



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO SINÉRGICO DEL GEFITINIB Y EL CALCITRIOL PARA
INHIBIR EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS TUMORALES DE
GLÁNDULA MAMARIA HUMANA.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

PAMELA RODRÍGUEZ JUÁREZ



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre

VOCAL: Prof. Atonatiu Edmundo Gómez Martínez

SECRETARIO: Dra. Rocío Ángeles García Becerra

1er. SUPLENTE: Dra. María Elena Ibarra Rubio

2do SUPLENTE: Prof. Alejandro Ortiz Osornio

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
Departamento de Biología de la Reproducción.

ASESOR DEL TEMA: Dra. Rocío Ángeles García Becerra _____

SUSTENTANTE: Pamela Rodríguez Juárez _____

DEDICATORIA

A mis padres:

Josefina Juárez y Carlos Rodríguez

Sabiendo que jamás existirá una forma de agradecer una vida de lucha, sacrificio y esfuerzo constantes, solo deseo que entiendan que el logro mío, es logro suyo, que mi esfuerzo es inspirado en ustedes, y que son mi único ideal.

Con cariño y gratitud eterna, porque gracias a su apoyo y consejos hoy veo llegar a su fin una de las metas de mi vida la cual constituye la herencia más valiosa que pudiera recibir para continuar con mi superación.

Con respeto y admiración.

DEDICATORIA

A mis hermanos:

Karla, Vinicio y Ramón, como una muestra de mi cariño y agradecimiento, por todo el amor y el apoyo brindado, porque me han impulsado e inspirado para alcanzar esta meta y porque siempre han sido para mí un ejemplo de superación, les agradezco la orientación que siempre me han brindado.

A mis abuelos:

María Hernández y Vicente Rodríguez, por su apoyo, cariño y sus valiosos consejos.

A mis tíos:

Graciela Rodríguez, Carlos Pérez, Silvia Rodríguez y Mario García, por su cariño y apoyo incondicional.

A mis primos:

Liliana, José Carlos, Silvia y Mario, por los grandes momentos que hemos pasado juntos.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, Dra. Rocío Ángeles García Becerra, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su apoyo y valiosa dirección en la realización de este trabajo.

Al Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre, por darse el tiempo para revisar este estudio, por sus consejos y apoyo que de manera incondicional me brindó en todo momento.

Al Prof. Atonatiu Edmundo Gómez Martínez, por las correcciones que hizo a este trabajo, por sus acertadas sugerencias y comentarios.

A CONACYT por la beca otorgada para la realización de este trabajo a través del proyecto No. CB-2009/129315

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” por todos los recursos y facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

Al Q. Benjamín Ruíz Loyola por su motivación y manera tan especial de compartir sus experiencias y conocimientos.

A Juan Carlos Jiménez Castellanos por su valiosa contribución en este trabajo, pero sobre todo por ser un entrañable compañero, por ser mi mejor amigo y mi mayor crítico, por hacer de mi estancia en Ciudad Universitaria una experiencia inigualable y divertida, por darme su cariño y comprensión.

A mis amigos: Vilma, Ivone, Daniela, Lupita, Caro, Diana, Edgar, Sayabil, Alianny, Cecilia, Fabiola, Eduardo, Paola y Claudia, por los momentos de alegría que hemos pasado juntos y por compartir momentos inolvidables, experiencias positivas y negativas que nos han hecho crecer y fortalecer nuestra amistad.

A mis compañeros del laboratorio de Biología de la Reproducción, en especial a Mariana y Zuleima, por hacer más agradable mi permanencia en el laboratorio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en particular a la Facultad de Química, porque de manera especial forman parte de lo que soy ahora.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO 1. Cáncer de mama	3
1.1. Generalidades	3
CAPÍTULO 2. El receptor del factor de crecimiento epidérmico	4
2.1. La familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico	4
2.2. Dimerización de los receptores HER y vías de transducción de señales	5
2.3. Sobreexpresión del HER2 en diferentes neoplasias	9
CAPÍTULO 3. Tratamientos en cáncer de mama	9
3.1. Generalidades	9
3.2. Cirugía	11
3.3. Radioterapia	11
3.4. Quimioterapia	12
3.5. Terapia hormonal	12
3.6. Terapia dirigida a blancos moleculares	12
CAPÍTULO 4. Gefitinib	13
4.1. Generalidades	13
4.2. Mecanismo de acción	14
4.3. Efectos en cáncer de mama	15
4.4. Propiedades farmacológicas	17
4.5. Reacciones adversas	17
CAPÍTULO 5. Vitamina D	18
5.1. Generalidades	18
5.2. Metabolismo	18

5.3. Funciones generales.....	20
5.4. Mecanismo de acción	20
5.5. Efectos en cáncer de mama	21
CAPÍTULO 6. Interacciones entre gefitinib y calcitriol	23
6.1. Estudios sobre la combinación del gefitinib y el calcitriol	23
<i>HIPÓTESIS</i>.....	26
<i>OBJETIVOS</i>	27
<i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	28
1. Reactivos	28
2. Tejidos Humanos	28
3. Cultivo celular.....	29
4. Estudios de proliferación y combinación de antineoplásicos.	29
4. Análisis estadístico	30
<i>RESULTADOS</i>	31
1. Efecto antiproliferativo del gefitinib y el calcitriol.	31
2. Efecto de la combinación del gefitinib y el calcitriol	36
<i>DISCUSIÓN</i>	40
<i>CONCLUSIÓN</i>.....	43
<i>REFERENCIAS</i>	44

ABREVIATURAS

CAM	Células derivadas de biopsias de carcinoma mamario
CE ₅₀	Concentración efectiva 50
EGFR	Familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERK´s	cinastas reguladas por señales extracelulares
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
IC	índice de combinación
MAPK´s	Cinastas de proteína activadas por mitógeno
PI3K	3-cinasa del fosfatidil inositol
PKC	Cinasa C de proteína
RAMs	Reacciones adversas al medicamento
RE	Receptor de estrógenos
RP	Receptor de progesterona
RXR	Receptor de retinoide X
VDR	Receptor nuclear de la vitamina D

RESUMEN

Los receptores del factor de crecimiento epidérmico 1 y 2 (EGFR, HER2) son expresados en varios tipos de cáncer de mama y su sobreexpresión está relacionada a fenotipo más agresivo. El gefitinib (ZD1839, Iressa) inhibe la tirosina cinasa del EGFR. Además, es un potente inhibidor de la proliferación tanto de células que sobreexpresan este receptor así como también, en aquellas que adicionalmente expresan el HER2.

Siguiendo la línea en tratamientos oncológicos, existe una molécula con potente actividad antineoplásica llamada vitamina D o calcitriol. Estudios epidemiológicos han demostrado una estrecha relación entre la deficiencia de la vitamina D y el riesgo a desarrollar diversos tipos de cáncer. Por ejemplo: cáncer de mama.

El objetivo de este estudio fue determinar el posible efecto sinérgico del gefitinib y el calcitriol, en la inhibición de células tumorales de glándula mamaria humana. Las concentraciones efectivas 50 (CE_{50}) se determinaron en base a las curvas dosis respuesta de los estudios de proliferación celular utilizando el ensayo de XTT. A través de la ecuación de Chou-Talalay, se obtuvo el índice de combinación, el cual permitió evaluar la interacción de los compuestos.

Los resultados obtenidos demostraron que el gefitinib y el calcitriol a una CE_{50} de 1×10^{-7} M y 4.07×10^{-8} M respectivamente, inhiben la proliferación de las células SUM-229PE de manera dependiente a la concentración. Los valores de la CE_{50} del gefitinib en células derivadas de biopsias de carcinoma mamario (CAM), fueron 10 veces mayores a los obtenidos con la SUM-229PE. Las combinaciones entre el gefitinib y el calcitriol resultaron ser más efectivas al reducir de manera significativa el crecimiento celular. Mientras que al realizar estudios por separado del inhibidor específico del EGFR y del secoesteroide, el efecto farmacológico fue menor.

El gefitinib en combinación con calcitriol presentan efecto sinérgico para inhibir la proliferación *in vitro* de células tumorales de glándula mamaria humana.

INTRODUCCIÓN

El término cáncer, designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo. Se caracteriza por un incremento anormal de células. Existe una continua división celular que produce acumulaciones de células o bultos anómalos comúnmente llamados tumores los cuales pueden ser benignos o malignos. En el caso de un tumor benigno, las células se multiplican de forma descontrolada, pero no se extienden a otras partes del organismo. Sin embargo, si el tumor es maligno, las células que lo forman tienen capacidad para extenderse a otros órganos. Esta última condición es denominada cáncer. Una vez que las células comienzan a propagarse, se denomina metástasis [1].

El cáncer de mama es una neoplasia maligna en la que el proceso proliferativo afecta las células que constituyen los lóbulos y conductos mamarios. Cada lóbulo está formado de partes más pequeñas llamadas lobulillos, los cuales contienen grupos de glándulas diminutas que pueden producir leche. Esta es transportada desde los lobulillos al pezón por los conductos mamarios. Toda la mama está irrigada por vasos sanguíneos y linfáticos, a través de ellos se produce la diseminación a distancia de las células tumorales dando origen a la metástasis. Los vasos linfáticos transportan y conducen la linfa a órganos más pequeños llamados ganglios linfáticos los cuales presentan agrupación en racimos cerca de la mama, a la altura de la axila (Figura. 1) [1]. La mayoría de los casos de cáncer mamario comienza en los conductos o lóbulos. Aproximadamente, 75% de los casos en cáncer de mama comienza en las células que recubren internamente los conductos de la leche y es denominado carcinoma ductal. Si la enfermedad se ha diseminado fuera del conducto hacia el tejido circundante, se denomina carcinoma ductal invasivo o infiltrante. La enfermedad que no se ha diseminado se designa "*in situ*". El cáncer que comienza en los lobulillos se conoce como carcinoma lobulillar. Este tipo de neoplasia al igual que el ductal puede ser invasivo o *in situ*. El principal sitio de metástasis en cáncer de mama suele ser los ganglios linfáticos axilares.

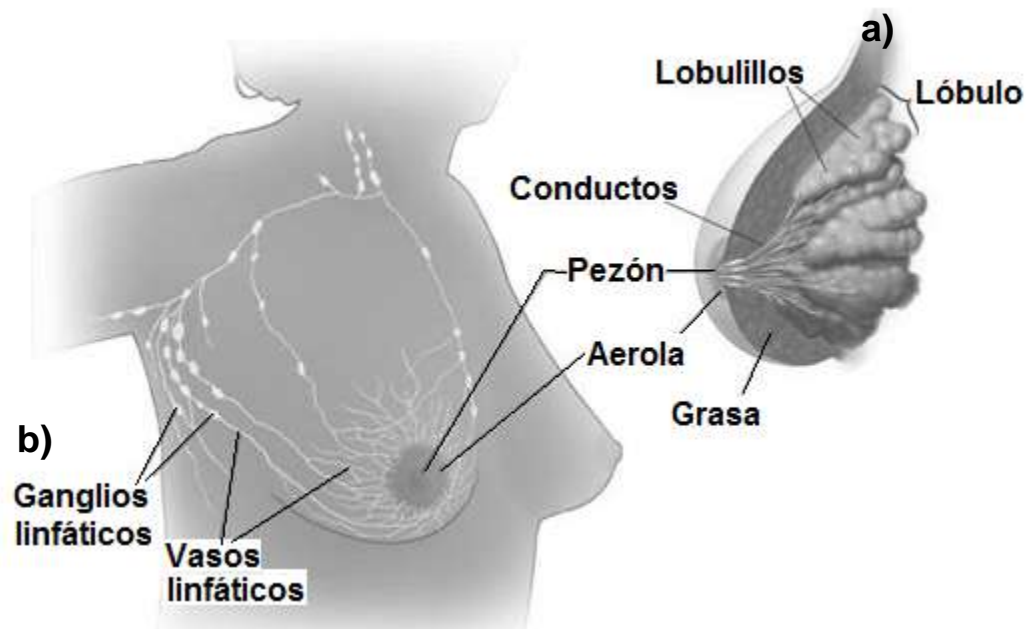


Figura 1. Esquema de la anatomía de la mama. a) Lóbulos y conductos dentro del seno. b) ganglios linfáticos [1].

CAPÍTULO 1. Cáncer de mama

1.1. Generalidades

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en la población femenina. Es un problema de salud pública tanto en países desarrollados como en los subdesarrollados. En estos últimos se ha evidenciado un incremento en su frecuencia y mortalidad [2]. Todos los años más de un millón de mujeres alrededor del mundo son diagnosticadas con cáncer de mama, lo que representa una incidencia del 23%. Este tipo de cáncer causa más de 410,000 muertes todos los años, lo que representa cerca del 14% de mortalidad de cáncer en mujeres [3].

En México, el cáncer de mama es causante de un número mayor de muertes en comparación con el cáncer cérvicouterino (Figura 2). En la actualidad, es la segunda causa de muerte más común en mujeres mexicanas entre 30 y 54 años y la tercera más frecuente entre el grupo de 30 a 59 años después de la diabetes y las cardiopatías [4].

