. H., Mackay, H. M., Hams Wimberger, M. D., & Kinderklinik, R. T. T. U. (1922). The etiology of rickets in infants: prophylactic and curative observations at the Vienna University KinderKlinik. *The Lancet*, 200(5157), 7-11.

Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., Verlinden, L., & Carmeliet, G. (2015). Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiological reviews*, 96(1), 365-408.

Christofori, G. (2006). New signals from the invasive front. *Nature*, 441(7092), 444-450.

Chun, R. F. (2012). New perspectives on the vitamin D binding protein. *Cell biochemistry and function*, 30(6), 445-456.

Chun, R. F., Adams, J. S., & Hewison, M. (2008). Back to the future: a new look at 'old' vitamin D. *Journal of Endocrinology*, 198(2), 261-269.

Chung, I., Han, G., Seshadri, M., Gillard, B. M., Yu, W. D., Foster, B. A., Trump, D.L., & Johnson, C. S. (2009). Role of vitamin D receptor in the antiproliferative effects of calcitriol in tumor-derived endothelial cells and tumor angiogenesis in vivo. *Cancer research*, 69(3), 967-975.

Ciesielski, F., Sato, Y., Chebaro, Y., Moras, D., Dejaegere, A., & Rochel, N. (2012). Structural basis for the accommodation of bis-and tris-aromatic derivatives in vitamin D nuclear receptor. *Journal of medicinal chemistry*, 55(19), 8440-8449.

Colston, K., Colston, M. J., & Feldman, D. (1981). 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ and malignant melanoma: the presence of receptors and inhibition of cell growth in culture. *Endocrinology*, 108(3), 1083-1086.

Coronato, S., Laguens, G., & Di Girolamo, V. (2012). Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *MEDICINA (Buenos Aires)*, 72(6), 495-502.

D

Dalhoff, K., Dancey, J., Astrup, L., Skovsgaard, T., Hamberg, K. J., Lofts, F. J., ... & Evans, T.R. (2003). A phase II study of the vitamin D analogue Seocalcitol in patients with inoperable hepatocellular carcinoma. *British journal of cancer*, 89(2), 252-257.

- Daniewski, A. R., Garofalo, L. M., Hutchings, S. D., Kabat, M. M., Liu, W., Okabe, M., ... & Yiannikouros, G. P. (2002). Efficient synthesis of the A-ring phosphine oxide building block useful for $1\alpha, 25$ -dihydroxy vitamin D₃ and analogues. *The Journal of organic chemistry*, 67(5), 1580-1587.
- Davis, C. D., & Milner, J. A. (2011). Nutrigenomics, vitamin D and cancer prevention. *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics*, 4(1), 1-11.
- Deeb, K. K., Trump, D. L., & Johnson, C. S. (2007). Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, 7(9), 684-700.
- DeLuca, H. F. (2004). Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American journal of clinical nutrition*, 80(6), 1689S-1696S.
- DeLuca, H. F. (2014). History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *BoneKEY reports*, 3.
- DeLuca, H. F., & Plum, L. A. (2016). Analogs of $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D₃ in Clinical Use. *Vitamins and Hormones*. Elsevier Inc. Volume 100, p. 151-164.
- Di Rosa, M., Malaguarnera, M., Zanghì, A., Passaniti, A., & Malaguarnera, L. (2013). Vitamin D₃ insufficiency and colorectal cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*, 88(3), 594-612.
- Díaz, G. D., Paraskeva, C., Thomas, M. G., Binderup, L., & Hague, A. (2000). Apoptosis is induced by the active metabolite of vitamin D₃ and its analogue EB1089 in colorectal adenoma and carcinoma cells: possible implications for prevention and therapy. *Cancer Research*, 60(8), 2304-2312.
- Díaz, L., Díaz-Muñoz, M., García-Gaytán, A. C., & Méndez, I. (2015). Mechanistic effects of calcitriol in cancer biology. *Nutrients*, 7(6), 5020-5050.
- Díaz, L., Noyola-Martínez, N., Barrera, D., Hernández, G., Avila, E., Halhali, A., & Larrea, F. (2009). Calcitriol inhibits TNF- α -induced inflammatory cytokines in human trophoblasts. *Journal of reproductive immunology*, 81(1), 17-24.
- Dick L.J.L. (1922) Rickets.
- Dusso, A.S., Brown, A.J., & Slatopolsky, E. (2005) Vitamin D. *American journal of physiology. Renal physiology*, 289: F8-28.

E

Eisman J.A., Barkla D.H., Tutton P.J. (1987). Suppression of *in vivo* growth of human cancer solid tumor xenografts by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Cancer Research*, 47(1):21-25.

Esvelt, R. P., Schnoes, H. K., & DeLuca, H. F. (1978). Vitamin D₃ from rat skins irradiated *in vitro* with ultraviolet light. *Archives of biochemistry and biophysics*, 188(2), 282-286.

Evans, S. R., Nolla, J., Hanfelt, J., Shabahang, M., Nauta, R. J., & Shchepotin, I. B. (1998). Vitamin D receptor expression as a predictive marker of biological behavior in human colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 4(7), 1591-1595.

Evans, T. R. J., Colston, K. W., Lofts, F. J., Cunningham, D., Anthoney, D. A., Gogas, H., de Bono, J.S., Hamberg, K.J., Skov, T., & Mansi, J. L. (2002). A phase II trial of the vitamin D analogue Seocalcitol (EB1089) in patients with inoperable pancreatic cancer. *British journal of cancer*, 86(5), 680-685.

F

Fall, Y., Vitale, C., & Mouriño, A. (2000). An efficient synthesis of the 25-hydroxy Windaus–Grundmann ketone. *Tetrahedron Letters*, 41(38), 7337-7340.

Fall, Y., Gómez, G., Pérez, M., Gándara, Z., Pérez, X., Pazos, G., Kurz, G. (2011) WO 2011121152. Chem. Abstr.2011, 155, 536338.

Fedirko, V., Duarte-Salles, T., Bamia, C., Trichopoulou, A., Aleksandrova, K., Trichopoulos, D., Trepo, E., ... & Jenab, M. (2014). Prediagnostic circulating vitamin D levels and risk of hepatocellular carcinoma in European populations: A nested case-control study. *Hepatology*, 60(4), 1222-1230.

Feldman, D., Krishnan, A. V., Swami, S., Giovannucci, E., & Feldman, B. J. (2014). The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nature reviews cancer*, 14(5), 342-357.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., & Bray, F. (2014). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), E359-E386.

Fernández, B., Martínez Pérez, J. A., Granja, J. R., Castedo, L., & Mourino, A. (1992). Synthesis of hydrindan derivatives related to vitamin D. *The Journal of Organic Chemistry*, 57(11), 3173-3178.

Fernandez-Garcia, N. I., Palmer, H. G., Garcia, M., Gonzalez-Martin, A., del Rio, M., Baretino, D., Baretino, D., Volpert, O., Munoz, A., & Jimenez, B. (2005). 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D₃

regulates the expression of Id1 and Id2 genes and the angiogenic phenotype of human colon carcinoma cells. *Oncogene*, 24(43), 6533-6544.

Ferrero, D., Bruno, B., Pregno, P., Stefani, S., Larizza, E., Ciravegna, G., ... & E., Pileri, A. (1996). Combined differentiating therapy for myelodysplastic syndromes: a phase II study. *Leukemia research*, 20(10), 867-876.

