



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**EFFECTOS DEL CALCITRIOL Y SU ANÁLOGO EB-1089 EN LA REGULACIÓN
DE LA IL-1 β Y DEL TNF- α EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
ISELA MARTÍNEZ REZA

DIRECTORA DE TESIS
DRA. ROCÍO ÁNGELES GARCÍA BECERRA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
COMITÉ TUTOR
DR. DAVID BARRERA HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA
DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, CD.MX. OCTUBRE DE 2021



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.

AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de obtener el grado académico de Doctor en Ciencias.

Al posgrado Doctorado en Ciencias Biomédicas por otorgarme un lugar en el posgrado.

Al Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” por las facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM por permitirme concluir el presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada No. 350459.

Al CONACyT por el apoyo al proyecto No. 256994 para el desarrollo del presente trabajo.

Al Programa de Investigación de Cáncer de Mama, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el proyecto IN208520.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fernando Larrea, Jefe de Departamento de Biología de la Reproducción, por alentar la formación de profesionales.

A la Dra. Rocío García por la confianza, la extraordinaria asesoría, la paciencia, el apoyo e impulso brindados, así como su apoyo moral e intelectual.

Al comité tutorial Dr. David Barrera Hernández y Dra. Marcela Lizano Soberon por su valiosa colaboración, asesoría y su gran aportación para el fortalecimiento de este trabajo.

A los doctores: Lorenza Díaz, Mayel Chirinos, Euclides Avila, y Elena Zambrano por su continuo apoyo intelectual durante mi formación.

A la Dra. Nancy Noyola por ser mi colega, gran amiga y apoyo total.

A mis amigos: Adriana Zarate, David Ordaz, Germán Mora, Héctor Aguirre, Mariana Segovia, Mitzi Olivares y Sofía López por hacer tan bonita la estancia en los laboratorios, la paciencia, el apoyo moral, por su amistad y por colaborar generosamente con sus conocimientos.

A mis amigos y compañeros de vida: Reyna Romero, Fernando García, Heriberto Valdés, Jorge Jiménez, Iván Cruz y Daniel Ortega por su existencia y por acompañarme en este trayecto, por apoyarme en los momentos complicados, pero sobre todo por compartir su experiencia, extraordinarios momentos de trabajo, aprendizaje y alegría de vivir.

A mis compañeros y queridos amigos de otros laboratorios: Daniel Morales (UAEM), Giovanni Soca (HIMFG), Brenda Maldonado, Cynthia Aranda, Dan

Muñoz, Eduardo Toledano, Jorge Tenería, Nancy Mares, Nayelli Torres, Rocío Herrera, Dr. José Donis, Dra. Margarita Virgen (Hospital Español), Alondra Zaragoza, César Juárez, J. Sebastian Mendoza, Karen Amador, Lorena Gorgonio, L. Emmanuel Garcia y Miguel Puntos (HGT) por su amistad, por su apoyo, por compartir conocimientos, por ser excelentes compañeros de trabajo y por sus porras.

DEDICATORIAS

A mi papá Alberto Martínez que aun después de su muerte sigue siendo un ejemplo de fortaleza y perseverancia.

A mi mamá Carmen Reza por su esfuerzo, trabajo y por permitir los primeros pasos de esta meta.

A mi hermano Alberto Martínez por su cariño, por creer en mí, por estar en momentos difíciles y por su admirable crecimiento en la carrera de la vida.

A mi hermana y amiga Elda Martínez por su cariño, apoyo incondicional y por ser ejemplo de firmeza y fortaleza.

A mi sobrino Rodrigo por su cariño, su compañía y por ser un regalo maravilloso de la vida.

A Mónica Pacheco por ser excelente persona, familia y gran apoyo.

A mi amigo Fernando García Rodríguez por creer en mí.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIAS	5
INDICE	6
INDICE DE FIGURAS	9
ABREVIATURAS	10
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
ANTECEDENTES	14
Generalidades del cáncer de mama	14
Cáncer de mama RE positivo	14
Cáncer de mama HER-2 positivo	15
El cáncer de mama triple negativo (TNBC)	15
El ambiente inflamatorio del cáncer	18
La IL-1 β	18
El TNF- α	21
El calcitriol	24
El calcitriol en el cáncer de mama.....	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS.....	29
Objetivo general	29
Objetivos específicos	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
Reactivos	30
Material biológico	30
Cultivo celular	30

Western blot.....	31
Ensayo de proliferación	32
Extracción de RNA total	32
Síntesis de DNA complementario por transcriptasa reversa (RT)	33
Cuantificación de expresión de genes mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	33
Cuantificación de IL-1 β y TNF- α por el método ELISA.....	34
Análisis de expresión de RNA IL-1 β y TNF- α en pacientes	34
Análisis estadístico	34
RESULTADOS.....	35
Efecto del calcitriol en la expresión génica de <i>CYP24A1</i> en líneas celulares de cáncer de mama.....	35
La expresión del VDR y de los receptores de citocinas en líneas celulares de TNBC	36
Efectos del calcitriol, el EB-1089, la IL-1 β y el TNF- α en la proliferación celular	37
El calcitriol y el EB1089 indujeron la expresión génica de la IL-1 β y el TNF- α en células de TNBC	39
El calcitriol y el EB1089 indujeron la secreción de la IL-1 β y el TNF- α en células TNBC	41
Los efectos antiproliferativos del calcitriol se revirtieron bloqueando el IL-1R1 y el TNFR1	42
La combinación de calcitriol con TNF- α disminuyó la proliferación celular en mayor medida que con cada compuesto solo en células de cáncer de mama .	44
La alta expresión del RNAm de IL- β y TNF- α se asocia con mayor sobrevida de pacientes con cáncer de mama	46
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIÓN	52