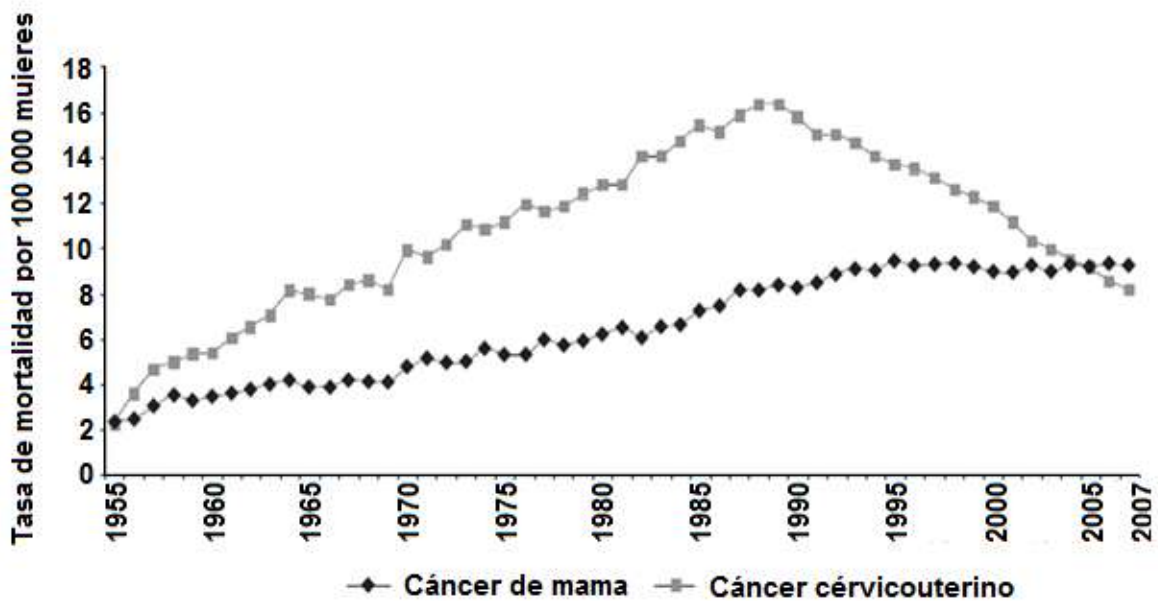


Figura 2. Mortalidad en mujeres por cáncer cérvicouterino y cáncer de mama en México. En el 2006, el riesgo de morir por cáncer de mama, excede al cáncer cérvicouterino [4].

CAPÍTULO 2. El receptor del factor de crecimiento epidérmico

2.1. La familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico

El cáncer de mama es una enfermedad con etiología heterogénea. Aproximadamente, del 15 al 20 % de los casos en cáncer mamario el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) se encuentra altamente expresado. Se asocia con conducta biológica agresiva, con pobre pronóstico y sobrevida [5]. Este receptor pertenece a la familia de receptores con actividad tirosina cinasa conocida como familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) ó HER. Activa una compleja cascada de transducción de señales que modulan la proliferación celular, supervivencia, adhesión, migración y diferenciación.

La familia EGFR comprende 4 distintos receptores conocidos como: HER1/EGFR/ErbB-1, HER2/ErbB-2/neu, HER3/ErbB-3 y HER4/ErbB-4. Los

receptores están constituidos por un dominio extracelular, en el cual se encuentra el sitio de unión al ligando, un dominio transmembranal y un dominio intracelular citoplasmático con actividad tirosina cinasa (Figura 3) [6]. El HER3 es el único miembro de la familia que carece de actividad tirosina cinasa debido a sustituciones de residuos del dominio cinasa fundamentales para su función [7]. Por otro lado el HER2 carece del dominio de unión al ligando, que puede sufrir dimerización independiente de ligando, y es constitutivamente activo [8].

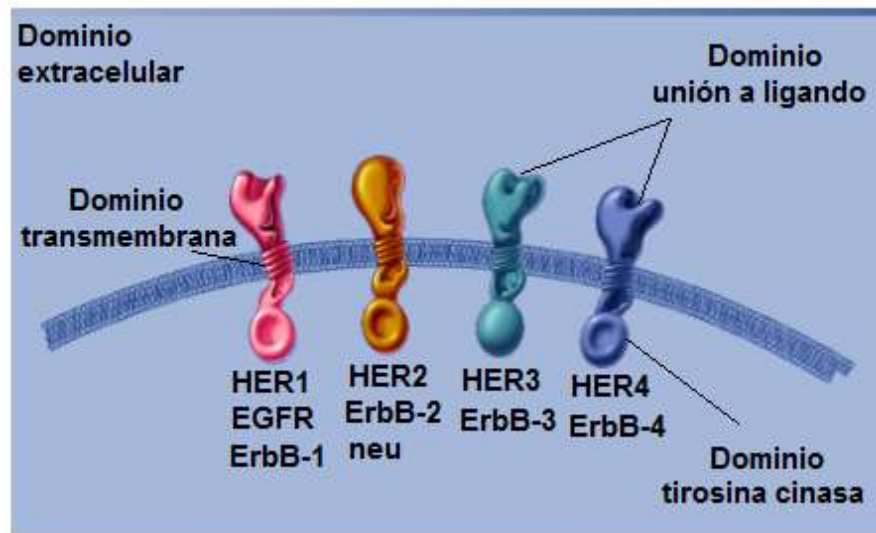


Figura 3. Familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Dominio extracelular, transmembranal e intracelular de los receptores.

2.2. Dimerización de los receptores HER y vías de transducción de señales

Los receptores no están fijados a un sitio de la membrana, por lo que cuando se une el ligando se produce una dimerización. Esta puede ser entre dos receptores idénticos (homodímeros) o dos receptores diferentes (heterodímeros). Es importante porque influye en la cascada de señalización y en los efectos posteriores sobre las funciones celulares. La formación de los dímeros provoca la activación de cascadas de transducción de señales tales como: las cinasas de

proteína activadas por mitógeno (MAPK's) y la 3-cinasa del fosfatidil inositol (PI3K) que regulan múltiples procesos biológicos como proliferación celular, angiogenesis y metástasis mediante el mecanismo que se describe a continuación (Figura 4) [6].

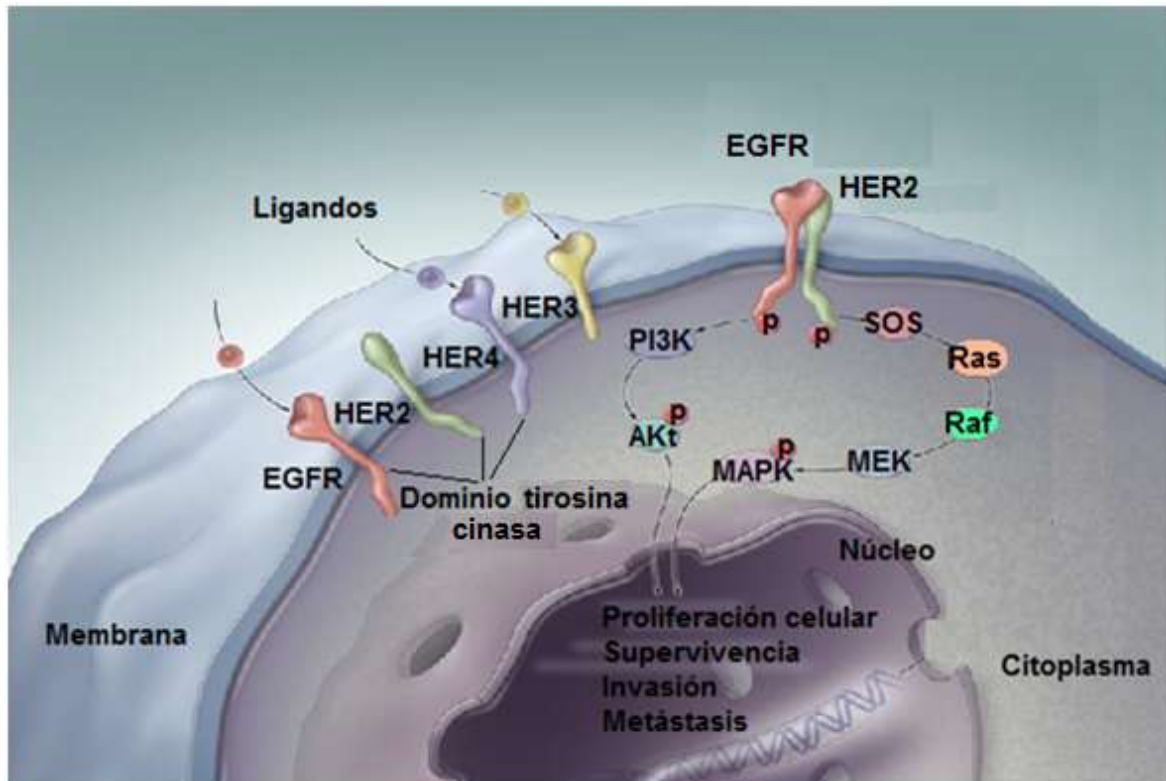


Figura 4. Formación de dímeros y vías de transducción de señales controladas por la activación de EGFR. La unión del ligando al receptor induce la dimerización y la autofosforilación en los residuos de tirosina. Las proteínas SOS induce la activación de la proteína Ras. La proteína Ras-GTP se une y activa a la proteína Raf. Al continuar la cascada, Raf fosforila y activa a MEK, para así fosforilar y activar a las MAPK's. PI3K activa, fosforila el PIP2 convirtiendolo en segundo mensajero PIP3. El segundo mensajero, activa la proteína Akt, teniendo como resultado una respuesta proliferativa y antiapoptotica. [8].

La activación de los receptores requiere tres pasos secuenciales. 1) Unión del ligando al receptor, 2) dimerización de los receptores, y 3) la autofosforilación de los receptores en residuos de tirosina. El primero induce cambios conformacionales en el receptor, los cuales favorecen su interacción con otro receptor para formar un dímero, el cual puede ser homodímero o heterodímero. Además activa al dominio de tirosina cinasa del receptor, por lo que al formar el dímero cada receptor fosforila múltiples residuos de tirosina de su homólogo. A este fenómeno se le conoce como autofosforilación, aunque algunos autores prefieren denominar a este proceso transfosforilación [10].

Una vez activado el receptor, la señalización continúa mediante los residuos de tirosina fosforilados, que se constituyen en el sitio de unión y activación de diversas proteínas. Las proteínas que pueden ser activadas por fosfotirosinas requieren tener en su estructura dominios de reconocimiento de las mismas. Estos dominios están altamente conservados y son conocidos como SH2 (región 2 de homología a Src, por haber sido descrito inicialmente en la proteína Src).

Existe un mecanismo alternativo por el cual pueden activarse proteínas que carecen de dominios SH2. Este proceso requiere de pequeñas proteínas adaptadoras que poseen dominios SH2 así como dominios de unión a otras proteínas de señalización, de manera que dichas proteínas adaptadoras se unen a las fosfotirosinas del receptor y posteriormente se acoplan y activan otras proteínas [10].

Frecuentemente la activación de receptores con actividad tirosina cinasa genera señales que inducen proliferación y diferenciación celular a través de las cinasas que se encuentran en MAPK's, recientemente denominadas cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK's). El intermediario que conecta a la cascada de señalización generada por la activación de un receptor con actividad tirosina cinasa con las ERK's es la proteína Ras, que puede unir nucleótidos de guanina y que posee también actividad de GTPasa. Las proteínas liberadoras de nucleótidos de guanina activan a Ras al favorecer el intercambio de GDP por GTP, mientras que las proteínas estimuladoras de la actividad de GTPasa finalizan la señalización al aumentar la actividad de GTPasa intrínseca a Ras y que hidroliza

el GTP unido a GDP [11]. Es importante señalar que tanto las proteínas liberadoras de nucleótidos de guanina como las estimuladoras de la actividad GTPasa, son proteínas que se activan por unión a fosfotirosinas presentes en los receptores con actividad tirosina cinasa activados.

En el estado activo, Ras activa a la cascada de las ERK's al unirse y activar a Raf, una cinasa serina/treonina que a su vez fosforila y activa a la cinasa de ERK/MAPK (denominada MEK), enzima que fosforila residuos de serina/treonina y de tirosina. Finalmente, la ERK fosforilada pasa del citoplasma al núcleo y regula por fosforilación a otras cinasas y a proteínas reguladoras de la transcripción [12].

Por otra parte, PI3K está formada por dos subunidades: una subunidad catalítica (110 Kd) y una reguladora (85 Kd) que contiene dos dominios SH2. La vía de señalización de la PI3K es estimulada fisiológicamente como consecuencia de la activación de receptores de membrana, los cuales autofosforilan el sustrato del receptor de insulina (IRS); éste último, a la vez, fosforila la subunidad p85 de la PI3K. La fosforilación de la subunidad p85 conduce a un cambio conformacional lo que conduce a su vez la unión de la subunidad catalítica. La PI3K activa, fosforila al fosfatidil inositol 3,4 difosfato (PIP2) convirtiéndolo en el segundo mensajero fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), el cual, conduce a la activación de la proteína Akt. La cual tiene múltiples blancos, responsables de los efectos de la activación de la vía. La activación anormal de esta vía conduce a una respuesta proliferativa y antiapoptótica que se relaciona con el desarrollo de múltiples tipos de cáncer [13].