Ferronato, M. J., Salomón, D. G., Fermento, M. E., Gandini, N. A., López Romero, A., Rivadulla, M. L., ... & Facchinetti, M. M. (2015). Vitamin D Analogue: Potent Antiproliferative Effects on Cancer Cell Lines and Lack of Hypercalcemic Activity. *Archiv der Pharmazie*, 348(5), 315-329.

Finkelmeier, F., Kronenberger, B., Köberle, V., Bojunga, J., Zeuzem, S., Trojan, J., Piiper, A., & Waidmann, O. (2014). Severe 25-hydroxyvitamin D deficiency identifies a poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma—a prospective cohort study. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 39(10), 1204-1212.

Fred.3.0.0 OpenEye.Scientific.Software, Santa Fe, NM, <http://www.eyesopen.com>.

Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Rob, M. A., Cheeseman, J. R. et al. (2003). Gaussian 03.

G

Gándara, Z., Rivadulla, M. L., Pérez, M., Gómez, G., & Fall, Y. (2013). Synthesis of a trans-Hydrindanone, Precursor for the Preparation of Vitamin D Analogues. *European Journal of Organic Chemistry*, 2013(25), 5678-5682.

García-Becerra, R., Díaz, L., Camacho, J., Barrera, D., Ordaz-Rosado, D., Morales, A, ... & Larrea F. (2010). Calcitriol inhibits Ether-a go-go potassium channel expression and cell proliferation in human breast cancer cells. *Experimental cell research*, 316(3), 433-442.

García-Quiroz, J., García-Becerra, R., Santos-Martínez, N., Barrera, D., Ordaz-Rosado, D., Avila, E., ... & Díaz, L. (2014). In vivo dual targeting of the oncogenic Ether-à-go-go-1 potassium channel by calcitriol and astemizole results in enhanced antineoplastic effects in breast tumors. *BMC cancer*, 14(1), 1.

Garland, C. F., & Garland, F. C. (1980). Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer?. *International journal of epidemiology*, 9(3), 227-231.

Garland, C. F., Gorham, E. D., Mohr, S. B., Grant, W. B., Giovannucci, E. L., Lipkin, M., Newmark, H., Holick, M.F., & Garland, F. C. (2007). Vitamin D and prevention of breast cancer: pooled analysis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 103(3), 708-711.

Garland, C., Garland, F., Shaw, E., Comstock, G., Helsing, K., & Gorham, E. (1989). Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: eight-year prospective study. *The Lancet*, 334(8673), 1176-1178.

Gedlicka, C., Hager, G., Weissenböck, M., Gedlicka, W., Knerer, B., Kornfehl, J., & Formanek, M. (2006). 1, 25 (OH) 2 Vitamin D3 induces elevated expression of the cell cycle inhibitor p18 in a squamous cell carcinoma cell line of the head and neck. *Journal of oral pathology & medicine*, 35(8), 472-478.

Geran, R.I., Greenberg, N.H., MacDonald, M.M., Schumacher, A.M., & Abbott, B.J. (1972) Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemotherapy Reports*, 3:1-103.

Germain, P., Iyer, J., Zechel, C., & Gronemeyer, H. (2002). Co-regulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy. *Nature*, 415(6868), 187-192.

Gialeli, C., Theocharis, A. D., & Karamanos, N. K. (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS journal*, 278(1), 16-27.

Giammanco, M., Di Majo, D., La Guardia, M., Aiello, S., Crescimanno, M., Flandina, C., ... & Leto, G. (2015). Vitamin D in cancer chemoprevention. *Pharmaceutical biology*, 53(10), 1399-1434.

Giannelli, G., Koudelkova, P., Dituri, F., & Mikulits, W. (2016). Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*.

Giovannucci, E. (2010). Epidemiology of vitamin D and colorectal cancer: casual or causal link?. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 121(1), 349-354.

Glisson, F., Bate, G., & Regemorter, A. *De rachitide sive Morbo puerili, qui vulgò The Rickets dicitur, tractatus*. Impensis Joannis Williams, sub signo Coronae.

Golubkov, V. S., & Strongin, A. Y. (2012). Insights into ectodomain shedding and processing of protein-tyrosine pseudokinase 7 (PTK7). *Journal of Biological Chemistry*, 287(50), 42009-42018.

Golubkov, V. S., Chekanov, A. V., Cieplak, P., Aleshin, A. E., Chernov, A. V., Zhu, W., ... & Strongin, A. Y. (2010). The Wnt/Planar Cell Polarity Protein-tyrosine Kinase-7 (PTK7) Is a Highly Efficient Proteolytic Target of Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase IMPLICATIONS IN CANCER AND EMBRYOGENESIS. *Journal of Biological Chemistry*, 285(46), 35740-35749.

Golubkov, V. S., Prigozhina, N. L., Zhang, Y., Stoletov, K., Lewis, J. D., Schwartz, P. E., ... & Strongin, A. Y. (2014). Protein-tyrosine pseudokinase 7 (PTK7) directs cancer cell motility and metastasis. *Journal of Biological Chemistry*, 289(35), 24238-24249.

González, G. H., Álvarez, B. L., & Hawkins, F. (2012). Protocolo terapéutico de la hipercalcemia. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(16), 976-980.

González, L. O., Corte, M. D., Junquera, S., González-Fernández, R., del Casar, J. M., García, C., ... & Vizoso, F. J. (2009). Expression and prognostic significance of metalloproteases and their inhibitors in luminal A and basal-like phenotypes of breast carcinoma. *Human pathology*, 40(9), 1224-1233.

Gonzalez, M. M., Samenfeld, P., Peräkylä, M., & Carlberg, C. (2003). Corepressor excess shifts the two-side chain vitamin D analog Gemini from an agonist to an inverse agonist of the vitamin D receptor. *Molecular Endocrinology*, 17(10), 2028-2038.

González-Sancho, J. M., Larriba, M. J., Ordóñez-Morán, P., Pálmer, H. G., & Munoz, A. (2006). Effects of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 in human colon cancer cells. *Anticancer research*, 26(4A), 2669-2681.

Gross, C., Stamey, T., Hancock, S., & Feldman, D. (1998). Treatment of early recurrent prostate cancer with 1, 25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol). *The Journal of urology*, 159(6), 2035-2040.

Grundmann, M., Haidar, M., Placzko, S., Niendorf, R., Darashchonak, N., Hubel, C. A., & von Versen-Höynck, F. (2012). Vitamin D improves the angiogenic properties of endothelial progenitor cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 303(9), C954-C962.

Gulliford, T., English, J., Colston, K. W., Menday, P., Moller, S., & Coombes, R. C. (1998). A phase I study of the vitamin D analogue EB 1089 in patients with advanced breast and colorectal cancer. *British journal of cancer*, 78(1), 6-13.

Guo, W., & Giancotti, F. G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(10), 816-826.

Gupta, S. C., Hevia, D., Patchva, S., Park, B., Koh, W., & Aggarwal, B. B. (2012). Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxidants & redox signaling*, 16(11), 1295-1322.