BIBLIOGRAFÍA	53
ANEXO 1	59
Los efectos antiproliferativos del calcitriol mediante IL-1β y TNF-α no se llevan a cabo a través de los IL-1R2 ni TNFR2, respectivamente.....	59
Efecto de la combinación de diferentes concentraciones calcitriol con TNF-α en células de cáncer de mama	60
La combinación de calcitriol con IL-1β disminuyó la proliferación en la línea celular MCF7.	61
ANEXO 2	62
Contribución científica generada durante la realización del Doctorado en Ciencias Biomédicas.	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía de señalización de la IL-1 β . La señalización de la.....	21
Figura 2. Vía de señalización del TNF- α . La señalización del TNF- α se lleva a cabo tras la activación de sus receptores TNFR1 y TNFR2.....	23
Figura 3. Esquema de la síntesis de la vitamina D3, sus metabolitos y su catabolismo.....	25
Figura 4. Mecanismo de acción del calcitriol a través del VDR.....	26
Figura 5. Efecto del calcitriol en la expresión del RNAm de CYP24A1 en las líneas celulares de TNBC SUM-229PE, HCC1806 y MCF7.	35
Figura 6. Expresión de los receptores de VD, IL-1 β y TNF- α en líneas celulares establecidas de TNBC.	36
Figura 7. Efecto del calcitriol, EB1089, IL-1 β y TNF- α en la proliferación celular.	38
Figura 8. Efectos del calcitriol y su análogo en la expresión del gen de IL-1 β y TNF- α en células de TNBC.	40
Figura 9. El calcitriol inhibe la proliferación celular por inducir la producción endógena de IL-1 β (A) y TNF- α (B).	43
Figura 10. Efecto de la combinación de calcitriol y TNF- α en la proliferación de células de cáncer de mama.	45
Figura 11. Tasa de supervivencia en pacientes con cáncer de mama con base en la expresión del RNAm de IL- β y TNF- α	47
Figura 12. Los anticuerpos anti IL-1R2 y TNFR2 no modificaron la proliferación celular solos ni en combinación con calcitriol.....	59
Figura 13 Efecto de la combinación de diferentes concentraciones de calcitriol con TNF- α en la proliferación de células de cáncer de mama.	60
Figura 14. Efecto de la combinación de calcitriol con IL-1 β en la proliferación de células de cáncer de mama.	61

ABREVIATURAS

Ac anti-VDR	Anticuerpo anti VDR
BL1	Subtipo basal like 1
BL2	Subtipo basal like 2
Calcitriol	1 α ,25-dihidroxitamina D ₃
<i>CYP24A1</i>	Gen codificante para la enzima 24 hidroxilasa
DBP	Proteína de unión a vitamina D
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
DD	Dominio de muerte
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FBS	Suero fetal bovino
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano 2
HRP	Peroxidasa de rábano picante
ICE	Enzima convertidora de IL-1 β
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-1R1	Receptor 1 de IL-1 β
IL-1RAcP	Proteína accesoria del receptor de IL-1 β
Ka	Constante de afinidad
Kd	Constante de disociación
JNKs	Cinasas c-Jun N-terminal
IM	Inmunomodulador
LAR	Receptor de andrógenos luminal
M	Mesenquimatoso
mM	Milimolar
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MET	Transición epitelio mesénquima

MSL	Troncal mesenquimatoso
MyD88	Diferenciación mielóide 88
mTNFR	Receptor membranal de TNF- α
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NF- κ B	Factor de transcripción nuclear κ B
nm	Nanómetros
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PLAD	Dominio de ensamblaje pre-ligando
RP	Receptor de progesterona
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RAR	Receptor de ácido retinoico
RE	Receptor de estrógenos
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RXR	Receptor retinoico X
TACE	Enzima convertidora de TNF- α
TIR	Dominio del receptor de Toll / interleucina-1
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
TNFR1	Receptor de TNF- α tipo 1
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
TR	Receptor de hormona tiroidea
sTNFR	Receptor soluble de TNF- α
VDR	Receptor nuclear de la vitamina D
VDRE	Elementos de respuesta a vitamina D

RESUMEN

El cáncer de mama triple negativo (TNBC, por sus siglas en inglés) es uno de los tumores malignos más agresivos, con mal pronóstico y alta capacidad metastásica. El comportamiento agresivo puede implicar procesos inflamatorios caracterizados por la desregulación de moléculas relacionadas con la respuesta inmunológica en las que intervienen la interleucina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). Se sabe que el calcitriol, el metabolito activo de la vitamina D, modula la síntesis de mediadores inmunológicos, sin embargo, su papel en la regulación de IL-1 β y TNF- α en el TNBC se ha estudiado poco. En el presente trabajo, mostramos que las líneas celulares de TNBC SUM-229PE y HCC1806 expresaron receptores de vitamina D, IL-1 β y TNF- α . Además, el calcitriol, su análogo EB1089, IL-1 β y TNF- α inhibieron su proliferación celular. También mostramos que la síntesis de IL-1 β y TNF- α fue estimulada por calcitriol y su análogo. De manera interesante, la actividad antiproliferativa del calcitriol se inhibió significativamente cuando las células se trataron con anticuerpos anti-IL-1 β receptor 1 (IL-1R1) y anti-receptor de TNF- α tipo 1 (TNFR1). Por otro lado, la combinación de calcitriol con TNF- α dio como resultado mayor efecto antiproliferativo que cada compuesto solo en las dos líneas celulares de TNBC y en una línea celular receptor de estrógenos positivo. En conjunto, estos resultados indicaron que el calcitriol ejerce sus efectos antiproliferativos en parte al inducir la síntesis de IL-1 β y TNF- α a través del IL-1R1 y el TNFR1, respectivamente, destacando las funciones inmunomoduladoras y antiproliferativas del calcitriol en tumores de TNBC.