En la red de señalización, HER2 tiene un patrón preferente por formar heterodímeros con EGFR. HER2 ejerce un efecto potenciador de la señalización del EGFR, al aumentar la afinidad de unión por su ligando (EGF), reducir su degradación y estimular el reciclaje del mismo. Mientras que los homodímeros están destinados a la degradación. Se ha demostrado que la activación del EGFR por su ligando, activa la señalización del HER2 a través de la heterodimerización, y se ha observado que inhibidores del EGFR disminuyen la señalización del HER2 y, por lo tanto, la sobreexpresión de HER2 en células de cáncer de mama [6].

2.3. Sobreexpresión del HER2 en diferentes neoplasias

En muchos tipos de cáncer la familia HER, y en particular los miembros EGFR y HER2, están continuamente activados como resultado de la sobreexpresión del receptor o debido a mutaciones como la T790M, un mecanismo de resistencia a la inhibición de la tirosina cinasa del EGFR [14]. La sobreexpresión del HER2, da lugar a la transformación de las células a un fenotipo maligno y acelera la tumorigénesis. El 30 % de pacientes con tumores de mama sobreexpresan el HER2 (Tabla 1) [15]. La sobreexpresión está correlacionada a un mal pronóstico [5].

Tabla 1. Sobreexpresión de HER2 en diferentes neoplasia

Neoplasia	Sobreexpresión de HER2 (%)
Cáncer de mama	30
Cáncer de ovario	25
Cáncer de endometrio	10
Cáncer de pulmón	9

CAPÍTULO 3. Tratamientos en cáncer de mama

3.1. Generalidades

En la actualidad, existen cinco tipos de tratamiento establecidos: cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal y terapia dirigida a blancos moleculares. La elección del tratamiento se basa en el pronóstico y el comportamiento del tipo de cáncer. En la mayoría de los casos, el factor más importante en la selección del tratamiento es la etapa de la enfermedad. Sin embargo, es necesario que el patólogo realice la determinación de receptores

hormonales en el tumor por ejemplo, presencia del receptor de estrógenos (RE) y receptor de progesterona (RP), debido a que ambos son importantes como factor pronóstico y para definir el tratamiento.

Además, debe determinarse la presencia del HER2 [16]. De acuerdo a este último se puede hacer una clasificación molecular dividiéndose en: HER2 positivo o HER2 negativo (Figura 5) [17].

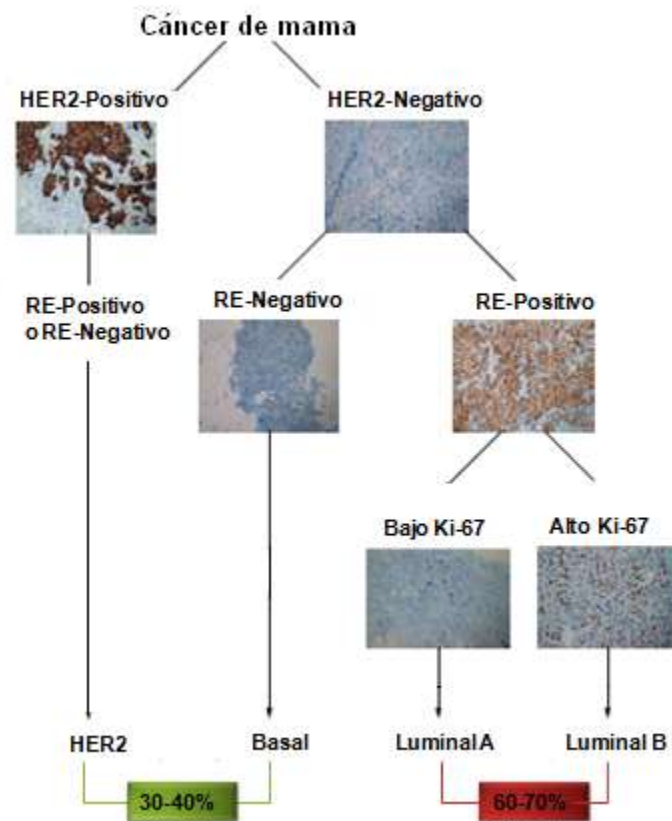


Figura 5. Clasificación molecular del cáncer de mama. Puede ser HER2 positivo ó negativo. En el caso de ser negativo, se encuentran 3 subtipos: basal o triple negativo, luminal A y luminal B [17].

Dentro de HER2 negativo se encuentran 3 subtipos: el basal, luminal A y luminal B. El basal, también conocido como triple negativo, representa el de peor pronóstico. En cuanto al luminal A y B, ambos son RE y RP positivo sin embargo,

el luminal A tiene baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular comparado con el luminal B [16]. Estos tumores responden favorablemente a la supresión de la actividad de hormonas sexuales esteroideas en el organismo mediante diferentes intervenciones terapéuticas como lo es la terapia hormonal [18].

Los HER2 positivo se caracterizan por ser RE positivo o negativo y RP positivo. La presencia del HER2 se ha descrito está involucrada en el desarrollo de resistencia a la terapia hormonal [19]. Por esta razón los pacientes son candidatos a recibir un tratamiento con anticuerpos monoclonales [14].

3.2. Cirugía

Los tumores malignos de mama que son abordados quirúrgicamente a través de mastectomías amplias, llevan consigo mutilaciones importantes. Sin embargo, con el paso de los años y la adquisición de nuevos conocimientos, estas cirugías radicales fueron dando paso a lo que llamamos técnicas conservadoras (tumorectomías, segmentectomías, cuadrantectomías), que preservan la mama en casos determinados, contribuyendo no sólo a la mejora estética, sino también a la salud psicológica de la paciente [16].

3.3. Radioterapia

Es un tratamiento en el cual se utilizan rayos X de alta energía u otro tipo de radiación que destruyen las células cancerosas e impiden su crecimiento. La radioterapia está recomendada en tumores con factores de riesgo para recurrencia, tales como: tamaño grande, varios ganglios linfáticos con metástasis, etc. [16].

3.4. Quimioterapia

Es un tratamiento sistémico basado en el empleo de drogas que interfieren en diversos procesos celulares relacionados con la división celular. Estas drogas poseen actividad citotóxica dirigida fundamentalmente a aquellas células con una intensa actividad proliferativa.

Actualmente, entre los agentes que son utilizados con mayor frecuencia y en los cuales se basan los esquemas estándar de tratamiento del carcinoma de mama, se encuentran la ciclofosfamida, el 5-fluorouracilo (5FU), las antraciclinas y los taxanos [16].

3.5. Terapia hormonal

Esta terapia es utilizada con la intención de evitar la proliferación de células malignas residuales locales o circundantes que hubiesen quedado tras la extirpación del tumor. Existe evidencia que algunos tumores mamarios son dependientes de las hormonas sexuales esteroideas (en especial estrógenos). Particularmente los que presentan expresión de receptores hormonales [16].

En la actualidad existen dos tipos de tratamiento hormonal para cáncer de mama dependiente de estrógenos: los antiestrógenos, también conocidos como moduladores selectivos de los RE. Ejemplos de estos son el tamoxifeno y el fulvestrant y los inhibidores de la aromatasas.

3.6. Terapia dirigida a blancos moleculares

Este tipo de terapia tiene por objetivo bloquear las principales vías de transducción de señales implicadas en la regulación de funciones esenciales de la célula transformada. De esta manera, interfiere en los distintos mecanismos que conducen a la proliferación autónoma, migración celular, metástasis, evasión de las señales apoptóticas y antiproliferativas [16]. Una estrategia para el tratamiento

de cáncer de mama HER2 positivo son los anticuerpos monoclonales como el Trastuzumab, cetuximab y pertuzumab los cuales, inhiben la función del receptor [14]. Sin embargo, esta terapia presenta algunas desventajas. Primero, el reconocimiento por el sistema inmune tras exposiciones repetidas reduce su funcionalidad [20]. Además, se ha descrito que tras su administración se induce sobreexpresión del HER2, dificultando con ello la respuesta al tratamiento [21]. Otro tipo de tratamiento son pequeñas moléculas inhibidoras de la tirosina cinasa como lapatinib, erlotinib y gefitinib.

CAPÍTULO 4. Gefitinib

4.1. Generalidades

El gefitinib (IRESSA, ZD1839), es una molécula pequeña que inhibe selectivamente la actividad tirosina cinasa del EGFR. Es una anilinoquinazolina (Figura 6) sintética con biodisponibilidad oral que posee actividad selectiva. Está indicado para el tratamiento de pacientes adultos con cáncer de pulmón no microcítico [22]. Ha sido poco explorado en cáncer de mama, donde ha mostrado tener efecto antitumoral [23, 24]. Además, se ha reportado que los tumores que sobreexpresan el HER2 son particularmente sensibles a éste compuesto [25].

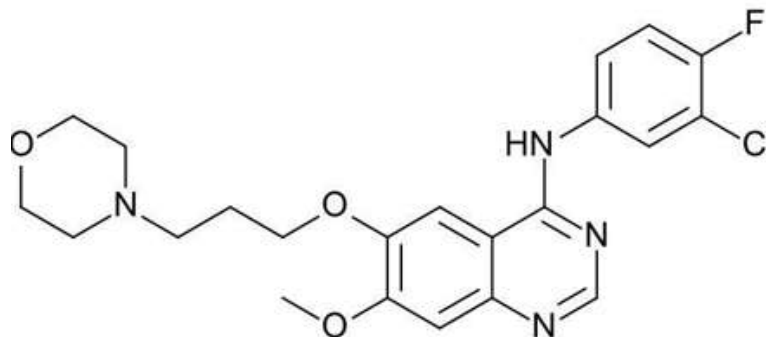


Figura 6. Estructura química del gefitinib.

4.2. Mecanismo de acción

El gefitinib compite por el sitio de unión de la adenosina trifosfato (ATP), inhibe la autofosforilación de la tirosina cinasa del EGFR y con ello afecta las vías de señalización como: las MAPK's y la PI3K (Figura 7) [26]. Sin embargo, el mecanismo exacto de respuesta del gefitinib no está totalmente elucidado. Algunos estudios sugieren que la presencia del EGFR es un paso importante para llevar a cabo su acción.

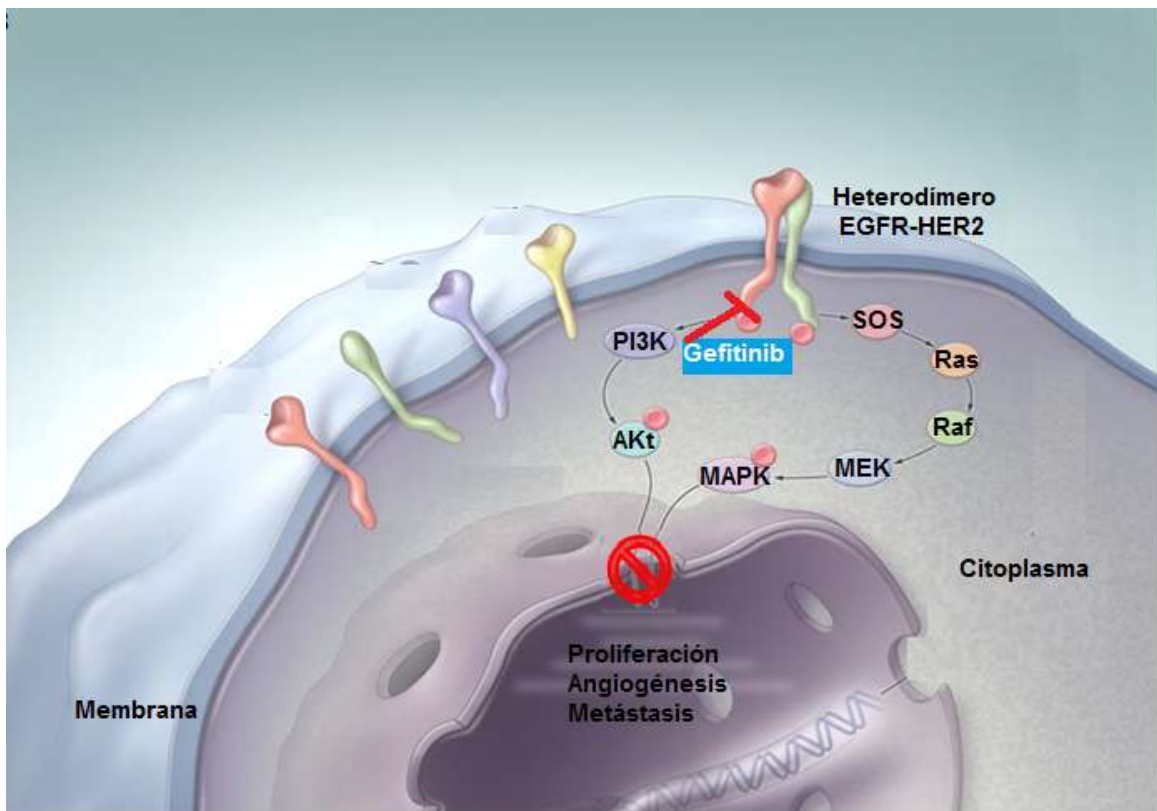


Figura 7. Mecanismo de unión intracelular del gefitinib al dominio tirosina cinasa del EGFR. Bloquea la actividad catalítica de la cinasa y por lo tanto, la inhibición en la señalización de las vías involucradas en la proliferación celular, angiogénesis y metástasis [13].