H

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

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674.
- Hanchette, C. L., & Schwartz, G. G. (1992). Geographic patterns of prostate cancer mortality. Evidence for a protective effect of ultraviolet radiation. *Cancer*, *70*(12), 2861-2869.
- Hansen, C. M., Frandsen, T. L., Brünner, N., & Binderup, L. (1994). $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D₃ inhibits the invasive potential of human breast cancer cells in vitro. *Clinical & experimental metastasis*, *12*(3), 195-202.
- Hathcock, J. N., Shao, A., Vieth, R., & Heaney, R. (2007). Risk assessment for vitamin D. *The American journal of clinical nutrition*, *85*(1), 6-18.
- Haussler, M. R., Jurutka, P. W., Mizwicki, M., & Norman, A. W. (2011). Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of $1\alpha, 25$ (OH) 2 vitamin D 3 : genomic and non-genomic mechanisms. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, *25*(4), 543-559.
- Hawkins, P. C., & Nicholls, A. (2012). Conformer generation with OMEGA: learning from the data set and the analysis of failures. *Journal of chemical information and modeling*, *52*(11), 2919-2936.
- He, W., Wang, X., Chen, L., & Guan, X. (2012). A crosstalk imbalance between p27kip1 and its interacting molecules enhances breast carcinogenesis. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, *27*(7), 399-402.
- Herdick, M., Bury, Y., Quack, M., Uskokovic, M. R., Polly, P., & Carlberg, C. (2000). Response element and coactivator-mediated conformational change of the vitamin D₃ receptor permits sensitive interaction with agonists. *Molecular pharmacology*, *57*(6), 1206-1217.
- Hershko, D. D. (2010). Cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a prognostic biomarker and potential cancer therapeutic target. *Future Oncology*, *6*(12), 1837-1847.
- Hess, A. R., Seftor, E. A., Seftor, R. E., & Hendrix, M. J. (2003). Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane Type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry. *Cancer research*, *63*(16), 4757-4762.

Hillyer, R. L., Sirinvasin, P., Joglekar, M., Sikes, R. A., van Golen, K. L., & Nohe, A. (2012). Differential effects of vitamin D treatment on inflammatory and non-inflammatory breast cancer cell lines. *Clinical & experimental metastasis*, 29(8), 971-979.

Holick, M. F. (2007). Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine*, 357(3), 266-281.

Holick, M. F. (2011). A) Vitamin D deficiency in 2010: health benefits of vitamin D and sunlight: a D-bate. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(2), 73-75. B) Vitamin D: evolutionary, physiological and health perspectives. *Current drug targets*, 12(1), 4-18.

Holick, M. F., Frommer, J. E., McNeill, S. C., Richtand, N. M., Henley, J. W., & Potts, J. T. (1977). Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D3 in skin. *Biochemical and biophysical research communications*, 76(1), 107-114.

Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., & Simmerling, C. (2006). Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65(3), 712-725.

Horváth, H. C., Lakatos, P., Kósa, J. P., Bácsi, K., Borka, K., Bises, G., ... & Kállay, E. (2010). The candidate oncogene CYP24A1: A potential biomarker for colorectal tumorigenesis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 58(3), 277-285.

Høyer-Hansen, M., Nordbrandt, S. P. S., & Jäättelä, M. (2010). Autophagy as a basis for the health-promoting effects of vitamin D. *Trends in molecular medicine*, 16(7), 295-302.

Huber, M. A., Kraut, N., & Beug, H. (2005). Molecular requirements for epithelial–mesenchymal transition during tumor progression. *Current opinion in cell biology*, 17(5), 548-558.

Huet, T., Maehr, H., Lee, H. J., Uskokovic, M. R., Suh, N., Moras, D., & Rochel, N. (2011). Structure–function study of gemini derivatives with two different side chains at C-20, Gemini-0072 and Gemini-0097. *MedChemComm*, 2(5), 424-429.

Huldschinsky, K. (1919). Heilung von Rachitis durch künstliche Höhensonne. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 45(26), 712-713.

Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, 14(1), 33-38.

Hünten, S., & Hermeking, H. (2015). p53 directly activates cystatin D/CST5 to mediate mesenchymal-epithelial transition: a possible link to tumor suppression by vitamin D3. *Oncotarget*, 6(18), 15842.

I

IARC: *International Agency for Research on Cancer*. GLOBOCAN 2012 (*on line*). Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/>. Fecha de última consulta: 06-01-17.

Iglesias-Gato, D., Zheng, S., Flanagan, J. N., Jiang, L., Kittaka, A., Sakaki, T., ... & Chen, T. C. (2011). Substitution at carbon 2 of 19-nor-1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ with 3-hydroxypropyl group generates an analogue with enhanced chemotherapeutic potency in PC-3 prostate cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 127(3), 269-275.

Ikeda, N., Uemura, H., Ishiguro, H., Hori, M., Hosaka, M., Kyo, S., Miyamoto, K., Takeda, E., & Kubota, Y. (2003). Combination treatment with 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ and 9-cis-retinoic acid directly inhibits human telomerase reverse transcriptase transcription in prostate cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 2(8), 739-746.

Irazaqui, A. P., Boland, R. L., & Buitrago, C. G. (2014). Actions of 1, 25 (OH) 2-vitamin D₃ on the cellular cycle depend on VDR and p38 MAPK in skeletal muscle cells. *Journal of molecular endocrinology*, 53(3), 331-343.

J

Jain, R. K., Trump, D. L., Egorin, M. J., Fernandez, M., Johnson, C. S., & Ramanathan, R. K. (2011). A phase I study of the vitamin D₃ analogue ILX23-7553 administered orally to patients with advanced solid tumors. *Investigational new drugs*, 29(6), 1420-1425.

Johnson, A. L., Zinser, G. M., & Waltz, S. E. (2015). Vitamin D₃-dependent VDR signaling delays ron-mediated breast tumorigenesis through suppression of β -catenin activity. *Oncotarget*, 6(18), 16304.

Jones, G. (2007). Expanding role for vitamin D in chronic kidney disease: importance of blood 25-OH-D levels and extra-renal 1 α -hydroxylase in the classical and nonclassical actions of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃. In *Seminars in dialysis*, 20(4), 316-324.

Jones, G., Prosser, D. E., & Kaufmann, M. (2012). 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): its important role in the degradation of vitamin D. *Archives of biochemistry and biophysics*, 523(1), 9-18.

K

Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1420-1428.

Karlsson, S., Olausson, J., Lundh, D., Sögård, P., Mandal, A., Holmström, K. O., Stahel, A., Bengtsson, J., & Larsson, D. (2010). Vitamin D and prostate cancer: the role of membrane

initiated signaling pathways in prostate cancer progression. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 121(1), 413-416.

Kasiappan, R., Shen, Z., Anfernee, K. W., Jinwal, U., Tang, J., Lungchukiet, P., ... & Bai, W. (2012). 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ suppresses telomerase expression and human cancer growth through microRNA-498. *Journal of Biological Chemistry*, 287(49), 41297-41309.

Katayama, M. L. H., Pasini, F. S., Folgueira, M. A. A. K., Snitcovsky, I. M. L., & Brentani, M. M. (2003). Molecular targets of 1, 25 (OH) 2 D₃ in HC11 normal mouse mammary cell line. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 84(1), 57-69.

Kawakami, K., Kawakami, M., & Puri, R. K. (2004). Nitric oxide accelerates interleukin-13 cytotoxin-mediated regression in head and neck cancer animal model. *Clinical cancer research*, 10(15), 5264-5270.

Kim, E. J., Choi, M. R., Park, H., Kim, M., Hong, J. E., Lee, J. Y., Chun, H.S., Lee, K.W., & Yoon Park, J.H. (2011). Dietary fat increases solid tumor growth and metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells and mortality in obesity-resistant BALB/c mice. *Breast Cancer Research*, 13(4), 1-13.