ABSTRACT

Triple negative breast cancer (TNBC) is one of the most aggressive tumors, with poor prognosis and high metastatic capacity. The aggressive behavior may involve inflammatory processes characterized by deregulation of molecules related to the immunological responses in which interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) are involved. It is known that calcitriol, the active vitamin D metabolite, modulates the synthesis of immunological mediators, however, its role in the regulation of IL-1 β and TNF- α in TNBC has been scarcely studied. In the present study, we showed that TNBC cell lines SUM-229PE and HCC1806 expressed vitamin D, IL-1 β and TNF- α receptors. Moreover, calcitriol, its analogue EB1089, IL-1 β , and TNF- α inhibited cell proliferation. In addition, we showed that the synthesis of both IL-1 β and TNF- α was stimulated by calcitriol and its analogue. Interestingly, the antiproliferative activity of calcitriol was significantly abrogated when the cells were treated with anti-IL-1 β receptor 1 (IL-1R1) and anti-TNF- α receptor type 1 (TNFR1) antibodies. Furthermore, the combination of calcitriol with TNF- α resulted in a greater antiproliferative effect than each agent alone, in the two TNBC cell lines and an estrogen receptor positive cell line. In summary, this study demonstrated that calcitriol exerted its antiproliferative effects by inducing the synthesis of IL-1 β and TNF- α through IL-1R1 and TNFR1, respectively, in TNBC cells, highlighting immunomodulatory and antiproliferative functions of calcitriol in TNBC tumors.

ANTECEDENTES

Generalidades del cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea compuesta por diferentes subtipos biológicos, además de diversos comportamientos clínicos. En México y a nivel mundial es la neoplasia maligna diagnosticada con mayor frecuencia en mujeres, por lo que representa un problema de salud. La capacidad para identificar y diagnosticar el cáncer de mama ha mejorado gracias a marcadores estandarizados que han sido determinantes para el tratamiento adecuado, dando como resultado un buen pronóstico para los pacientes. Existen múltiples clasificaciones de este carcinoma, sin embargo, con base en el perfil de expresión molecular es posible categorizar al cáncer de mama principalmente en tres tipos: positivo para receptor de estrógenos (RE), que frecuentemente también es positivo receptor de progesterona (RP); positivo para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) y el triple negativo [1].

Cáncer de mama RE positivo

La mayoría de los cánceres de mama muestran una sobreexpresión de los RE y RP, además es el subtipo con mejor pronóstico considerando que los pacientes tienden a responder a la terapia hormonal. En este sentido, el desarrollo de fármacos dirigidos a estos receptores hormonales, como el tamoxifeno, ha logrado una mejora significativa en la supervivencia de las mujeres con cánceres de mama con receptores hormonales positivos. La evaluación semicuantitativa de RE y RP es importante para el pronóstico y el manejo [2]. Dentro de este tipo de carcinoma mamario se encuentran el subtipo luminal A, que se caracteriza por la presencia de los receptores hormonales de estrógenos y progesterona, y bajo nivel de Ki67, un biomarcador asociado a proliferación celular; y el subtipo luminal B, con positividad para el RE y puede o no estar presente el RP, así como alto nivel de Ki67. Ambos subtipos representan del 30-40% y del 20-30% de todos los cánceres de mama, respectivamente [3].

Cáncer de mama HER-2 positivo

Este carcinoma tiene sobreexpresado el HER2. Se observa en aproximadamente el 15% de pacientes y se asocia con peor resultado clínico o peor pronóstico con respecto al cáncer RE positivo. En el cáncer de mama HER2 positivo temprano, el tratamiento neoadyuvante con una combinación de quimioterapia secuencial y terapia dirigida a HER2 es actualmente el estándar de atención; le sigue la cirugía de mama, la radioterapia y finalmente 12 meses de terapia dirigida para HER2. La tasa de supervivencia a 10 años alcanza más del 75%. El estándar de atención en el entorno neoadyuvante de acuerdo con las directrices nacionales e internacionales combina una quimioterapia que contiene taxanos con un bloqueo dual de anticuerpos monoclonales como trastuzumab y pertuzumab, además se han introducido programas de quimioterapia y nuevos agentes dirigidos a HER2, como lapatinib, neratinib y T-DM1 [4].

El cáncer de mama triple negativo (TNBC)

El subtipo TNBC se caracteriza por la falta de expresión del RP, RE y el HER2 [5]. Muestra comportamiento biológico agresivo, generalmente representa entre el 15% y el 20% de todos los tipos de cáncer de mama humano recién diagnosticados, tiene alta capacidad metastásica, pronóstico precario y se ha diagnosticado con mayor frecuencia en pacientes de entre 35 y 45 años de edad [6-8]. En los últimos años, se han descrito varios subtipos del TNBC dependiendo de diferentes características analizadas (Tabla 1). La clasificación basada en las características histopatológicas no es utilizada en la práctica debido a que en las guías de tratamiento hay muy pocas recomendaciones. Existe la clasificación en cuanto a los estudios moleculares o también conocidos como de perfiles genómicos del TNBC humano que han identificado numerosas alteraciones recurrentes en genes impulsores del cáncer y vías de señalización que permiten comprender mejor la biología del tumor. Por otro lado, la clasificación basada en el microambiente tumoral ha servido como un indicador de pronóstico y eficiencia de la inmunoterapia, así como de la respuesta coadyuvante de la quimioterapia.

Actualmente la clasificación que describe con más detalle al TNBC con 6 subtipos es la clasificación molecular basada en el transcriptoma y que a partir de la expresión única de componentes celulares y la presencia de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumor [9-11] permite comprender la heterogeneidad del tumor, [12] los diferentes comportamientos entre ellos, incluida la respuesta al tratamiento [11]. El subtipo basal like 1 (BL1) se caracteriza por la desregulación del ciclo celular y la alta expresión de genes de respuesta al daño en el DNA. El subtipo basal like 2 (BL2) implica la señalización de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento nervioso (NGF), la transición epitelio- mesénquima (MET), Wnt/ β -catenina e IGF1R, así como glucólisis y gluconeogénesis. El subtipo inmunomodulador (IM) se caracteriza por la alta expresión de genes que codifican para los antígenos inmunológicos, las vías de transducción de la señal inmunológica y las citocinas que probablemente representan la expresión génica tanto de las células tumorales como de los linfocitos infiltrantes. Los subtipos mesenquimatoso (M) y mesenquimatoso asociado a células troncales (MSL) comparten la expresión incrementada de genes implicados en las vías de transición epitelio-mesenquima y de factores de crecimiento, pero solo el subtipo MSL tiene disminuida la expresión de genes implicados en la proliferación. El subtipo luminal receptor de andrógenos (LAR) se caracteriza por la expresión del gen luminal y es impulsado por el receptor de andrógenos (AR), en la tabla 1 se muestran las diferentes subclasificaciones del TNBC hechas hasta la fecha [13]. Debido a la falta de blancos terapéuticos y la complejidad de este subtipo de cáncer, la base para el tratamiento de pacientes con TNBC son la radioterapia, la mastectomía inespecífica y la quimioterapia que incluye antraciclinas, taxanos, platinos, vinorelbina, capecitabina y gemcitabina [14]. En el 2020 se aprobó el uso del anticuerpo monoclonal pembrolizumab en combinación con quimioterapia para el tratamiento de pacientes con TNBC localmente recurrente, irreseccable o metastásico de tumores que expresan el ligando 1 de la proteína de muerte celular programada (PD L1) [15].