4.3. Efectos en cáncer de mama

La literatura ha mostrado algunos posibles efectos inhibitorios del gefitinib en el crecimiento de diferentes tumores que expresan el EGFR. En un estudio donde se evaluó el efecto del gefitinib en líneas celulares que expresan diferentes niveles del EGFR y del HER2 (Tabla 2). Se observó que el antineoplásico inhibe la proliferación de las líneas celulares que sobreexpresan el EGFR tales como: A431 y MDA-MB-468. Así mismo, se observó que el gefitinib también inhibe el crecimiento de células que expresaban altos niveles de HER2 y bajos niveles de EGFR (BT-474 y SK-BR-3) (Figura 8) [23].

Tabla 2. Niveles de EGFR y HER2 en las líneas celulares

Línea celular	EGFR (% ^a)	HER2 (% ^b)
MDA-MB-435S	0	0
T47-D	1	24
MDA-MB-231	17	3
BT-474	2	100
MDA-MB-453	0	42
SK-BR-3	1	51
MDA-MB-468	29	0
A431	100	4

a Nivel relativo de expresión calculada como porcentaje de la A431.

b Nivel relativo de expresión calculada como porcentaje de la BT-474 [23].

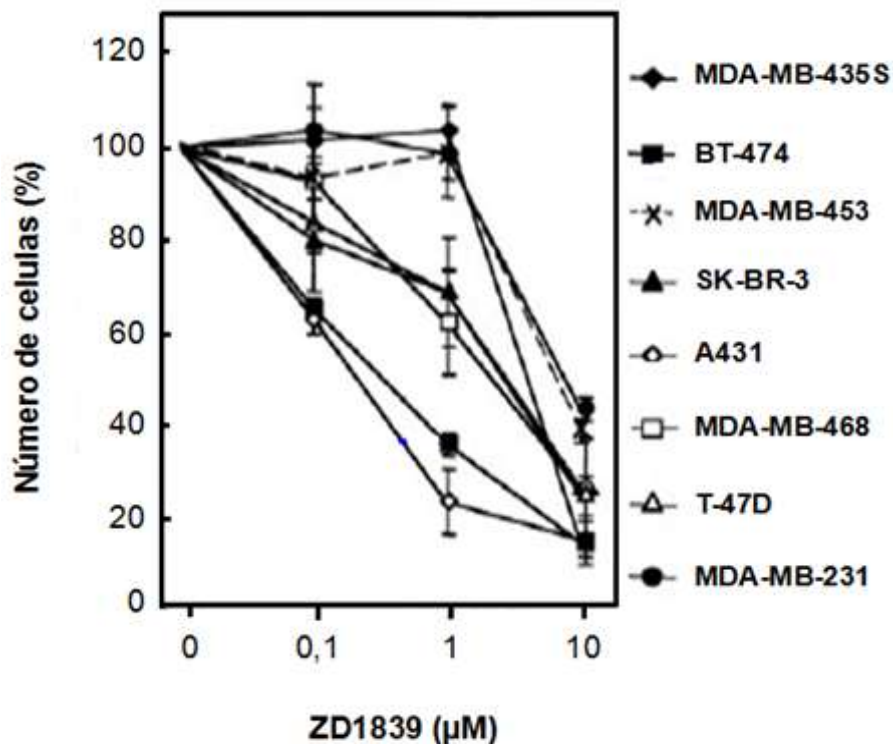


Figura 8. Efecto del gefitinib (ZD1839) en células tumorales con diferentes niveles de expresión del EGFR y el HER2. El gefitinib inhibe la proliferación de líneas celulares con altos niveles de expresión del EGFR tales como: A431 y MDA-MB-468. Sin embargo, el gefitinib fue igualmente potente en la inhibición del crecimiento de las líneas celulares BT-474 y SK-BR-3, que tiene altos niveles de HER2 y niveles bajos de EGFR. En el caso de la línea celular MDA-MB-453, se observó mínima la inhibición del crecimiento celular, que expresa altos niveles de HER2, pero no expresa EGFR [23].

Este estudio concluyó que el gefitinib tiene un marcado efecto antiproliferativo sobre células de cáncer de mama que sobreexpresan HER2. Sin embargo, los resultados sugieren que la presencia de EGFR se requiere para inhibir el crecimiento de las células que sobreexpresan el HER2.

Otro estudio evaluó el efecto del gefitinib en líneas celulares de cáncer de mama que sobreexpresan el HER2. Se observó que el antineoplásico en concentración de 1 μM, inhibe la fosforilación del HER2. En xenoinjertos establecidos en ratones desnudos se observó que el gefitinib previene el crecimiento de las células y al combinarlo con herceptin, aumenta el efecto antitumoral. Concluyeron que los

inhibidores de la tirosina cinasa del EGFR son eficaces contra células tumorales de mama que sobreexpresan HER2 y apoyan su uso en combinación con otros anticuerpos [24].

4.4. Propiedades farmacológicas

La dosis recomendada del gefitinib vía oral es de 250 mg por día. La absorción es moderadamente lenta y las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan generalmente entre 3 y 7 horas después de la administración. Los alimentos no afectan la absorción de gefitinib. Su biodisponibilidad media es de 60 %, con cifras plasmáticas estables de los 7 a los 10 días. Se adhiere a proteínas plasmáticas en un 90 %, y su vida media de eliminación es de 48 horas. Es excretado principalmente en forma de metabolitos por vía fecal, siendo la eliminación renal del gefitinib y sus metabolitos de menos del 4% de la dosis administrada [22].

Gefitinib es metabolizado principalmente por CYP3A4 y CYP2D6. Cinco metabolitos en heces y 8 metabolitos en plasma se han identificado completamente. El principal metabolito identificado ha sido el O-desmetil gefitinib, el cual es 14 veces menos potente que el gefitinib en la inhibición del crecimiento celular estimulado por el EGFR. Por lo que se considera improbable que contribuya a la actividad clínica del gefitinib [22].

4.5. Reacciones adversas

Las reacciones adversas al medicamento (RAMs) más frecuentemente notificadas, que ocurren en un 20% de los pacientes, son diarrea y reacciones cutáneas (salpullido, acné, sequedad cutánea y prurito). Las RAMs normalmente ocurren durante el primer mes de tratamiento y en su mayoría son reversibles [14, 22].

CAPÍTULO 5. Vitamina D

5.1. Generalidades

Por otra parte, una molécula con potente actividad antineoplásica es la vitamina D. Estudios epidemiológicos han mostrado una estrecha relación entre la deficiencia de la vitamina D y el riesgo de desarrollar diversos tipos de cáncer, incluido el mamario, niveles bajos de esta hormona están asociados con la progresión de la enfermedad [27].

La vitamina D o calciferol es miembro de una familia de secoesteroides, uno de los metabolitos de la vitamina D con mayor actividad es el calcitriol, conocido químicamente como $1\alpha, 25\text{-dihidroxitamina D}_3$ ($1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$).

5.2. Metabolismo

La síntesis comienza en la piel a partir del precursor 7-dehidrocolesterol por acción de las radiaciones ultravioleta (UV 300nm) provenientes de la luz solar, que rompen el enlace existente entre el carbono 9 y 10 del anillo B de la molécula, dando lugar a un intermediario inestable que a través de un proceso fototérmico se biotransforma en colecalciferol. Este último, también es obtenido de la ingesta de productos animales como el pescado y los derivados lácteos. Es transportado por su proteína de unión hasta el hígado, donde es hidroxilado por la enzima D-25-hidroxilasa (25-OHasa) produciendo 25-hidroxitamina D_3 (25-OHD₃ o calcidiol), derivado de la vitamina D más abundante en la circulación sanguínea (10-50 ng/ml) [28]. La 25-OHD₃, circula unida a la DBP y en el riñón es hidroxilada en el carbono 1 por acción de la 25-hidroxitamina D_3 -1 α hidroxilasa (1 α -hidroxilasa) para así, obtener su forma hormonalmente activa: $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ o calcitriol, el cual circula en la sangre en concentraciones de entre 15-60 pg/ml (Figura 9) [29].

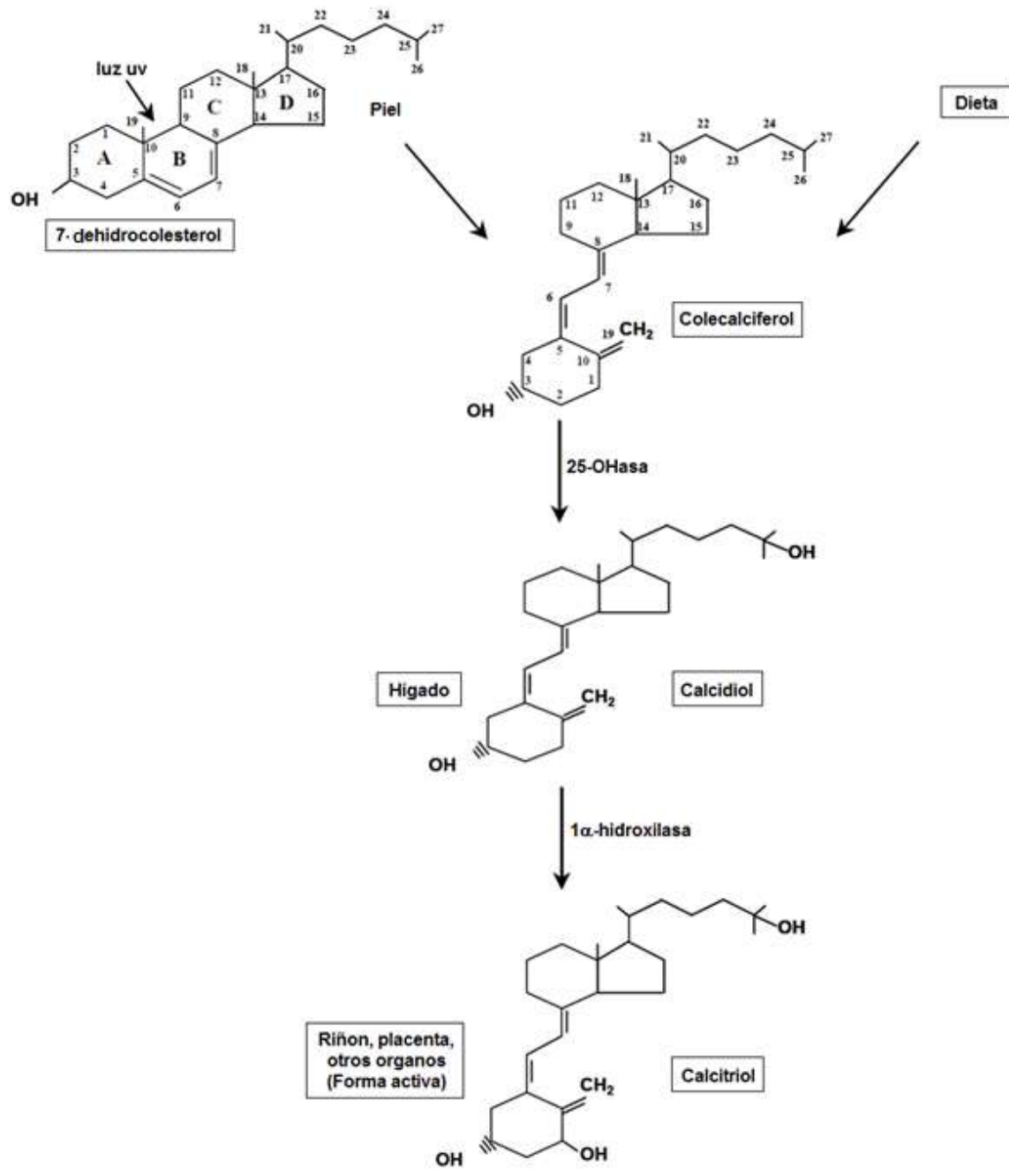


Figura 9. Síntesis del calcitriol. a) Efecto de la luz UV sobre el anillo B del 7-dehidrocolesterol. El colecalciferol, se hidroxila en el hígado por la acción de la 25-OHase. Tras una segunda hidroxilación por acción de la 1 α -hidroxilasa en el riñón, placenta y otros órganos, se obtiene el calcitriol, la forma activa [30].

5.3. Funciones generales

La función clásica del calcitriol es desempeñarse como hormona reguladora de la homeostasis del calcio y del metabolismo óseo. Asimismo, puede regular la progresión del ciclo celular, diferenciación e inducir la apoptosis. Por lo que se ha considerado un compuesto importante en la prevención de cáncer [29]. En diversas líneas de cáncer incluidas las derivadas de mama, esta hormona ha demostrado tener efecto antiproliferativo asociado con la diferenciación celular [31, 32]. También, se ha demostrado que el tratamiento con calcitriol en células de cáncer reduce la expresión del EGFR [33] e inhibe la fosforilación de la vía de la MAPK [34]. Los efectos antiproliferativos del calcitriol son mediados por el VDR por lo que este receptor se considera un prometedor blanco terapéutico.