Kim, H. Y., Ryu, J. H., Chu, C. W., Son, G. M., Jeong, Y. I., Kwak, T. W., ... & Kim, H. W. (2014). Paclitaxel-incorporated nanoparticles using block copolymers composed of poly (ethylene glycol)/poly (3-hydroxyoctanoate). *Nanoscale research letters*, 9(1), 1-10.

Kizildag, S., Ates, H., & Kizildag, S. (2010). Treatment of K562 cells with 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ induces distinct alterations in the expression of apoptosis-related genes BCL2, BAX, BCLXL, and p21. *Annals of hematology*, 89(1), 1-7.

Kochupillai, N. (2008). The physiology of vitamin D: current concepts. *Indian Journal of Medical Research*, 127(3), 256-262.

Koli, K., & Keski-Oja, J. (2000). 1a, 25-dihydroxyvitamin D₃ and its analogues down-regulate cell invasion-associated proteases in cultured malignant cells. *Cell Growth Differ*, 11(4), 221-229.

Kommagani, R., Payal, V., & Kadakia, M. P. (2007). Differential Regulation of Vitamin D Receptor (VDR) by the p53 Family p73-DEPENDENT INDUCTION OF VDR UPON DNA DAMAGE. *Journal of Biological Chemistry*, 282(41), 29847-29854.

Koren, R., Hadari-Naor, I., Zuck, E., Rotem, C., Liberman, U. A., & Ravid, A. (2001). Vitamin D is a prooxidant in breast cancer cells. *Cancer research*, 61(4), 1439-1444.

Kriebitzsch, C., Verlinden, L., Eelen, G. U. Y., Tan, B. K., Van Camp, M., Bouillon, R., & Verstuyf, A. (2009). The impact of 1, 25 (OH) 2D3 and its structural analogs on gene expression in cancer cells—a microarray approach. *Anticancer research*, 29(9), 3471-3483.

Krishnan, A. V., & Feldman, D. (2011). Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 51, 311-336.

Kritsanawong, S., Innajak, S., Imoto, M., & Watanapokasin, R. (2016). Antiproliferative and apoptosis induction of α -mangostin in T47D breast cancer cells. *International journal of oncology*, 48(5), 2155-2165.

Kulesza, U., Plum, L. A., DeLuca, H. F., Mourino, A., & Sicinski, R. R. (2015). Novel 9-Alkyl-and 9-Alkylidene-Substituted 1α , 25-Dihydroxyvitamin D3 Analogues: Synthesis and Biological Examinations. *Journal of medicinal chemistry*, 58(15), 6237-6247.

Kulić, A., Dedić Plavetić, N., Vrbanec, J., & Sirotković-Skerlev, M. (2012). Low serum MMP-1 in breast cancer: a negative prognostic factor?. *Biomarkers*, 17(5), 416-421.

Kumar, R. (1984). Metabolism of 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *Physiological Reviews*, 64(2), 478-504.

L

Lambrechts, A., Van Troys, M., & Ampe, C. (2004). The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(10), 1890-1909.

Larriba, M. J., González-Sancho, J. M., Barbáchano, A., Niell, N., Ferrer-Mayorga, G., & Muñoz, A. (2013). Vitamin D is a multilevel repressor of Wnt/b-catenin signaling in cancer cells. *Cancers*, 5(4), 1242-1260.

Larriba, M. J., Ordóñez-Morán, P., Chicote, I., Martín-Fernández, G., Puig, I., Muñoz, A., & Pálmer, H. G. (2011). Vitamin D receptor deficiency enhances Wnt/ β -catenin signaling and tumor burden in colon cancer. *PLoS one*, 6(8), e23524.

Laskowski, R. A., & Swindells, M. B. (2011). LigPlot+: multiple ligand–protein interaction diagrams for drug discovery.

Laverny, G., & Metzger, D. (2015). VDR and gemini ligands. *Oncotarget*, 6(31), 30429.

Lee, H. J., Wislocki, A., Goodman, C., Ji, Y., Ge, R., Maehr, H., Uskokovic, M., Reiss, M., & Suh, N. (2006). A novel vitamin D derivative activates bone morphogenetic protein signaling in MCF10 breast epithelial cells. *Molecular pharmacology*, 69(6), 1840-1848.

- Lee, J. E., Li, H., Chan, A. T., Hollis, B. W., Lee, I. M., Stampfer, M. J. Wu, K., Giovannucci, E., & Ma, J. (2011). Circulating levels of vitamin D and colon and rectal cancer: the Physicians' Health Study and a meta-analysis of prospective studies. *Cancer prevention research*, 4(5), 735-743.
- Lee, L. R., Teng, P. N., Nguyen, H., Hood, B. L., Kavandi, L., Wang, G., ... & Syed, V. (2013). Progesterone enhances calcitriol antitumor activity by upregulating vitamin D receptor expression and promoting apoptosis in endometrial cancer cells. *Cancer prevention research*, 6(7), 731-743.
- Lennicke, C., Rahn, J., Lichtenfels, R., Wessjohann, L. A., & Seliger, B. (2015). Hydrogen peroxide—production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Communication and Signaling*, 13(1), 1.
- Levine, M. J., & Teegarden, D. (2004). 1α , 25-Dihydroxycholecalciferol Increases the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in C3H10T $\frac{1}{2}$ Mouse Embryo Fibroblasts. *The Journal of nutrition*, 134(9), 2244-2250.
- Leysens, C., Verlinden, L., & Verstuyf, A. (2013). Antineoplastic effects of 1, 25 (OH) 2D3 and its analogs in breast, prostate and colorectal cancer. *Endocrine-related cancer*, 20(2), R31-R47.
- Lin, R., Amizuka, N., Sasaki, T., Aarts, M. M., Ozawa, H., Goltzman, D., Henderson, J.E., & White, J. H. (2002). 1α , 25-Dihydroxyvitamin D₃ Promotes Vascularization of the Chondro-osseous Junction by Stimulating Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Matrix Metalloproteinase 9. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(9), 1604-1612.
- Liu, C., Zhao, G.D., Mao, X., Suenaga, T., Fujishima, T., Zhang, C.M., & Liu, Z.P. (2014). Synthesis and biological evaluation of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ analogues with aromatic side chains attached at C-17. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 85:569-75
- Lo, H. W., Hsu, S. C., Xia, W., Cao, X., Shih, J. Y., Wei, Y. Abbruzzese, J.L., Hortobagyi, G.N., & Hung, M. C. (2007). Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer research*, 67(19), 9066-9076.
- Luo, W., Hershberger, P. A., Trump, D. L., & Johnson, C. S. (2013). 24-Hydroxylase in cancer: Impact on vitamin D-based anticancer therapeutics. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 136, 252-257.
- Lương, K., & Nguyễn, L. (2012). Role of vitamin d in Parkinson's disease. *ISRN neurology*, 2012.

M

Maehr, H., Rochel, N., Lee, H. J., Suh, N., & Uskokovic, M. R. (2013). Diastereotopic and deuterium effects in Gemini. *Journal of medicinal chemistry*, 56(10), 3878-3888.

Malinska, M., Kutner, A., & Woźniak, K. (2015). Predicted structures of new vitamin D receptor agonists based on available x-ray structures. *Steroids*, 104, 220-229.

Mantilla, C., Suárez Mellado, I., Duque Jaramillo, A., & Navas, M. C. (2015). Mecanismos de señalización por β -catenina y su papel en la carcinogénesis. *CES Medicina*, 29(1), 109-127.