Tabla 1. Clasificaciones del cáncer de mama triple negativo. *Peor pronóstico. ** Mejor pronóstico.

Histológica		- Carcinoma metaplásico*
		- Carcinoma medular **
		- Carcinoma lobular invasivo *
		- Carcinoma apocrino**
		- Carcinoma adenoide quístico **
Molecular (perfiles genómicos)	Alteraciones genómicas somáticas	- TP53
		- PIK3CA
		- PTEN
		- KMT2C
		- RB1
	Vías de señalización molecular	- PDGF/VEGF
		- PI3K/AKT/mTOR
		- JAK/STAT
	Basada en el transcriptoma	- Basal like 1 (BL1)
		- Basal like 2 (BL2) *
- Inmunomodulador (IM)		
- Mesenquimatoso (M)		
- Troncal Mesenquimatoso (MSL)		
Basada en RNAm	- Luminal receptor de andrógenos (LAR)	
	- Inmunomodulador (IM)	
Microambiente tumoral	Niveles de linfocitos infiltrantes (TIL)	- TIL bajo
		- TIL alto **
	Mieloides infiltrantes de tumores	- Enriquecido en neutrófilos
		- Enriquecido en macrófagos *
	Células microambiente del	- I-Imunodesierto Baja infiltración de células del microambiente
		- II-Inmuno innato inactivo Células de la respuesta innata en reposo e infiltración de células del estroma no inmunológicas
		- III-Inmunoinflamado Abundante infiltración de células de la respuesta inmunológica
		- Linfocitos T
	Ejes estromales	- Células B
		- Marcadores epiteliales
- Desmoplasia		

El ambiente inflamatorio del cáncer

El cáncer de mama frecuentemente se acompaña de un ambiente inflamatorio caracterizado por la infiltración de células del sistema inmunológico como parte de la respuesta inmunitaria, además de la expresión y secreción de moduladores como citocinas proinflamatorias y quimiocinas [10, 16, 17]. El comportamiento agresivo y el mal pronóstico del TNBC se pueden asociar a la desregulación de dichas células y moléculas [18] que a menudo fomentan la malignidad del tumor [19]. Por otro lado, la activación del sistema inmunológico puede inducir la respuesta antitumoral y potenciar el efecto del tratamiento [17]. En el TNBC, la presencia de linfocitos infiltrantes es un marcador de la activación de la respuesta inmunológica y se asocia con mejor respuesta a la terapia [20]. En este sentido, las citocinas proinflamatorias interleucina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) tienen un papel importante en la interacción entre las células de cáncer de mama y su microambiente [21].

La IL-1 β

IL-1 β , también llamada factor activador de linfocitos, pirógeno endógeno, mediador leucocitario endógeno o IL-1F2 [22], es una citocina pleiotrópica e inmunorreguladora involucrada en diversas respuestas inmunológicas, procesos inflamatorios y en la hematopoyesis. Dicha citocina es secretada principalmente por monocitos activados, sin embargo, también es producida por células hematopoyéticas, macrófagos, linfocitos, células dendríticas de la piel, astrocitos, queratinocitos en microglía del cerebro y algunas células cancerosas [23].

La IL-1 β forma parte de la familia de las IL-1 integrada por 11 miembros, que incluye siete con actividad agonista (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ), tres antagonistas del receptor (IL-1Ra, IL-36Ra, IL-38) y una citocina

antiinflamatoria (IL-37) [24]. Sin embargo, sólo tres genes de dicha familia han sido ampliamente estudiados y codifican para IL-1 α , IL-1 β y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra). El gen que codifica para la IL-1 β se encuentra en el cromosoma 2q14.1, se traduce en un precursor de 31 kDa y posteriormente es procesado por una proteasa o enzima convertidora de IL-1 β (ICE), también llamada caspasa-1, que corta el precursor inactivo para generar la forma madura de la IL-1 β de 17 kDa. La IL-1 β ejerce funciones importantes en la homeostasis del cuerpo y entre las funciones pleiotrópicas está su participación en la proliferación de timocitos, crecimiento y diferenciación de linfocitos B, la producción de IL-2 e IL-6, respuestas a estrés, reacciones inflamatorias, regulación del sueño, del apetito y en efectos inflamatorios, además de influir en la patogénesis de algunas enfermedades como la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down y enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide [25, 26].

Una vez sintetizada la IL-1 β , se almacena y tiene una vida media intracelular de 2.5 horas [27]. Ejerce sus efectos biológicos al unirse a dos receptores de membrana diferentes: el receptor 1 de IL-1 β (IL-1R1) implicado en la señalización y el receptor 2 de IL-1 β (IL-1R2) que carece del dominio intracelular y por esta razón se considera como dominante negativo [26, 28]. Ambos receptores forman parte de la familia de receptores IL-1R que está integrada por 10 miembros: IL-1R1, IL-1R2, la proteína accesoria del receptor o IL-1R3 (IL-1RAcP), IL-1R4 (ST2), IL-1R5 (IL-18R α), IL-1R6 (IL-1Rrp2, IL-36R), IL-1R7 (IL-18R β), IL-1R8 (TIR8, también conocido como SIGIRR), IL-1R9 (TIGIRR-2), IL-1R10 (TIGIRR-1) [23].