5.4. Mecanismo de acción

El calcitriol actúa ejerciendo su acción al unirse a receptores nucleares, induciendo posteriormente la síntesis del ARN mensajero (ARNm). El calcitriol se une a una proteína intracelular de alta afinidad presente en el núcleo llamado receptor nuclear de la vitamina D o VDR. El acoplamiento del secoesteroide con su proteína permite la dimerización del VDR con otro receptor nuclear conocido como el receptor de retinoide X (RXR). El heterodímero formado se une a elementos de respuesta para la vitamina D (VDRE) controlando la transcripción de ARN mensajeros específicos que a su vez inducen la síntesis de proteínas específicas para modular efectos calcitriopicos, inmunomoduladores y antiproliferativos (Figura 10) [29].

El calcitriol puede regular la expresión génica y también tiene acciones no genómicas como la unión del calcitriol al VDR. El VDR está asociado con caveolas de la membrana plasmática, activan uno o más sistemas de segundos mensajero para obtener respuestas rápidas, que activan vías como PI3K y la cinasa C de proteína (PKC) (Figura 10) [29].

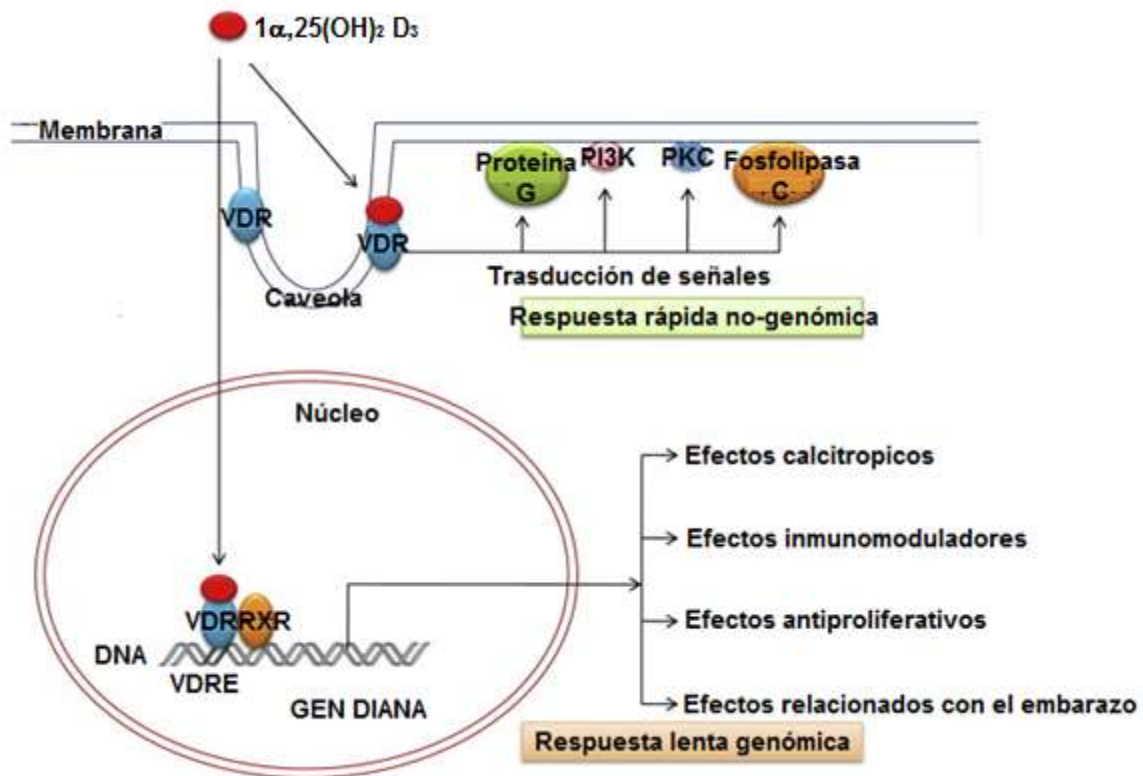


Figura 10. Mecanismo de acción genómico y no genómico del calcitriol. En la primera ruta el calcitriol se une a su receptor nuclear (VDR) y heterodimeriza con el receptor X de retinoides (RXR) para unirse a elementos de respuesta para la vitamina D (VDRE). En la segunda ruta el calcitriol se une a un receptor ubicado en la membrana plasmática (VDRm) activando uno o más sistemas de segundos mensajeros para obtener respuestas rápidas [29].

5.5. Efectos en cáncer de mama

En estudios anteriores se evaluó la capacidad del calcitriol para inhibir la proliferación en células derivadas de tumores de cáncer de mama incluyendo fibroadenomas. Se observó que el calcitriol inhibió significativamente la proliferación celular de manera dependiente a la concentración (Figura 11) [32].

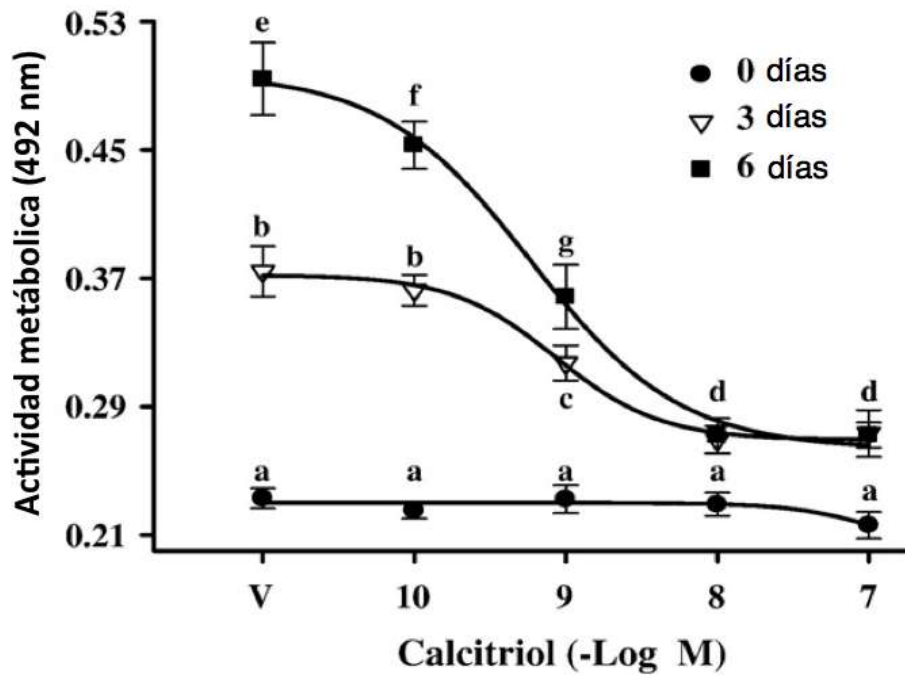


Figura 11. Efecto antiproliferativo del calcitriol en células derivadas de tumores de mama. El calcitriol inhibe significativamente la proliferación celular de manera dependiente a la concentración. Letras distintas indican significancia estadística ($p < 0.05$) [32].

En este estudio se concluyó que el calcitriol podría ser utilizado como alternativa terapéutica para el tratamiento del cáncer de mama y la prevención del mismo. Siendo esto último particularmente importante ya que en los grupos de alto riesgo como las mujeres post-menopáusicas y ancianos, se han reportado bajos niveles de vitamina D [32].

En diferentes líneas celulares de cáncer de mama se evaluó el efecto antiproliferativo del calcitriol, se observó que esta hormona inhibe la proliferación celular de manera concentración-dependiente. También se observó en el estudio, que el efecto en la inhibición de la proliferación celular es asociado con el incremento de la expresión del VDR [35].

CAPÍTULO 6. Interacciones entre gefitinib y calcitriol

6.1. Estudios sobre la combinación del gefitinib y el calcitriol

En la literatura se han reportado 2 estudios fase I sobre la combinación del calcitriol y el gefitinib en pacientes con tumores sólidos. En uno de los estudios realizados se investigó las dosis máximas toleradas en la combinación de ambos antineoplásicos en treinta y dos pacientes. Entre ellos, solo un paciente con cáncer de mama fue evaluado (Tabla 3) [36]. En este trabajo se demostró que el gefitinib inhibe la fosforilación de EGFR, Akt y ERK en la piel. Concluyeron que dosis altas de calcitriol (74 mg / semana) vía intravenosa pueden administrarse con seguridad en combinación con el gefitinib (250 mg / día) [36].

Existe otro estudio donde el objetivo principal fue evaluar la dosis máxima tolerada de calcitriol en combinación con la dexametasona y el gefitinib, se evaluaron 20 pacientes y solo un paciente con cáncer de mama (Tabla 4) [37].

Con los resultados obtenidos en el estudio se probó que la administración del calcitriol (125 mcg/ semana) en combinación con la dexametasona (4 mg/ día) y el gefitinib (250 mg / día) es segura y muy bien tolerada. Se concluye que no hay actividad antitumoral clínicamente en pacientes con tumores sólidos [37].

Cabe señalar que en los estudios antes mencionados, en ninguno se reporta las características de los tumores de los pacientes con cáncer de mama. Considerando que el blanco molecular del gefitinib es el EGFR y que además muestra efecto antiproliferativo sobre células de cáncer de mama que sobreexpresan HER2, las características del tumor son de relevancia para su sensibilidad a esta molécula.

En la literatura se han reportado 2 estudios fase I sobre la combinación del gefitinib y el calcitriol en tumores sólidos. Sin embargo, aún no se ha profundizado en el estudio de esta combinación en cáncer de mama (HER2 positivo y con presencia del EGFR). Tampoco se ha reportado el efecto farmacológico que presenta la combinación ni se han elucidado los mecanismos por los cuales se podría llevar a cabo el efecto antitumoral.

Tabla 3. Características de los pacientes

Características de los pacientes (N= 32 evaluados)	
Genero (hombre/mujer)	21/11
Edad (media/rango), años	65 (36-87)
Tumor primario	
Colorrectal	11
Próstata	4
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	3
Cabeza y cuello	3
Páncreas	2
Sarcoma	2
Mesotelioma	1
<u>Mama</u>	<u>1</u>
Gastrointestinal	1
Anal	1
Esófago	1
Pene	1
Primario desconocido	1

Tabla 4. Características de los pacientes

N=20	
Genero (masculino/femenino)	12.08
Edad (media/rango), años	58 (33-74)
ECOG 0	3
ECGO 1	14
ECGO 2	3
Diagnóstico de cáncer	
Colorrectal	6
Cabeza y cuello	4
Próstata	3
Sarcoma	2
Mama	1
Estómago	1
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	1
Gastrointestinal	1
Uraco	1

HIPÓTESIS

La incubación simultánea del calcitriol y el gefitinib en células tumorales de glándula mamaria humana inhibirá la proliferación celular en mayor medida que la adición de los antineoplásicos por separado.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto farmacológico entre la combinación de gefitinib y calcitriol para la inhibición de células tumorales en cultivo de glándula mamaria humana.

Objetivos particulares

- Derivar células de biopsias de tumores mamarios humanos.
- Determinar la concentración efectiva al 50 (CE₅₀) del gefitinib y el calcitriol en células de cáncer de mama mediante estudios de proliferación.
- Establecer la interacción farmacológica que se presenta al combinar el gefitinib y el calcitriol en la inhibición de la proliferación *in vitro* de células tumorales de glándula mamaria humana

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Reactivos

Medios de cultivo y suero fetal bovino. Invitrogen (CA, EE.UU.). Calcitriol y gefitinib. Donación de la empresa Hoffmann-La Roche Ltd (Basilea, Suiza) y la farmacéutica AstraZeneca, respectivamente. El ensayo de proliferación (XTT) fue adquirido de Roche (Roche Applied Science, IN, EE.UU.).

2. Tejidos Humanos

Las muestras se obtuvieron de pacientes con cáncer de mama. La toma de las muestras se llevó a cabo con aguja de trocar (Silver o Trucut). Se realizó estudio histopatológico para determinar el fenotipo. En el presente estudio se trabajó con células derivadas de biopsias de carcinoma mamario (CAM) con fenotipos HER2 positivo y HER2 negativo. Además, se trabajó con la línea celular SUM-229PE, la cual sobreexpresa EGFR (Tabla 5).

Tabla 5. Caracterización de la línea celular y CAM

Tipo celular	Origen	Inmunocitoquímica			
		RE	RP	HER2/neu	VDR
SUM229PE	Efusión pleural	-	-	+	+
CAM1	Carcinoma ductal invasivo	-	+	+	+
CAM2	Carcinoma ductal invasivo	+	+	-	+
CAM3	Carcinoma ductal invasivo	+	+	+	+

3. Cultivo celular

Las CAM se cultivaron en medio DMEM-F12 suplementado con 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y 5% de suero fetal bovino inactivado por calor. Las incubaciones se realizaron en ambiente húmedo en presencia de una mezcla 5% CO₂-95% aire, a 37° C. Una vez que alcanzaron 70% de confluencia se realizaron los subcultivos y la propagación mediante tripsinización (Tripsina / EDTA 0.25% / 0.2 g/L). Los medios de cultivo fueron cambiados cada tres días. La línea celular SUM-229PE se mantuvo siguiendo las especificaciones del proveedor. Todos los procedimientos experimentales se realizaron en medio DMEM-F12 suplementado con 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y 5% de suero fetal bovino tratado con carbón dextran.