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436-444.

Marchionatti, A. M., Picotto, G., Narvaez, C. J., Welsh, J., & de Talamoni, N. G. T. (2009). Antiproliferative action of menadione and 1, 25 (OH) 2 D 3 on breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 113(3), 227-232.

Maruyama, R., Aoki, F., Toyota, M., Sasaki, Y., Akashi, H., Mita, H., ... & Tatsumi, H. (2006). Comparative genome analysis identifies the vitamin D receptor gene as a direct target of p53-mediated transcriptional activation. *Cancer research*, 66(9), 4574-4583.

MarvinSketch v.6.31., ChemAxon Ltd., <http://www.chemaxon.com>

McCollum, E. V., Simmonds, N., Becker, J. E., & Shipley, P. G. (1922). Studies on experimental rickets XXI. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. *Journal of Biological Chemistry*, 53(2), 293-312.

McGann, M. (2011). FRED pose prediction and virtual screening accuracy. *Journal of chemical information and modeling*, 51(3), 578-596.

McGann, M. (2012). FRED and HYBRID docking performance on standardized datasets. *Journal of computer-aided molecular design*, 26(8), 897-906.

Medioni, J., Deplanque, G., Ferrero, J. M., Maurina, T., Rodier, J. M. P., Raymond, E., ... & Renaux, S. (2014). Phase I safety and pharmacodynamic of inecalcitol, a novel VDR agonist with docetaxel in metastatic castration-resistant prostate cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 20(17), 4471-4477.

Mehta, R. G., Peng, X., Alimirah, F., Murillo, G., & Mehta, R. (2013). Vitamin D and breast cancer: Emerging concepts. *Cancer letters*, 334(1), 95-100.

- Mellanby E. (1919) An experimental investigation on rickets. *Lancet*, 1:407-412.
- Miller III, B. R., McGee Jr, T. D., Swails, J. M., Homeyer, N., Gohlke, H., & Roitberg, A. E. (2012). MMPBSA.py: an efficient program for end-state free energy calculations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8(9), 3314-3321.
- Mizwicki, M. T., & Norman, A. W. (2009). The vitamin D sterol–vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. *Science signaling*, 2(75), re4-re4.
- Montecino, M. A., Lian, J. B., Stein, J. L., Stein, G. S., van Wijnen, A. J., & Cruzat, F. (2010). Biological and molecular effects of vitamin D on bone. In *Vitamin D* (pp. 189-209). Humana Press.
- Moreno, J., Krishnan, A. V., Swami, S., Nonn, L., Peehl, D. M., & Feldman, D. (2005). Regulation of prostaglandin metabolism by calcitriol attenuates growth stimulation in prostate cancer cells. *Cancer research*, 65(17), 7917-7925.
- Morris, H. A., & Anderson, P. H. (2010). *Autocrine and paracrine actions of vitamin D* (Doctoral dissertation, Australasian Association of Clinical Biochemists).
- Mouriño, A., Torneiro, M., Vitale, C., Fernández, S., Pérez-Sestelo, J., Anné, S., & Gregorio, C. (1997). Efficient and versatile synthesis of a-ring precursors of 1 α , 25-dihydroxy-vitamin D 3 and analogues. Application to the synthesis of Lythgoe-Roche phosphine oxide. *Tetrahedron letters*, 38(26), 4713-4716.
- Muindi, J. R., Modzelewski, R. A., Peng, Y., Trump, D. L., & Johnson, C. S. (2004). Pharmacokinetics of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 in normal mice after systemic exposure to effective and safe antitumor doses. *Oncology*, 66(1), 62-66.
- Muindi, J. R., Peng, Y., Potter, D. M., Hershberger, P. A., Tauch, J. S., Capozzoli, M. J., Egorin, M.J., Johnson, C.S., & Trump, D. L. (2002). Pharmacokinetics of high-dose oral calcitriol: Results from a phase 1 trial of calcitriol and paclitaxel. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 72(6), 648-659.
- Muindi, J. R., Potter, D. M., Peng, Y., Johnson, C. S., & Trump, D. L. (2005). Pharmacokinetics of liquid calcitriol formulation in advanced solid tumor patients: comparison with caplet formulation. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 56(5), 492-496.
- Muindi, J. R., Yu, W. D., Ma, Y., Engler, K. L., Kong, R. X., Trump, D. L., & Johnson, C. S. (2010). CYP24A1 inhibition enhances the antitumor activity of calcitriol. *Endocrinology*, 151(9), 4301-4312.

Müller, M. F., Ibrahim, A. E., & Arends, M. J. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv*, 469(2), 125-134.

Müller, S., Liepold, B., Roth, G. J., & Bestmann, H. J. (1996). An improved one-pot procedure for the synthesis of alkynes from aldehydes. *Synlett*, 1996(06), 521-522.

N

National Cancer Institute: Comprehensive Cancer Information (on line). Disponible en: <http://www.cancer.gov>. Fecha de la última consulta: 18-12-16.

Nemere I., Safford S.E., Rohe B., DeSouza M.M., Farach-Carson M.C. (2004). Identification and characterization of 1,25D3-membrane-associated rapid response, steroid (1,25D3-MARRS) binding protein. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 89-90(1-5):281-285.

Nonn, L., Peng, L., Feldman, D., & Peehl, D. M. (2006). Inhibition of p38 by vitamin D reduces interleukin-6 production in normal prostate cells via mitogen-activated protein kinase phosphatase 5: implications for prostate cancer prevention by vitamin D. *Cancer research*, 66(8), 4516-4524.

Norman, A. W. (2008). From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *The American journal of clinical nutrition*, 88(2), 491S-499S.

Norman, A. W., Manchand, P. S., Uskokovic, M. R., Okamura, W. H., Takeuchi, J. A., Bishop, J. E., Hisatake, J., Phillip Koeffler, H., & Peleg, S. (2000). Characterization of a novel analogue of 1 α , 25 (OH) 2-vitamin D3 with two side chains: interaction with its nuclear receptor and cellular actions. *Journal of medicinal chemistry*, 43(14), 2719-2730.

Noyola-Martínez, N., Díaz, L., Avila, E., Halhali, A., Larrea, F., & Barrera, D. (2013). Calcitriol downregulates TNF- α and IL-6 expression in cultured placental cells from preeclamptic women. *Cytokine*, 61(1), 245-250.

Nutakul, W., Sobers, H. S., Qiu, P., Dong, P., Decker, E. A., McClements, D. J., & Xiao, H. (2011). Inhibitory effects of resveratrol and pterostilbene on human colon cancer cells: a side-by-side comparison. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(20), 10964-10970.

O

Ochaita, L., & Fernández, S. (2001). Actualización en el tratamiento de la psoriasis. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 25, 4.

OECD. Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents, guideline 407, the OECD guideline for testing of chemical. 1995.

Okamoto, R., Gery, S., Kuwayama, Y., Borregaard, N., Ho, Q., Alvarez, R., ... & Koeffler, H. P. (2014). Novel Gemini vitamin D3 analogs: large structure/function analysis and ability to induce antimicrobial peptide. *International Journal of Cancer*, 134(1), 207-217.

Olmos-Ortiz, A., Noyola-Martínez, N., Barrera, D., Zaga-Clavellina, V., Avila, E., Halhali, A., Biruete, B., Larrea, F., & Díaz, L. (2015). IL-10 inhibits while calcitriol reestablishes placental antimicrobial peptides gene expression. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 148, 187-193.