La IL-1 β activa al IL-1R1 o al IL-1R2, pero no se produce la unión simultánea a ambos receptores (ver Figura 1). El gen que codifica para el IL-1R1 se encuentra en el cromosoma 2q12 y se traduce en una proteína transmembranal de 80 KDa. La IL-1 β se une con alta afinidad al IL-1R1 mostrando una constante de afinidad (K_a) de 1X10⁻⁹ M [29]. En humanos, la región extracelular del IL-1R1 contiene 7

sitios de N-glicosilación en residuos de aspartato necesarios para la unión del receptor a su ligando y una región intracelular denominada dominio del receptor de Toll / interleucina-1 (TIR), que se conserva estructuralmente y es compartido por otros miembros de esta familia de receptores [30]. El inicio de la señalización se lleva a cabo tras la formación del complejo IL-1 β , IL-1R1 e IL-1RAcP [31], que es internalizado al núcleo probablemente por endocitosis mediada por el receptor, la vía de señalización conduce a la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B, proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), p38 y las cinasas c-Jun N-terminal (JNKs). El IL-1R1 se expresa en diferentes estirpes celulares como linfocitos T, fibroblastos, células endoteliales, y en algunas células de cáncer de mama [26, 32].

El IL-1R2 es una proteína de 46 kDa codificada por el gen localizado en el cromosoma 2q12 y está presente como forma soluble o transmembranal. Se expresa de forma predominante en linfocitos T y B, monocitos y células de médula ósea. La IL-1 β se une con alta afinidad al IL-1R2 con una K_a de 6×10^{-8} M [29]; algunos estudios sugieren que el IL-1R2 secuestra a la IL-1 β derivando en respuestas antiinflamatorias o inmunosupresoras. El IL-1R2 puede participar en la patología de ciertas enfermedades y se ha descrito la presencia de dicho receptor en exudados inflamatorios sinoviales y está sobre expresado en el suero de pacientes con sepsis. En infecciones por poxivirus, como es el caso del virus de la viruela, la expresión del IL-1R2 afecta el curso natural de la infección e interfiere con la respuesta inmunológica del huésped [33].

La asociación de la IL-1 β en el curso del desarrollo de tumores es controversial [34] y en cáncer de mama se le han atribuido funciones implicadas en la inducción de migración e invasión. Además, en carcinomas mamarios invasivos se han detectado altos niveles séricos de esta citocina, pero, por otro lado, también se le ha asociado con la inhibición de la proliferación celular y ha demostrado tener buenos efectos como adyuvante en vacunas de células tumorales [26, 28, 35-37].

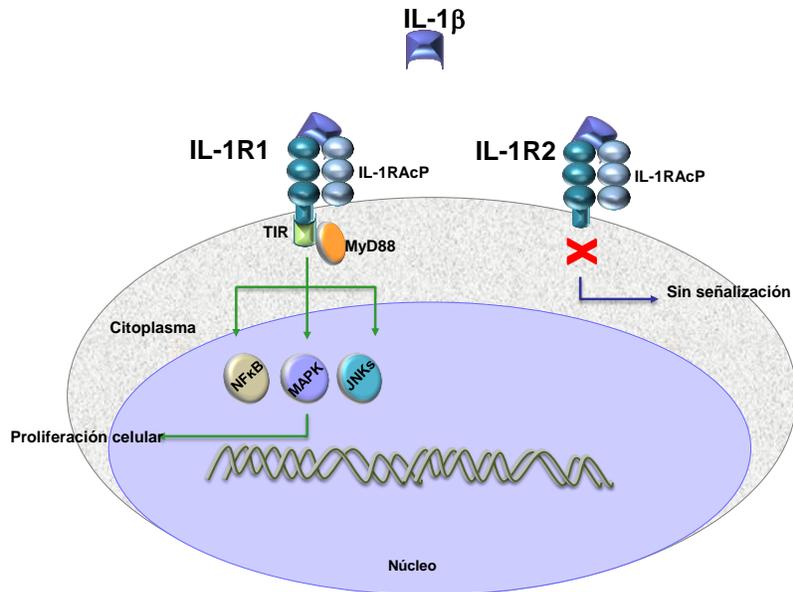


Figura 1. Vía de señalización de la IL-1 β . La señalización de la IL-1 β se lleva a cabo a través de su receptor de membrana IL-1R1 y su interacción con el IL-1R2 no desencadena ninguna vía de señalización. Dominio del receptor de Toll / interleucina-1 (TIR), factor de transcripción nuclear NF- κ B, proteína accesoria del receptor (IL-1RAcP), proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), cinasas c-Jun N-terminal (JNKs).

El TNF- α

El TNF- α es la principal citocina proinflamatoria y pertenece a la súper familia TNF que consta de 19 proteínas, fue identificado originalmente como un mediador de necrosis tumoral en el suero de ratones tratados con lipopolisacáridos [38]. Esta citocina activa varias funciones biológicas tales como proporcionar señales para la activación, diferenciación, supervivencia y muerte celular, también modula la respuesta inmunitaria y la inflamación en múltiples tejidos y órganos. El TNF- α es producido por células del sistema inmunológico como: monocitos, células asesinas naturales, células de Kupffer, linfocitos T, linfocitos B, eosinófilos, basófilos, células gliales y en células no inmunológicas como astrocitos, células de la granulosa, osteoblastos, miocitos cardiacos, fibroblastos, queratinocitos, neuronas, células epiteliales del pigmento retinal, células del músculo esquelético, células espermatozoides [38] y células

tumorales, y su vida media es de 17 minutos [39]. El gen del TNF- α se encuentra en el cromosoma 6p21.3 y codifica para una molécula precursora de membrana de 26 kDa (mTNF). Esta molécula es procesada por una metaloproteasa llamada enzima convertidora de TNF- α (TACE) que actúa sobre los aminoácidos Ala-66 y Val-67 del mTNF, y conduce a la formación de una proteína soluble (sTNF) de 17 kDa. Ambas formas de TNF- α son biológicamente activas.