4. Estudios de proliferación y combinación de antineoplásicos.

Las sales de tetrazolio XTT son reducidas a compuestos coloridos derivados del formazán por acción de metabolitos donadores de electrones producidos por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, presente únicamente en las células metabólicamente activas. En este método se tiene una relación directa entre la señal colorimétrica y el número de células vivas y representa una técnica de cuantificación de viabilidad por la actividad metabólica.

Los cultivos celulares se observaron bajo la luz del microscopio y la viabilidad del cultivo fue confirmada usando la prueba de exclusión con el colorante azul tripán, debido a que fácilmente penetra en células no viables y las células normales permanecen sin color. Para calcular la viabilidad se empleó la cámara de Neubauer. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos. En cada pozo una cantidad de células fueron sembradas (1000) en un volumen final de 200 µl de medio suplementado. Las placas se dejaron incubar por 24 horas. Posteriormente se retiró el medio de cultivo por aspiración y las células fueron incubadas en presencia de concentraciones crecientes de gefitinib (1×10^{-11} – 1×10^{-4} M) disuelto en DMSO el cual se utilizó como vehículo, calcitriol (1×10^{-10} – 1×10^{-8}) diluido en etanol el cual también se empleó como vehículo y la combinación de ambos antineoplásicos durante 7 días. Posteriormente, se determinó la

proliferación celular por medio del ensayo colorimétrico XTT de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante.

Las placas fueron incubadas 4 horas en ambiente húmedo en presencia de una mezcla 5% CO₂-95% aire, a 37° C. La absorbancia se determinó por espectrofotometría a 492 nm. La concentración efectiva 50 (CE₅₀) fue obtenida de las curvas concentración-respuesta utilizando el software Origin (OriginLab Corporation, Northampton, MA).

Los valores del índice de combinación (IC) fueron obtenidos de curvas concentración- respuesta al aplicar la ecuación de Chou-Talalay [40]:

$$IC = \frac{(D)_1}{(D_m)_1 [f_a / (1 - f_a)]^{1/m_1}} + \frac{(D)_2}{(D_m)_2 [f_a / (1 - f_a)]^{1/m_2}}$$

Donde:

- D₁ y D₂: Concentración del fármaco 1 y 2
- (D_m)₁ y (D_m)₂: Concentración inhibitoria 50 del fármaco 1 y 2
- f_a: Fracción afectada
- m₁ y m₂: Pendiente de la curva concentración respuesta del fármaco 1 y 2

El término sinergia al aplicar este análisis, es definido como valores de IC menores que 1, aditivo iguales a 1 y antagonismo superiores a 1.

4. Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como la media ± desviación estándar de al menos dos experimentos individuales (SD). Diferencias estadísticamente significativas para los análisis de concentración-respuesta se determinaron utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, utilizando un software especializado (SigmaStat, Jandel Scientific). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a un valor de $p < 0.005$.

RESULTADOS

1. Efecto antiproliferativo del gefitinib y el calcitriol.

Con la finalidad de evaluar los efectos antiproliferativos del gefitinib en células de carcinoma mamario, se llevaron a cabo análisis de concentración-respuesta del fármaco. Los resultados obtenidos demostraron que la línea celular SUM-229PE, estimulada a concentraciones crecientes del gefitinib (1×10^{-11} a 1×10^{-4} M) inhibió de manera dependiente de la concentración la proliferación de las células, y fue significativo desde la concentración de 1×10^{-8} M comparado con el DMSO el cual se utilizó como vehículo (V) (Figura 12).

Para evaluar los efectos del calcitriol en la inhibición de las células SUM-229PE se llevaron a cabo estudios de manera similar a los descritos para el gefitinib. En la figura 12 se muestra que las células incubadas en presencia de concentraciones crecientes del secoesteroide (1×10^{-10} a 1×10^{-6} M) inhibieron de manera dependiente de la concentración la actividad metabólica (Figura 13), y fue significativo vs etanol (V) desde la concentración de 1×10^{-9} M de calcitriol.

De las curvas concentración-respuesta del gefitinib se obtuvo la concentración efectiva al 50 (CE_{50}), dichos valores se resumen en la tabla 6. La CE_{50} del gefitinib en las células SUM-229PE fue de 1×10^{-7} M, y del calcitriol fue de 4.07×10^{-8} M.

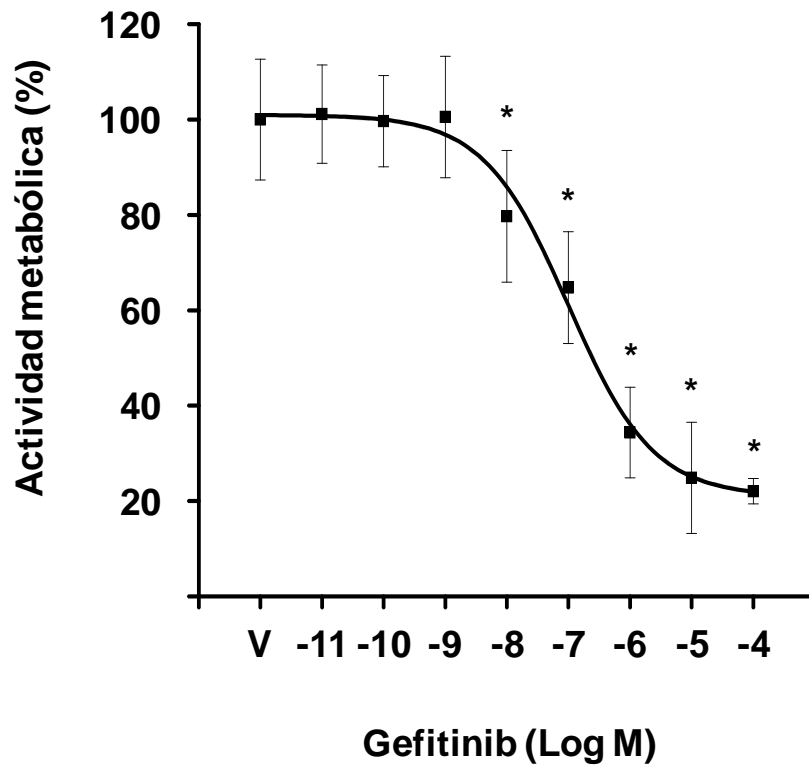


Figura 12. Efecto antiproliferativo del gefitinib en la línea celular SUM-229PE. Las células fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones del gefitinib o DMSO (V) durante 7 días. El crecimiento celular se determinó mediante el método colorimétrico XTT. El V fue considerado como el 100% de la actividad metabólica. Los valores representan el promedio \pm SD de 4 experimentos independientes por sextuplicado. * $p < 0.005$ vs V.

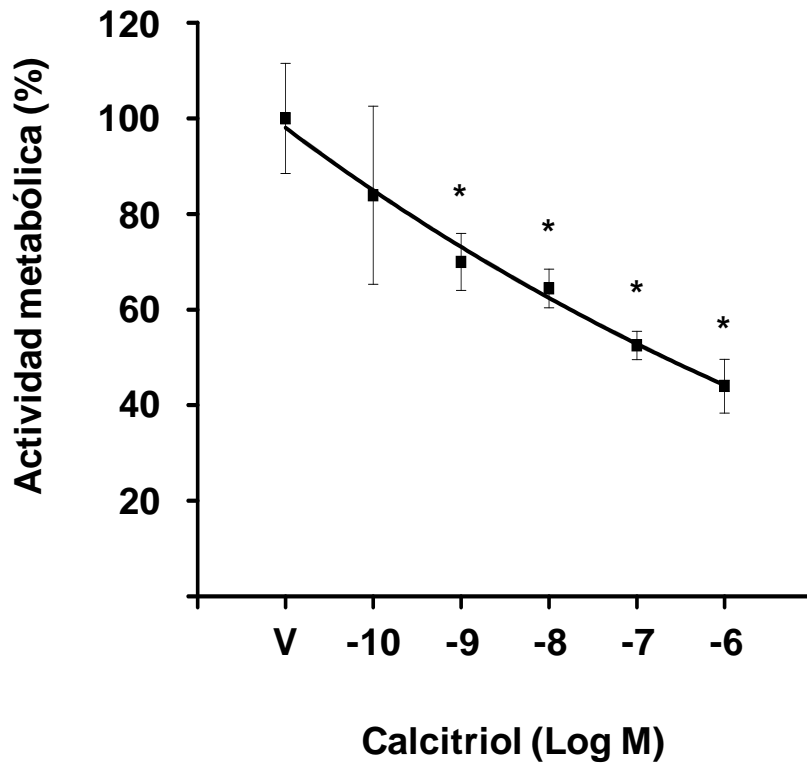


Figura 13. Efecto antiproliferativo del calcitriol en la línea celular SUM-229PE. Las células fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones del calcitriol o etanol (V) durante 7 días. El crecimiento celular se determinó mediante el método colorimétrico XTT. El V fue considerado el 100% de la actividad metabólica. Los valores representan el promedio \pm SD de 1 experimento representativo por sextuplicado. * $p < 0.005$ vs V.

Los estudios de los efectos antiproliferativos del gefitinib en cultivos de células provenientes de pacientes con tumores mamarios con fenotipo HER2 positivo (CAM1 y 3) y negativo (CAM2) demostraron que las incubaciones en presencia del gefitinib (1×10^{-9} a 1×10^{-4} M) resultaron en la inhibición de la proliferación celular de manera significativa a las concentraciones de 5×10^{-6} M, 2.5×10^{-6} M y 1×10^{-6} M del antineoplásico para CAM1, 2 y 3 respectivamente (Figura 14).

En la tabla 6 se muestran las CE_{50} del gefitinib en las CAM cuyos valores fueron 10 veces mayores a los obtenidos con la SUM-229PE. La sensibilidad al gefitinib fue SUM-229PE > CAM3 > CAM1 > CAM2.

Tabla 6. Concentración efectiva al 50 (CE_{50}) del gefitinib para inhibir proliferación en células de cáncer de mama.

Tipo celular	CE_{50} (M)
SUM229PE	1.00×10^{-7}
CAM 1	7.57×10^{-6}
CAM 2	9.44×10^{-6}
CAM 3	2.09×10^{-6}

Tabla 6. Valores de CE_{50} de 4 tipos celulares de cáncer de mama obtenidas a partir de curvas concentración-respuesta.

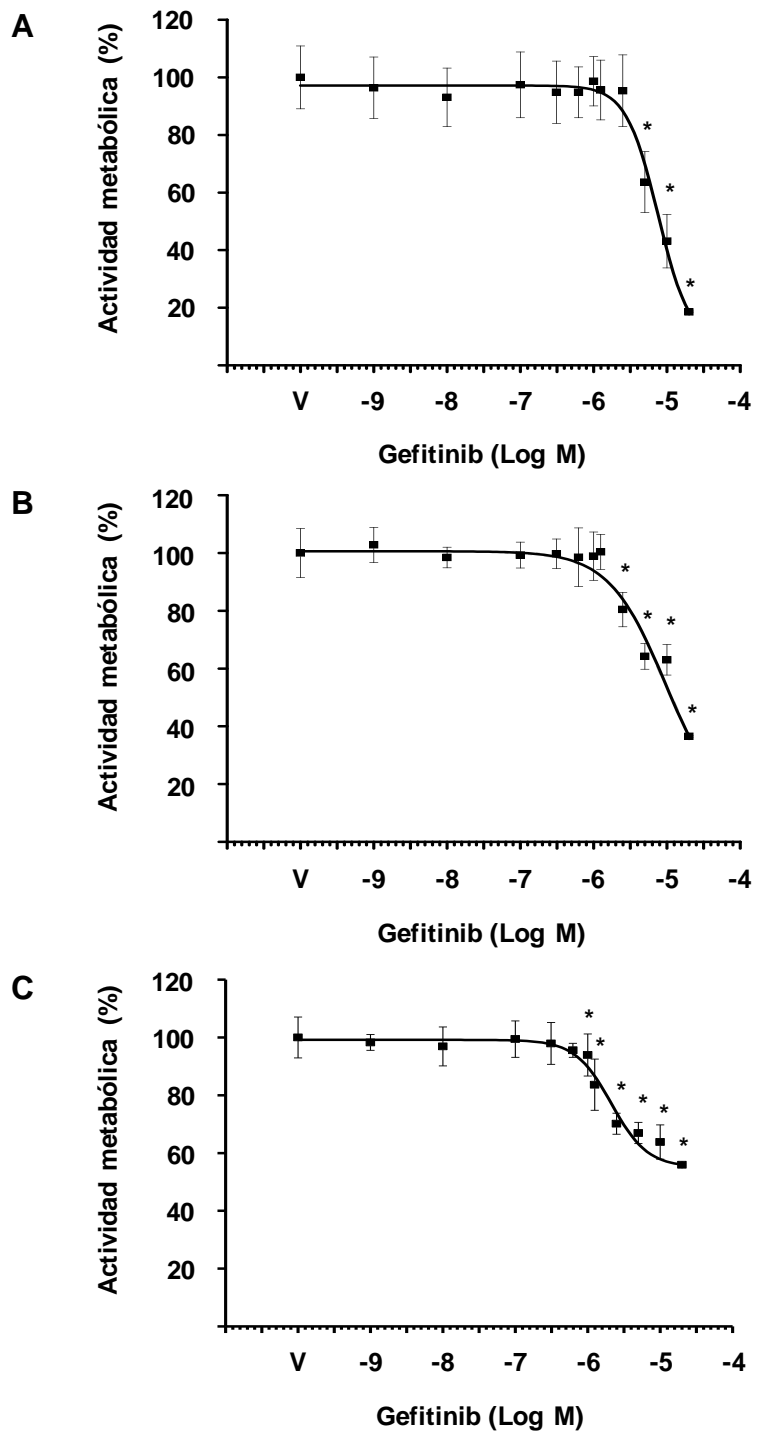


Figura 14. Efecto antiproliferativo del gefitinib en células derivadas de biopsias de carcinoma mamario humano (CAM). (A) CAM1, (B) CAM2 y (C) CAM3. Las células fueron incubada en presencia de diferentes concentraciones del gefitinib desde 1×10^{-9} a 1×10^{-4} y DMSO (V) durante 7 días, el crecimiento celular se determinó mediante el método colorimétrico XTT. El V fue considerado el 100% de la actividad metabólica. Los valores representan el promedio \pm SD de 2 experimentos independientes por sextuplicado. * $p < 0.005$ vs V.