Omega.2.4.3. OpenEye.Scientific.Software, Santa Fe, NM, <http://www.eyesopen.com>.

Ordóñez-Morán, P., Álvarez-Díaz, S., Valle, N., Larriba, M. J., Bonilla, F., & Muñoz, A. (2010). The effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D 3 on colon cancer cells depend on RhoA-ROCK-p38MAPK-MSK signaling. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 121(1), 355-361.

Orlov, I., Rochel, N., Moras, D., & Klaholz, B. P. (2012). Structure of the full human RXR/VDR nuclear receptor heterodimer complex with its DR3 target DNA. *The EMBO journal*, 31(2), 291-300.

P

Pálmer, H. G., González-Sancho, J. M., Espada, J., Berciano, M. T., Puig, I., Baulida, J., Quintanilla, M., Cano, A., de Herreros, A.G., Lafarga, M., & Muñoz, A. (2001). Vitamin D3 promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of β -catenin signaling. *The Journal of cell biology*, 154(2), 369-388.

Pálmer, H. G., Larriba, M. J., García, J. M., Ordóñez-Morán, P., Peña, C., Peiró, S., ... & Muñoz, A. (2004). The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer. *Nature medicine*, 10(9), 917-919.

Pazos, G., L Rivadulla, M., Perez-Garcia, X., Gandara, Z., & Perez, M. (2014). Gemini analogs of vitamin D. *Current topics in medicinal chemistry*, 14(21), 2388-2397.

Pelczynska, M., Switalska, M., Maciejewska, M., Jaroszewicz, I., Kutner, A., & Opolski, A. (2006). Antiproliferative activity of vitamin D compounds in combination with cytostatics. *Anticancer research*, 26(4A), 2701-2705.

Pereira, F., Larriba, M. J., & Muñoz, A. (2012). Vitamin D and colon cancer. *Endocrine-related cancer*, 19(3), R51-R71.

Petit, V., Boyer, B., Lentz, D., Turner, C. E., Thiery, J. P., & Vallés, A. M. (2000). Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells. *The Journal of cell biology*, 148(5), 957-970.

Picotto, G., Liaudat, A. C., Bohl, L., & Talamoni, N. T. D. (2012). Molecular aspects of vitamin D anticancer activity. *Cancer investigation*, 30(8), 604-614.

Pike, J. W., & Meyer, M. B. (2012). The vitamin D receptor: new paradigms for the regulation of gene expression by 1, 25-dihydroxyvitamin D 3. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 38(1), 13-27.

Plum, L. A., & DeLuca, H. F. (2009). The functional metabolism and molecular biology of vitamin D action. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, 7(1), 20-41.

Puerta-García, E., Cañadas-Garre, M., & Calleja-Hernández, M. Á. (2015). Molecular biomarkers in colorectal carcinoma. *Pharmacogenomics*, 16(10), 1189-1222.

Q

Quintela-Fandino, M., González-Martín, A., & Colomer, R. (2010). Targeting cytoskeleton reorganisation as antimetastatic treatment. *Clinical and Translational Oncology*, 12(10), 662-669.

R

Radisky, E. S., & Radisky, D. C. (2015). Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 20, 1144.

Ramnath, N., Daignault-Newton, S., Dy, G. K., Muindi, J. R., Adjei, A., Elingrod, V. L., ... & Troeschel, S. (2013). A phase I/II pharmacokinetic and pharmacogenomic study of calcitriol in combination with cisplatin and docetaxel in advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 71(5), 1173-1182.

Ravid, A., & Koren, R. (2003). The role of reactive oxygen species in the anticancer activity of vitamin D. *Recent Results Cancer Research*, 164, 357-367.

Redondo Blanco, S. (2014). Modulación de la apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon mediante compuestos bioactivos. Master En Biomedicina Y Oncología Molecular. Universidad de Oviedo, España.

Remmele, W., & Stegner, H. E. (1987). Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Der Pathologe*, 8(3), 138.

Riboldi, E., Musso, T., Moroni, E., Urbinati, C., Bernasconi, S., Rusnati, M., Adorini, L., Presta, M., & Sozzani, S. (2005). Cutting edge: proangiogenic properties of alternatively activated dendritic cells. *The Journal of Immunology*, *175*(5), 2788-2792.

Rochel, N., & Moras, D. (2006). Ligand binding domain of vitamin D receptors. *Current topics in medicinal chemistry*, *6*(12), 1229-1241.

Rochel, N., Wurtz, J. M., Mitschler, A., Klaholz, B., & Moras, D. (2000). The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Molecular cell*, *5*(1), 173-179.

Rohan, J. N. P., & Weigel, N. L. (2009). 1α , 25-dihydroxyvitamin D₃ reduces c-Myc expression, inhibiting proliferation and causing G1 accumulation in C4-2 prostate cancer cells. *Endocrinology*, *150*(5), 2046-2054.

Rohe, B., Safford, S. E., Nemere, I., & Farach-Carson, M. C. (2005). Identification and characterization of 1, 25D 3-membrane-associated rapid response, steroid (1, 25D 3-MARRS)-binding protein in rat IEC-6 cells. *Steroids*, *70*(5), 458-463.

Roy, R., Yang, J., & Moses, M. A. (2009). Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *27*(31), 5287-5297.

S

Saito, H., & Harada, S. (2014). Eldecalcitol replaces endogenous calcitriol but does not fully compensate for its action in vivo. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *144*, 189-196.

Salomón, D. G., Fermento, M. E., Gandini, N. A., Ferronato, M. J., Arévalo, J., Blasco, J., Andrés, N.C., Zenklusen, J.C., Curino, A.C., & Facchinetti, M. M. (2014). Vitamin D receptor expression is associated with improved overall survival in human glioblastoma multiforme. *Journal of neuro-oncology*, *118*(1), 49-60.

Salomon-Ferrer, R., Case, D. A., & Walker, R. C. (2013). An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, *3*(2), 198-210.

Santos-Martínez, N., Díaz, L., Ordaz-Rosado, D., García-Quiroz, J., Barrera, D., Avila, E., ... & Camacho, J. (2014). Calcitriol restores antiestrogen responsiveness in estrogen receptor negative breast cancer cells: A potential new therapeutic approach. *BMC cancer*, *14*(1), 230.

Satake, K., Takagi, E., Ishii, A., Kato, Y., Imagawa, Y., Kimura, Y., & Tsukuda, M. (2003). Anti-tumor effect of vitamin A and D on head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx*, 30(4), 403-412.

Saunders, D. E., Christensen, C., Wappler, N. L., Schultz, J. F., Lawrence, W. D., Malviya, V. K., Malone, J.M., & Deppe, G. (1993). Inhibition of c-myc in breast and ovarian carcinoma cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D₃, retinoic acid and dexamethasone. *Anti-cancer drugs*, 4(2), 201-208.

Scaranti, M., de Castro Júnior, G., & Hoff, A. O. (2016). Vitamin D and cancer: does it really matter?. *Current opinion in oncology*, 28(3), 205-209.

Scarmo, S., Afanasyeva, Y., Lenner, P., Koenig, K. L., Horst, R. L., Clendenen, T. V., ... & Zeleniuch-Jacquotte A. (2013). Circulating levels of 25-hydroxyvitamin D and risk of breast cancer: a nested case-control study. *Breast Cancer Res*, 15(1), R15.