Los efectos de TNF- α están mediados a través de dos receptores diferentes. El gen que codifica para el receptor tipo 1 (TNFR1) se encuentra en el cromosoma 12p13, y da origen a una proteína de 60 KDa. TNFR1 es también conocido como p55, p60, CD120a o TNFRSF1A. El receptor tipo 2 (TNFR2) está codificado por el gen ubicado en cromosoma 1p36.2 y su RNAm se traduce en una proteína de 80 KDa, también conocida como p75, p80, CD120b o TNFRSF1B. Ambos receptores son glucoproteínas transmembranales y pertenecen a la superfamilia de receptores TNF con 29 miembros encontrados en humanos. Los dos receptores de TNF- α tienen dominios extracelulares similares que consisten en múltiples repeticiones ricas en cisteína de aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, pero diferentes dominios intracelulares. El TNFR1 se expresa prácticamente en todos los tipos de células, excepto los eritrocitos, mientras que TNFR2 se encuentra principalmente en las células de la respuesta inmunológica, pero también es abundante en las células endoteliales y las células de linaje hematopoyético. El TNF- α se une a ambos receptores con alta afinidad, mostrando una constante de disociación (Kd) de $2-5 \times 10^{-10}$ y $3-7 \times 10^{-10}$ M para TNFR1 y TNFR2, respectivamente. Existen dos receptores solubles (sTNFR), generados por la proteólisis de los receptores unidos a la membrana. Los TNFR solubles son estructuralmente idénticos al dominio de unión extracelular de los TNFR1 y TNFR2. El TNFR1 se activa a través de TNF- α soluble y de membrana, mientras que TNFR2 se activa principalmente por el mTNF- α . La mayoría de los efectos biológicos del TNF- α , como la citotoxicidad y la proliferación, se producen mediante la activación del TNFR1. En contraste con TNFR2, la región intracelular de TNFR1 contiene un dominio de muerte (DD) que se ha asociado con

citotoxicidad mediada por TNF- α . Tanto el TNFR1 como el TNFR2 forman trímeros requeridos para la unión del TNF- α como se muestra en la figura 2. Probablemente los trímeros se expresan transitoriamente en la superficie celular además se someten a cambios conformacionales que requiere el dominio de ensamblaje pre-ligando (PLAD) que se encuentra dentro del dominio N-terminal rico en cisteínas [40]. Dependiendo del contexto celular, las condiciones y el microambiente [41-43], las vías de señalización implicadas tras la activación de ambos receptores son complejas e involucran numerosas moléculas tal como lo describen diferentes grupos de investigación [40, 44, 45]. Funciones controversiales han sido atribuidas al TNF- α en el cáncer de mama, entre las que se incluyen la activación de la apoptosis, la inhibición del crecimiento tumoral o bien, la promoción de la invasión tumoral, la propagación y el comportamiento agresivo [42]. Diferentes factores influyen en los efectos del TNF- α frente a tumores, por ejemplo, el estadio de la enfermedad, el fenotipo del cáncer, así como la funcionalidad de los receptores, la presencia de polimorfismos y el ambiente tumoral entre otros [46].

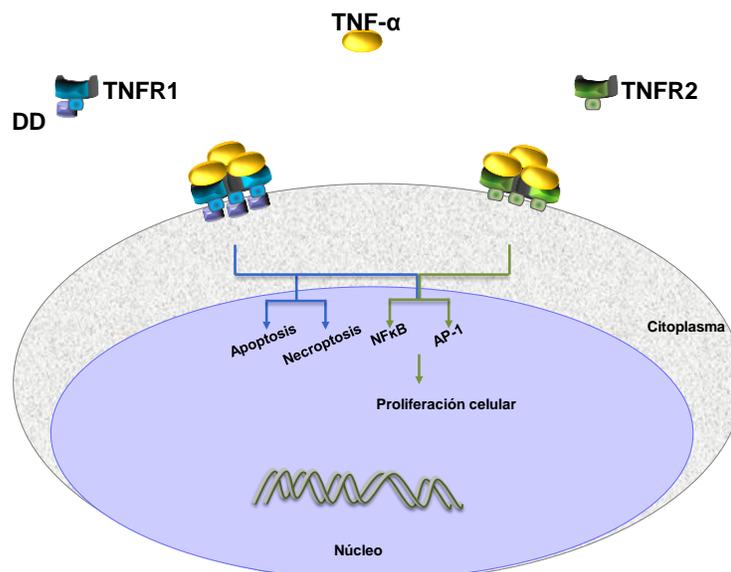


Figura 2. Vía de señalización del TNF- α . La señalización del TNF- α se lleva a cabo tras la activación de sus receptores TNFR1 y TNFR2. Estos receptores forman trímeros para poder llevar a cabo sus efectos. Dominio de muerte (DD), proteína activadora 1 (AP-1).

El calcitriol

El calcitriol es un secoesteroide y es el metabolito más activo de la vitamina D₃. Su biosíntesis se lleva a cabo principalmente en el riñón, pero no de forma exclusiva. La exposición de la piel a los rayos UV de la luz solar cataliza el primer paso de la síntesis de la vitamina D₃. Los fotones de la luz UV rompen el enlace 9-10 del 7-dehidrocolesterol generando la pre-vitamina D₃ seguido por una isomerización espontánea para formar vitamina D₃ y es transportada al hígado por la proteína de unión a vitamina D (DBP) en donde es convertida a 25-hidroxivitamnina D₃ o calcidiol, el principal metabolito de la vitamina D₃ en circulación. El paso final de activación es la 1 α -hidroxilación formando la 1 α -25 dihidroxivitamina D₃ o calcitriol. Cuando la concentración sérica de calcitriol se

encuentra elevada, dicha molécula es catalizada y forma productos de excreción como el ácido calcitroico (ver figura 3) [47, 48].