2. Efecto de la combinación del gefitinib y el calcitriol

En la figura 15A se muestra el efecto de la combinación del gefitinib y el calcitriol sobre la proliferación celular en la línea SUM-229PE. De las concentraciones probadas del gefitinib, las cuales fueron desde 1×10^{-11} a 1×10^{-5} M, en combinación cada una de estas concentraciones con calcitriol 1×10^{-10} a 1×10^{-8} M, las combinaciones de 1×10^{-7} M del gefitinib (G) con las 3 dosis de calcitriol (C) fueron más efectivas para reducir de manera significativa el crecimiento celular que la incubación de las células por separado del inhibidor específico del EGFR y del secoesteroide. El calcitriol, el gefitinib, así como las combinaciones de ambos inhibieron significativamente la proliferación comparado con el V.

El incremento en la concentración (1×10^{-6} M) del inhibidor de la actividad tirosina cinasa del EGFR en coincubación con 1×10^{-10} M del calcitriol resultó en mayor disminución de la proliferación (82 %) (Figura 15B) en comparación con 1×10^{-7} M del gefitinib con 1×10^{-10} M de la hormona (57%) (Figura 15A). Al incrementar la concentración del gefitinib (1×10^{-5} M) en combinación con 1×10^{-10} M del calcitriol resultó en el 88 % de disminución de la proliferación celular (datos no mostrados).

De la misma forma se llevó a cabo el estudio de la combinación de los 2 antineoplásicos en las CAM, de las cuales solo se escogieron las CAM1 y 3 que fueron más sensibles al tratamiento con el gefitinib (Tabla 6). Las concentraciones más efectivas para reducir en mayor medida el crecimiento celular que la incubación por separado del gefitinib y el calcitriol fueron 5×10^{-6} M del gefitinib con 1×10^{-9} M del calcitriol para las CAM1 (Figura 16A). Y para las CAM3 fueron 1×10^{-5} M del inhibidor con 1×10^{-9} M de la hormona (Figura 16B). Tanto en las CAM1 y 3, el calcitriol, el gefitinib, así como las combinaciones de ambos inhibieron significativamente la proliferación comparado con el V.

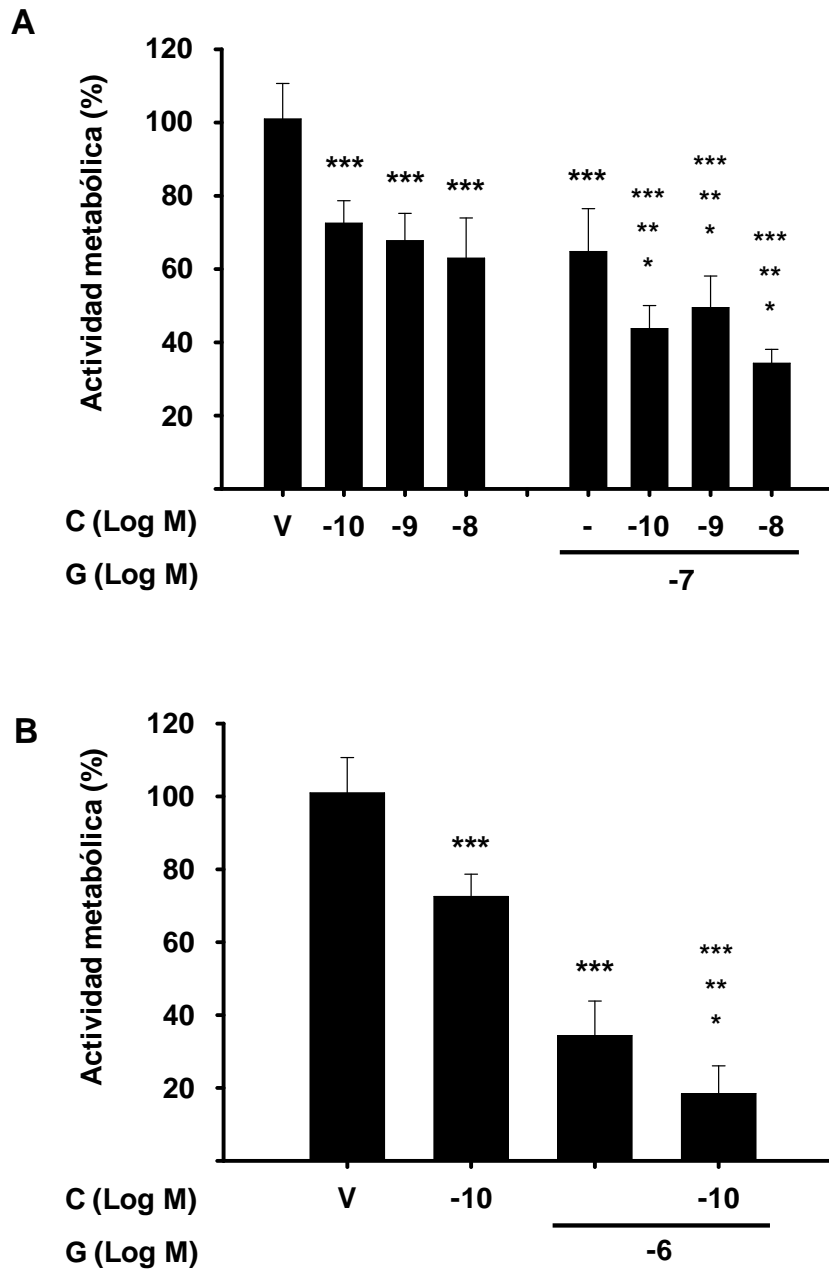


Figura 15. El tratamiento en combinación del calcitriol con el inhibidor específico del EGFR es más efectivo en reducir el crecimiento celular de las SUM-299PE que la incubación de los antineoplásicos por separado. (A) Las células fueron incubada en presencia de diferentes concentraciones del calcitriol (1×10^{-10} hasta 1×10^{-8} M), el gefitinib (1×10^{-7} M) y su combinación durante 7 días, el crecimiento celular se determinó mediante el método colorimétrico XTT. El vehículo (V) fue considerado el 100% de la actividad metabólica. Las barras representan el promedio \pm SD de 3 experimentos independientes por sextuplicado. * $p < 0.005$ vs G. ** $p < 0.005$ vs C *** $p < 0.005$ vs V. (B) Las células fueron incubada en presencia de 1×10^{-10} M del calcitriol, 1×10^{-6} M el gefitinib y su combinación. Las barras representan el promedio \pm SD de 2 experimentos independientes por sextuplicado. * $p < 0.05$ vs G. ** $p < 0.05$ vs C *** $p < 0.005$ vs V.

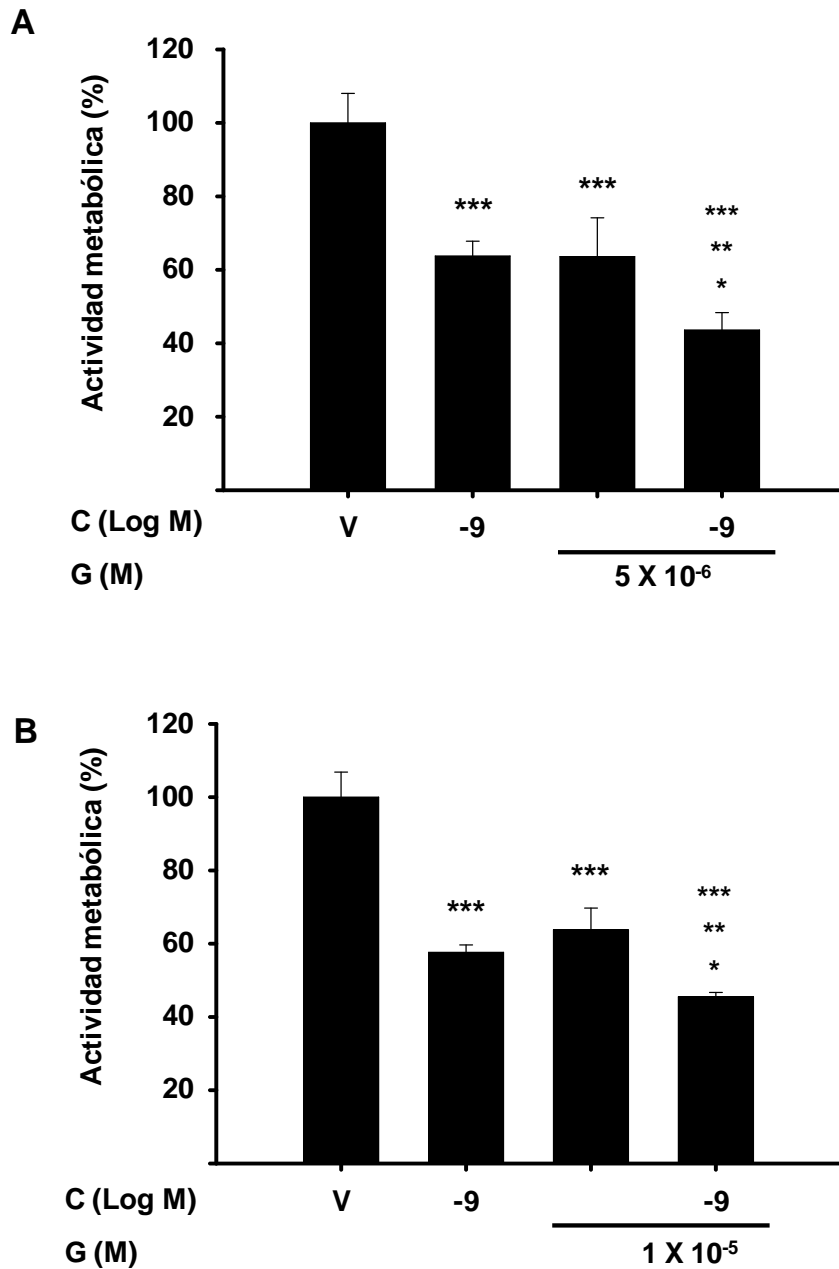


Figura 16. El tratamiento en combinación del calcitriol con el inhibidor específico del EGFR es más efectivo en reducir el crecimiento celular de las CAM que la incubación de los antineoplásicos por separado. (A) CAM 1. Las células fueron incubadas en presencia de 1×10^{-9} M del calcitriol, 5×10^{-6} M del gefitinib y su combinación durante 7 días, el crecimiento celular se determinó mediante el método colorimétrico XTT. El vehículo (V) fue considerado el 100% de la actividad metabólica. Las barras representan el promedio \pm SD de 1 experimento por sextuplicado. * $p < 0.05$ vs G. ** $p < 0.05$ vs C * $p < 0.005$ vs V. (B) CAM 3. Las células fueron incubadas en presencia de 1×10^{-5} M del gefitinib, 1×10^{-9} M el calcitriol y su combinación. Las barras representan el promedio \pm SD de 1 experimento por sextuplicado. * $p < 0.05$ vs G. ** $p < 0.05$ vs C *** $p < 0.005$ vs V.**

Con base a los resultados obtenidos de los estudios de las combinaciones de los dos antineoplásicos se calculó el índice de combinación (IC), con la fórmula de Chou Talalay.

Como se muestra en la tabla 7, la combinación del gefitinib y el calcitriol resultó en un efecto sinérgico en los tres tipos celulares.

Tabla 7. Índice de combinación (IC)

Tipo celular	Combinación		IC	Efecto
	Gefitinib (M)	Calcitriol (M)		
SUM229PE	1×10^{-7}	1×10^{-10}	0.68	Sinérgico
CAM 1	5×10^{-6}	1×10^{-9}	0.50	Sinérgico
CAM 3	1×10^{-6}	1×10^{-9}	0.68	Sinérgico

Tabla 7. El índice de combinación (IC) del gefitinib y el calcitriol en 3 tipos celulares diferentes fue calculado usando la ecuación de Chou Talalay donde si el valor obtenido de IC es mayor a 1 el efecto será antagónico, si es igual a 1 será aditivo y si es menor a 1 el efecto será sinérgico [40].