Schenk, M., Aykut, B., Teske, C., Giese, N. A., Weitz, J., & Welsch, T. (2015). Salinomycin inhibits growth of pancreatic cancer and cancer cell migration by disruption of actin stress fiber integrity. *Cancer letters*, 358(2), 161-169.

Scher, H. I., Jia, X., Chi, K., de Wit, R., Berry, W. R., Albers, P., ... & Meluch, A. A. (2011). Randomized, open-label phase III trial of docetaxel plus high-dose calcitriol versus docetaxel plus prednisone for patients with castration-resistant prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29(16), 2191-2198.

Scorilas, A., Karameris, A., Arnogiannaki, N., Ardavanis, A., Bassilopoulos, P., Trangas, T., & Talieri, M. (2001). Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients. *British Journal of Cancer*, 84(11), 1488.

Segovia-Mendoza, M., Díaz, L., González-González, M. E., Martínez-Reza, I., García-Quiroz, J., Prado-García, H., Ibarra-Sánchez, M.J., Esparza-Lopez, J., Larrea, F., & García-Becerra, R. (2015). Calcitriol and its analogues enhance the antiproliferative activity of gefitinib in breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 148, 122-131.

Sergeev, I. N. (2005). Calcium signaling in cancer and vitamin D. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 97(1), 145-151.

Sethi, G., Sung, B., & Aggarwal, B. B. (2008). TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci*, 13(2), 5094-107.

Shan, N. L., Wahler, J., Lee, H. J., Bak, M. J., Gupta, S. D., Maehr, H., & Suh, N. (2016). Vitamin D compounds inhibit cancer stem-like cells and induce differentiation in triple negative breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*.

- Sharabani, H., Izumchenko, E., Wang, Q., Kreinin, R., Steiner, M., Barvish, Z., ... & Danilenko, M. (2006). Cooperative antitumor effects of vitamin D3 derivatives and rosemary preparations in a mouse model of myeloid leukemia. *International journal of cancer*, 118(12), 3012-3021.
- Shay, J. W., & Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *European journal of cancer*, 33(5), 787-791.
- Shui, I. M., Mucci, L. A., Kraft, P., Tamimi, R. M., Lindstrom, S., Penney, K. L., ... & Stampfer, M. J. (2012). Vitamin d-related genetic variation, plasma vitamin d, and risk of lethal prostate cancer: A prospective nested case-control study. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(9), 690-699.
- Siegel, R., DeSantis, C., & Jemal, A. (2014). Colorectal cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*, 64(2), 104-117.
- Slapak, C. A., Desforges, J. F., Fogaren, T., & Miller, K. B. (1992). Treatment of acute myeloid leukemia in the elderly with low-dose cytarabine, hydroxyurea, and calcitriol. *American journal of hematology*, 41(3), 178-183.
- So, J. Y., Smolarek, A. K., Salerno, D. M., Maehr, H., Uskokovic, M., Liu, F., & Suh, N. (2013). Targeting CD44-STAT3 signaling by Gemini vitamin D analog leads to inhibition of invasion in basal-like breast cancer. *PloS one*, 8(1), e54020.
- Sousa Moreira, I., Alexandrino Fernandes, P., & Joao Ramos, M. (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition-a critical review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 7(2), 223-245.
- Spina, C. S., Ton, L., Yao, M., Maehr, H., Wolfe, M. M., Uskokovic, M., ... & Holick, M. F. (2007). Selective vitamin D receptor modulators and their effects on colorectal tumor growth. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 103(3), 757-762.
- Spina, C., Tangpricha, V., Yao, M., Zhou, W., Wolfe, M. M., Maehr, H., Uskokovic, Adorini, L., & Holick, M. F. (2005). Colon cancer and solar ultraviolet B radiation and prevention and treatment of colon cancer in mice with vitamin D and its Gemini analogs. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 97(1), 111-120.
- St-Arnaud, R. (2008). The direct role of vitamin D on bone homeostasis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 473(2), 225-230.
- Sternlicht, M. D., Bissell, M. J., & Werb, Z. (2000). The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene*, 19(8), 1102.

Stubbins, R. E., Hakeem, A., & Núñez, N. P. (2012). Using components of the vitamin D pathway to prevent and treat colon cancer. *Nutrition reviews*, 70(12), 721-729.

Sympson, C. J., Bissell, M. J., & Werb, Z. (1995). Mammary gland tumor formation in transgenic mice overexpressing stromelysin-1. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 6, No. 3). NIH Public Access.

T

Teske, K. A., Yu, O., & Arnold, L. A. (2016). Chapter Three-Inhibitors for the Vitamin D Receptor–Coregulator Interaction. *Vitamins & Hormones*, 100, 45-82.

Toner, C. D., Davis, C. D., & Milner, J. A. (2010). The vitamin D and cancer conundrum: aiming at a moving target. *Journal of the American Dietetic Association*, 110(10), 1492-1500.

Trump, D. L., Deeb, K., & Johnson, C. S. (2010). Vitamin D: considerations in the continued development as an agent for cancer prevention and therapy. *Cancer Journal*, 16(1), 1-9.

U

Urtreger, A., Ladeda, V., Puricelli, L., Rivelli, A., Vidal, M., Delustig, E., & Joffe, E. D. B. D. (1997). Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines. *International journal of oncology*, 11(3), 489-496.

Uskokovic, M.R., Manchand, P.S., Peleg, S., & Norman, A.W. (1997). Proceedings of the 10th International Vitamin D Workshop. page 19–21.

V

Verhave, G., & Siegert, C. E. (2010). Role of vitamin D in cardiovascular disease. *Neth J Med*, 68(3), 113-8.

Vicencio, J. M., Galluzzi, L., Tajeddine, N., Ortiz, C., Criollo, A., Tasdemir, E., ... & Kroemer, G. (2008). Senescence, apoptosis or autophagy?. *Gerontology*, 54(2), 92-99.

VIDA.4.2.1 OpenEye.Scientific.Software, Santa Fe, NM, <http://www.eyesopen.com>.

W

Wahler, J., So, J. Y., Kim, Y. C., Liu, F., Maehr, H., Uskokovic, M., & Suh, N. (2014). Inhibition of the transition of ductal carcinoma in situ to invasive ductal carcinoma by a Gemini vitamin D analog. *Cancer Prevention Research*, 7(6), 617-626.

Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *Journal of computational chemistry*, 25(9), 1157-1174.

Wang, T. J., Zhang, F., Richards, J. B., Kestenbaum, B., Van Meurs, J. B., Berry, D., ... & Peltonen, L. (2010). Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *The Lancet*, 376(9736), 180-188.

Wang, T. T., Nestel, F. P., Bourdeau, V., Nagai, Y., Wang, Q., Liao, J., ... & White, J. H. (2004). Cutting edge: 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *The Journal of Immunology*, 173(5), 2909-2912.

Webb, A. R., DeCosta, B. R., & Holick, M. F. (1989). Sunlight Regulates the Cutaneous Production of Vitamin D₃ by Causing Its Photodegradation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 68(5), 882-887.

Weinberg, R. (2013). *The biology of cancer*. Garland science.

Weitsman, G. E., Koren, R., Zuck, E., Rotem, C., Liberman, U. A., & Ravid, A. (2005). Vitamin D sensitizes breast cancer cells to the action of H₂O₂: mitochondria as a convergence point in the death pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(2), 266-278.

Welsh, J. (2012). Cellular and molecular effects of vitamin D on carcinogenesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 523(1), 107-114.