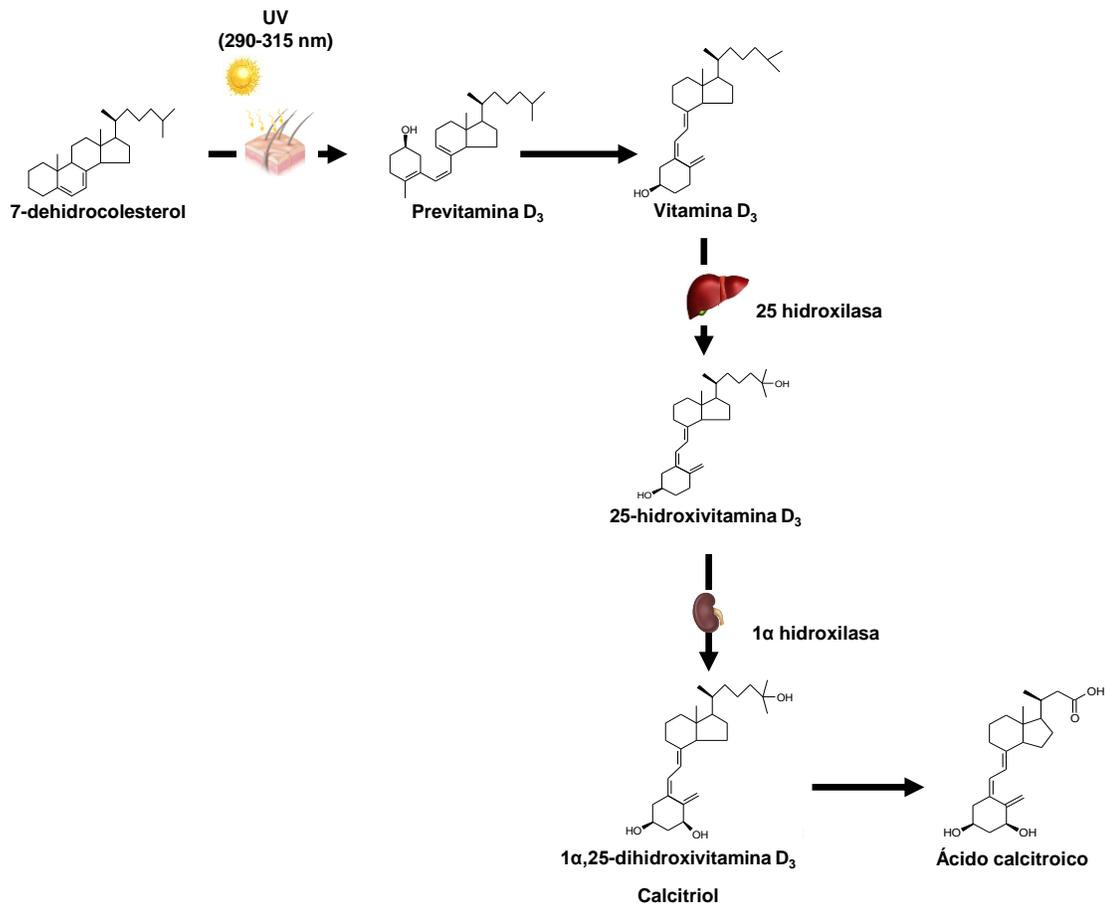


Figura 3. Esquema de la síntesis de la vitamina D3, sus metabolitos y su catabolismo.

El calcitriol tiene una vida media de 2.2 horas y ejerce múltiples funciones tejido específicas por vía genómica a través de su interacción estereoespecífica con el receptor nuclear de vitamina D (VDR). El VDR es una proteína de 50 KDa que se une con alta afinidad a su ligando ($K_d = 0.5 \text{ M}$). Se estima que el calcitriol puede regular la expresión de aproximadamente 500 genes a través del mecanismo mediado por VDR [49], como el gen del citocromo *P45024A1* o *CYP24A1* que codifica para la enzima encargada del catabolismo del calcitriol, dicha enzima es altamente sensible al calcitriol debido a que en su promotor contiene 2 elementos de respuesta para el VDR en tejidos como placenta y monocitos [50-52]. El VDR tras su interacción con el calcitriol forma

homodímeros o heterodímeros con otros receptores nucleares, preferentemente con el receptor retinoico X (RXR), pero también con el receptor de ácido retinoico (RAR) y el receptor de hormona tiroidea (TR), y juntos se unen a los elementos de respuesta a vitamina D (VDRE), seguido del reclutamiento de correguladores para posteriormente ejercer su influencia sobre la transcripción de genes blanco (ver Figura 4) [53]. Las múltiples combinaciones de los heterodímeros, así como la activación de diferentes VDREs, permiten explicar la gran diversidad de acciones de la vitamina D [54, 55].

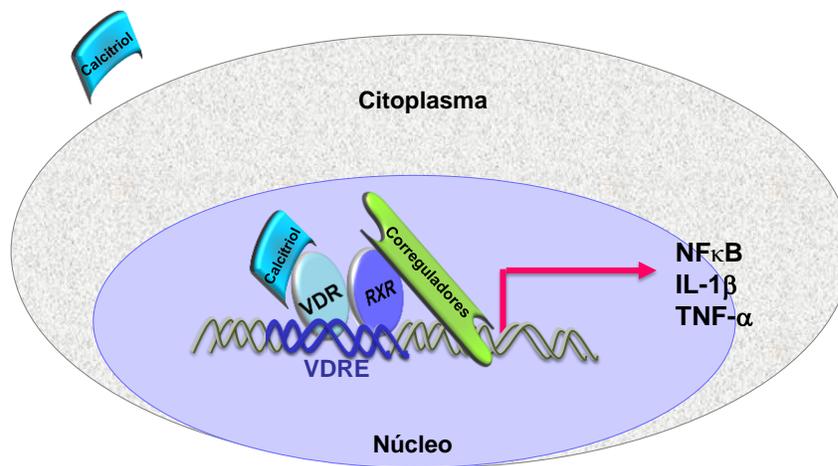


Figura 4. Mecanismo de acción del calcitriol a través del VDR. Receptor de vitamina la D (VDR), receptor retinoico X (RXR), elementos de respuesta a vitamina D (VDRE).