DISCUSIÓN

El gefitinib (ZD1839, Iressa) es una molécula que selectivamente inhibe la tirosina cinasa del EGFR. Es un potente inhibidor de la proliferación no solo de células que sobreexpresan el EGFR si no que también en aquellas que adicionalmente expresan el HER2, posiblemente mediante la reducción de la fosforilación del heterodímero EGFR/HER2 [23].

El 30 % de pacientes con tumores de mama sobreexpresan el HER2 (Tabla 1) [15] y dicha sobreexpresión se correlaciona también con mal pronóstico. En este trabajo se demostró que el gefitinib tiene efecto antiproliferativo en células de cáncer de mama que sobreexpresan el EGFR y con presencia del HER2 (Figura 11 y 13A, C). Los resultados obtenidos coinciden con hallazgos de otros grupos que demostraron que la presencia de ambos receptores se requiere para inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama [23, 24]. Cuatro tipos celulares de cáncer de mama se evaluaron en términos de su sensibilidad al gefitinib para inhibir la proliferación celular y se identificó que la línea celular SUM-229PE, obtenida de una efusión pleural, fue la más sensible a la molécula (Tabla 6), y de las 3 CAM derivadas de carcinoma ductal invasivo, la sensibilidad al gefitinib fue CAM3 > CAM1 > CAM2. Todos estos tipos celulares, excepto CAM2 expresaron HER2. Tal vez por esto se observó menor sensibilidad al compuesto para inhibir la proliferación. La línea celular SUM-229PE aparte de expresar HER2, sobreexpresa EGFR, lo que sugiere que es muy probable que el nivel de expresión del EGFR y HER2 se asocie directamente con la sensibilidad al gefitinib. Aunque, queda la pregunta de si la sobreexpresión de los receptores HER es realmente tan central en la determinación de la sensibilidad al gefitinib. Amann *et al* informaron que la línea celular H1819 de cáncer de pulmón, la cual muestra altos niveles de expresión de EGFR, HER2, y HER3, mostró sensibilidad intermedia a los inhibidores de la tirosina cinasa. Sugirieron que, además de mutaciones del gen EGFR, otros factores tales como altos niveles de expresión de los miembros de la familia HER, podrían sensibilizar a las células a los inhibidores de EGFR [41].

El valor de la CE_{50} en la línea celular SUM-229PE fue de 1×10^{-7} M, que es similar a un estudio reportado en cáncer de pulmón [41]. Los valores de la CE_{50} de las CAM oscilaban en el orden de 1×10^{-6} M presentando menor sensibilidad. Sin embargo, estos valores son menores a la máxima concentración alcanzada en sangre del gefitinib en pacientes (6.6×10^{-4} M).

Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la vitamina D (calcitriol) inhibe potencialmente la proliferación celular en una amplia gama de tipos celulares, incluyendo los carcinomas de mama [27]. Análisis en CAM y fibroadenomas demostraron que el calcitriol inhibe su crecimiento celular y que este efecto era mediado por el VDR [32]. En este trabajo se demostró que esta hormona inhibió de manera dependiente de la concentración la proliferación de las células SUM-299PE con una CE_{50} de 1×10^{-8} M.

En este estudio se probó el efecto en conjunto del gefitinib y el calcitriol. Con el enfoque que utilizamos, la inhibición de la actividad metabólica, cuando las células fueron coincubadas con ambos factores, fue más efectiva que el tratamiento de las células por separado del inhibidor específico del EGFR y del secoesteroide, con interacción farmacología de tipo sinérgica.

Estos resultados fueron observados tanto en la línea celular SUM-299PE como en las células derivadas de biopsias provenientes de pacientes con cáncer de mama, lo cual le da mayor relevancia clínica a este trabajo. De los 4 tipos celulares se analizaron los 3 más sensibles a gefitinib. En ellos, el tratamiento con gefitinib y calcitriol en combinación fue efectivo. Los efectos de dicha combinación fueron analizados utilizando el método de Chou Talalay, para obtener el IC. Los resultados confirman una interacción sinérgica entre gefitinib y calcitriol en los 3 tipos celulares (tabla 7), mostrando un efecto sinérgico a menores concentraciones la línea celular SUM-229PE. De manera interesante la combinación de ambos compuestos inhibió en mayor medida la proliferación celular que la incubación de cada compuesto por separado en las SUM-229PE. Sin embargo, aunque las CAM con diferentes fenotipos y con menor sensibilidad a gefitinib, también la combinación resultó en un incremento en la inhibición de la

proliferación celular comparado con la incubación por separado de los compuestos.

El mecanismo del gefitinib para inhibir la proliferación celular es mediante inhibir la actividad tirosina cinasa del EGFR y consecuentemente la fosforilación de diferentes proteínas relacionadas con la proliferación, angiogénesis y metástasis como la MAPK y la AKT/PI3K [26]. Por otra parte también, se ha demostrado que el tratamiento con calcitriol en células de cáncer reduce la expresión del EGFR [33] e inhibe la fosforilación de la vía de la MAPK. Posiblemente el efecto sinérgico observado en la reducción de la proliferación inducido por ambos compuestos se deba a la acción en conjunto de los factores sobre la vía MAPK. Considerando lo anterior estudios de la Inhibición de la fosforilación de la vía MAPK en células incubadas con ambos compuestos se deberían llevar a cabo. Además, el ensayo para evaluar proliferación celular cuantifica el número de células metabólicamente activas, pero también puede reflejar ambos proliferación y apoptosis, por tanto un efecto proapoptotico del gefitinib y el calcitriol, deberán ser tomados en consideración y merece futuras investigaciones.

El tratamiento combinado de calcitriol con el gefitinib, es más eficaz para inhibir la proliferación de células tumorales mamarias que la monoterapia, lo que sugiere que la terapia en combinación podría mejorar significativamente la respuesta terapéutica en pacientes con cáncer de mama con tumores EGFR y HER2 positivos

CONCLUSIÓN

- El gefitinib un inhibidor de la tirosina cinasa del EGFR en combinación con el calcitriol presentan efecto sinérgico para inhibir la proliferación *in vitro* de células tumorales de glándula mamaria humana.

REFERENCIAS

1. National Cancer Institute [cited; Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdg/treatment/breast/Patient>.
2. Kamangar, F., G.M. Dores, and W.F. Anderson, *Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world*. J Clin Oncol, 2006. **24**(14): p. 2137-50.
3. *GLOBOCAN 2008 Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008*. . [cited; Available from: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>.
4. Knaul FM, N.G., Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J., *Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante*. Salud Pública Mex, 2009. **51**: p. s335-s344.
5. Hadzisejdic, I., et al., *Nuclear EGFR in ductal invasive breast cancer: correlation with cyclin-D1 and prognosis*. Mod Pathol. **23**(3): p. 392-403.
6. Yarden, Y., *The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities*. Eur J Cancer, 2001. **37 Suppl 4**: p. S3-8.
7. Guy, P.M., et al., *Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(17): p. 8132-6.
8. Ahn, E.R. and C.L. Vogel, *Dual HER2-targeted approaches in HER2-positive breast cancer*. Breast Cancer Res Treat. **131**(2): p. 371-83.
9. Ciardiello, F. and G. Tortora, *EGFR antagonists in cancer treatment*. N Engl J Med, 2008. **358**(11): p. 1160-74.
10. Ullrich A, S.J., *Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity*. Cell, 1990. **61**: p. 203-12.
11. Matozaki, T.N., H. Takai, Y., *Small G-protein networks. Their crosstalk and signal cascades*. Cell Signal. 2000. **12**: p. 515-24.

12. Treisman, R., *Regulation of transcription by MAP kinase cascades*. *Curr Opin Cell Biol*. 1996. **8**: p. 205-15.
13. Hiles, I.D., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit*. *Cell*, 1992. **70**(3): p. 419-29.
14. Cataldo, V.D., et al., *Treatment of non-small-cell lung cancer with erlotinib or gefitinib*. *N Engl J Med*. **364** (**10**): p. 947-55.
15. Nuti, M., et al., *Immune effects of trastuzumab*. *J Cancer*. **2**: p. 317-23.
16. Ramírez, U., Martínez, SH., Lara M.F., Robles, V.C., *Cancer de mama, Manual de Oncología, procedimietnos de médico quirúrgicos*. ed. M. Hill-interamericana. 2010, México.
17. Sotiriou, C. and L. Pusztai, *Gene-expression signatures in breast cancer*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(8): p. 790-800.
18. Marchió, C., Reis-Filho, J., *Molecular diagnosis in breast cancer. Diagnostic Histopathology*. 2008. **14**(5): p. 202-2013.
19. Prat, A. and J. Baselga, *The role of hormonal therapy in the management of hormonal-receptor-positive breast cancer with co-expression of HER2*. *Nat Clin Pract Oncol*, 2008. **5**(9): p. 531-42.
20. Koebel, C.M., et al., *Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state*. *Nature*, 2007. **450**(7171): p. 903-7.
21. Cobleigh, M.A., et al., *Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease*. *J Clin Oncol*, 1999. **17**(9): p. 2639-48.
22. *Ficha técnica*. [cited; Available from: <http://ec.europa.eu/health/documents/communityregister/2009/2009062459389/anx59389es.PDF>.
23. Anido, J., et al., *ZD1839, a specific epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, induces the formation of inactive EGFR/HER2 and EGFR/HER3 heterodimers and prevents heregulin*

- signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells.* Clin Cancer Res, 2003. **9**(4): p. 1274-83.
24. Moulder, S.L., et al., *Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo.* Cancer Res, 2001. **61**(24): p. 8887-95.
 25. Moasser, M.M., et al., *The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ("Iressa") inhibits HER2-driven signaling and suppresses the growth of HER2-overexpressing tumor cells.* Cancer Res, 2001. **61**(19): p. 7184-8.
 26. Ono, M., et al., *Sensitivity to gefitinib (Iressa, ZD1839) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with dependence on the epidermal growth factor (EGF) receptor/extracellular signal-regulated kinase 1/2 and EGF receptor/Akt pathway for proliferation.* Mol Cancer Ther, 2004. **3**(4): p. 465-72.
 27. Knight, J.A., et al., *Vitamin D and reduced risk of breast cancer: a population-based case-control study.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(3): p. 422-9.
 28. Ali, M.M. and V. Vaidya, *Vitamin D and cancer.* J Cancer Res Ther, 2007. **3**(4): p. 225-30.
 29. Deeb, K.K., D.L. Trump, and C.S. Johnson, *Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics.* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(9): p. 684-700.
 30. Shin, J.S., et al., *Vitamin D effects on pregnancy and the placenta.* Placenta. **31**(12): p. 1027-34.
 31. Beer, T.M. and A. Myrthue, *Calcitriol in cancer treatment: from the lab to the clinic.* Mol Cancer Ther, 2004. **3**(3): p. 373-81.
 32. Garcia-Becerra, R., et al., *Calcitriol inhibits Ether-a go-go potassium channel expression and cell proliferation in human breast cancer cells.* Exp Cell Res. **316**(3): p. 433-42.

33. Tong, W.M., et al., *Mechanism of antimetogenic action of vitamin D in human colon carcinoma cells: relevance for suppression of epidermal growth factor-stimulated cell growth*. *Oncol Res*, 1999. **11**(2): p. 77-84.
34. Rossi, A.M., et al., *MAPK inhibition by 1alpha,25(OH)2-Vitamin D3 in breast cancer cells. Evidence on the participation of the VDR and Src*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004. **89-90**(1-5): p. 287-90.
35. M. Thill, H.F., K. Katharina, C. Dittmer, F. Dorothea, D. Klaus, F. Michael and S. Becker, *The Antiproliferative Effect of Calcitriol on Breast Cancer Cell Lines Depends on Vitamin D Receptor Status and the Expression of Prostaglandin Metabolizing Enzymes*. *Cancer Research*, 2009. **69**(24).
36. Fakhri, M.G., et al., *A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of intravenous calcitriol in combination with oral gefitinib in patients with advanced solid tumors*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(4): p. 1216-23.
37. Muindi, J.R., et al., *A phase I and pharmacokinetics study of intravenous calcitriol in combination with oral dexamethasone and gefitinib in patients with advanced solid tumors*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009. **65**(1): p. 33-40.
38. *INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS*. [cited; Available from: http://www.normon.es/media/manual_8/capitulo_31.pdf].
39. Linares, A.M., P.M., Jimenez, L. Chala, J.M., Alemán, H., Betancourt, B. Y., Rodríguez, J. M., Martín, L. M., *Interacciones Medicamentosas*. Vol. 21. 2002.
40. Chou, T.C., *Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies*. *Pharmacol Rev*, 2006. **58**(3): p. 621-81.
41. Amann, J., et al., *Aberrant epidermal growth factor receptor signaling and enhanced sensitivity to EGFR inhibitors in lung cancer*. *Cancer Res*, 2005. **65**(1): p. 226-35.

42. Janowsky, E.C., et al., *Association between low levels of 1,25-dihydroxyvitamin D and breast cancer risk*. Public Health Nutr, 1999. **2**(3): p. 283-91.
43. Mawer, E.B., et al., *Serum 1,25-dihydroxyvitamin D may be related inversely to disease activity in breast cancer patients with bone metastases*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(1): p. 118-22.
44. Colston, K.W., U. Berger, and R.C. Coombes, *Possible role for vitamin D in controlling breast cancer cell proliferation*. Lancet, 1989. **1**(8631): p. 188-91.