Wierzbicka, J. M., Binek, A., Ahrends, T., Nowacka, J. D., Szydłowska, A., Turczyk, Ł., ... & Żmijewski, M.A. (2015). Differential antitumor effects of vitamin D analogues on colorectal carcinoma in culture. *International journal of oncology*, 47(3), 1084-1096.

Williams, C., Helguero, L., Edvardsson, K., Haldosén, L. A., & Gustafsson, J. A. (2009). Gene expression in murine mammary epithelial stem cell-like cells shows similarities to human breast cancer gene expression. *Breast Cancer Res*, 11(3), R26.

Windaus, A., & Bock, F. (1936). Über das Provitamin aus dem Sterin der Schweineschwarte. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 245(3-4), 168-170.

Windberger, U., Bartholovitsch, A., Plasenzotti, R., Korak, K. J., & Heinze, G. (2003). Whole blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte aggregation in nine mammalian species: reference values and comparison of data. *Experimental physiology*, 88(3), 431-440.

Wiseman, B. S., Sternlicht, M. D., Lund, L. R., Alexander, C. M., Mott, J., Bissell, M. J., ... & Werb, Z. (2003). Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis. *The Journal of cell biology*, 162(6), 1123-1133.

Woloszynska-Read, A., Johnson, C. S., & Trump, D. L. (2011). Vitamin D and cancer: clinical aspects. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(4), 605-615.

Wu, Z. S., Wu, Q., Yang, J. H., Wang, H. Q., Ding, X. D., Yang, F., & Xu, X. C. (2008). Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *International journal of cancer*, 122(9), 2050-2056.

X

Xu, J., Li, W., Ma, J., Liu, J., Sha, H., Zhou, S., ... & Ma, Q. (2013). Vitamin D-pivotal nutraceutical in the regulation of cancer metastasis and angiogenesis. *Current medicinal chemistry*, 20(33), 4109-4120.

Y

Yadav, L., Puri, N., Rastogi, V., Satpute, P., Ahmad, R., & Kaur, G. (2014). Matrix metalloproteinases and cancer-roles in threat and therapy. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 15(3), 1085-1091.

Yamada, O., Ozaki, K., Nakatake, M., Akiyama, M., Kawauchi, K., & Matsuoka, R. (2008). Multistep regulation of telomerase during differentiation of HL60 cells. *Journal of leukocyte biology*, 83(5), 1240-1248.

Yan, M., Yang, X., Wang, L., Clark, D., Zuo, H., Ye, D., ... & Zhang, P. (2013). Plasma membrane proteomics of tumor spheres identify CD166 as a novel marker for cancer stem-like cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(11), 3271-3284.

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

Yoon, P. S., & DeLuca, H. F. (1980). Purification and properties of chick renal mitochondrial ferredoxin. *Biochemistry*, 19(10), 2165-2171.

Yu, W. D., Ma, Y., Flynn, G., Muindi, J. R., Kong, R. X., Trump, D. L., & Johnson, C. S. (2010). Calcitriol enhances gemcitabine antitumor activity in vitro and in vivo by promoting apoptosis in a human pancreatic carcinoma model system. *Cell cycle*, 9(15), 3022-3029.

Z

Zhang, B., Cao, X., Liu, Y., Cao, W., Zhang, F., Zhang, S., ... & Niu, R. (2008). Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognosis of invasive breast cancer. *BMC cancer*, 8(1), 1.

Zhang, Y., Leung, D. Y., Richers, B. N., Liu, Y., Remigio, L. K., Riches, D. W., & Goleva, E. (2012). Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *The Journal of Immunology*, 188(5), 2127-2135.

Zhang, Z., Zhang, H., Hu, Z., Wang, P., Wan, J., & Li, B. (2014). Synergy of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and carboplatin in growth suppression of SKOV-3 cells. *Oncology letters*, 8(3), 1348-1354.

Zhu, J., & DeLuca, H. F. (2012). Vitamin D 25-hydroxylase—Four decades of searching, are we there yet?. *Archives of biochemistry and biophysics*, 523(1), 30-36.

Zittermann, A., Schleithoff, S. S., Frisch, S., Götting, C., Kuhn, J., Koertke, H., Kleesiek, K., Tenderich, G., & Koerfer, R. (2009). Circulating calcitriol concentrations and total mortality. *Clinical chemistry*, 55(6), 1163-1170.

Zou, J., Landy, H., Feun, L., Xu, R., Lampidis, T., Wu, C. J., ... & Savaraj, N. (2000). Correlation of a unique 220-kDa protein with vitamin D sensitivity in glioma cells. *Biochemical pharmacology*, 60(9), 1361-1365.

PUBLICACIONES

Y

PRESENTACIONES
A CONGRESOS

El contenido de este trabajo de tesis ha dado origen a las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos:

PUBLICACIONES

Ferronato, M. J., Salomón, D. G., Fermento, M. E., Gandini, N. A., López Romero, A., Rivadulla, M. L., García, X., Gómez, G., Pérez, M., Fall, Y., Facchinetti, M. M. & Curino, C. (2015). Vitamin D Analogue: Potent Antiproliferative Effects on Cancer Cell Lines and Lack of Hypercalcemic Activity. *Archiv der Pharmazie*, 348(5), 315-329. doi: 10.1002/ardp.201400448.

Ferronato, M. J., Alonso, E. N., Gandini, N. A., Fermento, M. E., Villegas, M. E., Quevedo, M. A., Arévalo, J., López Romero, A., Rivadulla, M.L., Gómez, G., Fall, Y., Facchinetti, M.M., & Curino, A.C. (2016). The UVB1 Vitamin D analogue inhibits colorectal carcinoma progression. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 163, 193-205. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.05.019. Epub 2016 May 18.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

Estudio de los efectos antineoplásicos de un nuevo análogo de calcitriol.
Ferronato MJ, Salomón DG, Fall Y, Curino AC, Facchinetti MM. Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar Del Plata, 14 - 17 de Noviembre de 2012.

Efectos antitumorales y actividad calcémica de un nuevo análogo de la vitamina D3. **Ferronato MJ**, Salomón DG, Obiol DJ, Fermento ME, Alonso EN, Gandini NA, Arévalo J, Fall Y, Curino AC, Facchinetti MM. Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar Del Plata, 19 - 22 de Noviembre de 2014.

Novel gemini vitamin d analogue: antitumoral effects on cancer cell lines and lack of calcemic activity in mice. Ferronato MJ, Salomón DG, Obiol DJ, Alonso EN, Fall Y, Facchinetti MM, Curino AC. 3ra Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Córdoba, 18 y 19 de Septiembre de 2014. Resumen publicado en la revista internacional: *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, E-ISSN: 0975-8232, P-ISSN: 2320-5148.

Antitumoral effects of a novel gemini vitamin d analogue. Facchinetti MM, Alonso EN, Obiol DJ, Gandini NA, Fermento ME, Fall Y, Curino AC, **Ferronato MJ**. Symposium in Signal Transduction and Molecular Medicine (SISTAM 2015). Bariloche, 1 - 6 de Abril de 2015.

Efectos antitumorales del análogo de calcitriol UVB1 sobre el carcinoma colorrectal. Ferronato MJ, Alonso EN, Gandini NA, Obiol DJ, Fermento ME, Quevedo MA, Arévalo J, López Romero A, Fall Y, Curino AC, Facchinetti MM. Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar Del Plata, 18 - 21 de noviembre de 2015.