La función más conocida del calcitriol es su participación en la homeostasis de calcio, pero también se le atribuyen propiedades inmunomoduladoras y antineoplásicas [47]. El calcitriol, como agente inmunomodulador, ha demostrado que regula la síntesis de IL-1 β y TNF- α en diferentes tejidos como trofoblastos, células de leucemia y fibroblastos gingivales humanos [56-59].

El calcitriol en el cáncer de mama.

El calcitriol como agente antineoplásico detiene el crecimiento, la diferenciación celular, la migración, la invasión y la apoptosis en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama [52, 60, 61]. Por el contrario, los niveles bajos de calcitriol o su precursor calcidiol se asocian con el riesgo, la progresión y el comportamiento agresivo del cáncer de mama [62-65], y también están relacionados con la alta incidencia de TNBC [66]. En la clínica, el principal inconveniente de utilizar al calcitriol como agente terapéutico es que provoca hipercalcemia, pero su administración intermitente ha permitido la disminución de los efectos adversos [67, 68]. Además, el esfuerzo por buscar nuevos análogos del calcitriol ha dado como resultado compuestos con menos efectos calcémicos, como es el caso del EB1089 que inhibe la proliferación celular, estimula la diferenciación e induce apoptosis en células de cáncer de mama [69]. Por otro lado, el CB1093, otro análogo de calcitriol, aumenta la citotoxicidad inducida por TNF- α en células de cáncer de mama RE positivo [70]. Sin embargo, la regulación de citocinas proinflamatorias y otros mediadores de la respuesta inmunológica por calcitriol en TNBC es poco conocida. Diferentes grupos de investigación han demostrado que el calcitriol mejora la actividad antiproliferativa de algunos agentes antineoplásicos, como los inhibidores de la tirosina cinasa, los antiestrógenos, la radioterapia y la quimioterapia [71-75]. En lo que respecta a los efectos de la combinación de calcitriol con citocinas sobre la proliferación celular, estos aún no se han descrito en ningún subtipo de cancer de mama TNBC. Considerando que la terapia dirigida para este tipo de cáncer es limitada, el uso del calcitriol como inmunomodulador representa una alternativa terapéutica en la búsqueda de compuestos para este tipo de canceres desdiferenciados, pobre pronostico y resistentes a la terapias.

HIPÓTESIS

El calcitriol y el EB-1089 regularán la expresión génica y secreción de la IL-1 β y el TNF- α en el TNBC, y en consecuencia impactarán en la muerte y/o proliferación de células.

OBJETIVOS

Objetivo general

Investigar el efecto del calcitriol y del EB-1089 en la expresión de la IL-1 β y TNF- α en células de TNBC.

Objetivos específicos

1. Analizar el efecto del calcitriol en la expresión del RNAm del citocromo P450 24A1 en las líneas celulares de TNBC SUM-229PE, HCC1806.
2. Determinar la expresión proteica basal del VDR y de los receptores para la IL-1 β (IL-1R1 y 2) y el TNF- α (TNF-R1 y 2) en las líneas celulares SUM-229PE, HCC1806 y MCF7.
3. Determinar el efecto del calcitriol, el EB-1089, la IL-1 β y el TNF- α en la proliferación de las líneas celulares de estudio.
4. Evaluar el efecto del calcitriol y el EB-1089 en la regulación de la expresión génica y secreción de IL-1 β y el TNF- α .
5. Determinar si los efectos antiproliferativos del calcitriol y del EB-1089 están mediados por la producción endógena de la IL-1 β y el TNF- α en las líneas celulares de cáncer de mama.
6. Evaluar el efecto del tratamiento combinado de calcitriol con IL-1 β y TNF- α en la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama.
7. Investigar la asociación entre los niveles del RNAm de las citocinas proinflamatorias IL- β y TNF- α y la sobrevida de pacientes con cáncer de mama.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Los medios de cultivo celular se obtuvieron de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific; Massachusetts., EE. UU.). El suero fetal bovino (SFB) fue de Hyclone Laboratories Inc. (Logan, UT, EE. UU.). El calcitriol (1α , 25-Dihidroxitamina D₃) se adquirió de Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.), Seocalcitol (EB1089) se obtuvo de Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido), la IL-1 β se adquirió de R & D Systems (Minneapolis, MN, EE. UU.). El TNF- α se obtuvo de PeproTech (New Jersey, EE. UU.), el Trizol y los oligo-nucleótidos para la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) fueron de Invitrogen. El sistema de reacción TaqMan Master y el de transcripción inversa (RT), así como las sondas y las placas se adquirieron en Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania).

Material biológico

Se utilizaron tres líneas celulares de cáncer de mama, las células SUM-229PE que son triple negativo se compraron en Asterand, San Francisco, CA . La línea celular HCC1806 son células con fenotipo triple negativo y se obtuvieron por donación del programa de Investigación en cáncer de mama de la Universidad Nacional Autónoma de México y las células MCF7 son fenotipo receptor de estrógenos positivo y fueron obtenidas de la ATCC. Esta línea celular se utilizó como control de los ensayos de proliferación y de la expresión de receptores.

Cultivo celular

Las células se cultivaron a 37° C en ambiente húmedo en presencia de una mezcla de 5% de CO₂ y 95 % de aire. La línea celular SUM-229PE se cultivó en medio Ham's F-12 suplementado con 5 % de SFB inactivado, 5 μ g/ml de insulina, 1 μ g/ml de hidrocortisona, 1 mM de HEPES y 1 % de antibiótico-antimicótico. Las células HCC1806 y MFC7 se cultivaron en medio RPMI 1640 con glutamina, suplementado con 5 % de SFB inactivado, 10 mM de HEPES, 1 M de piruvato de sodio y 1 % de antibiótico-antimicótico. Para estudiar el efecto del calcitriol y

su análogo el EB1089 en la regulación del RNAm de la IL-1 β y el TNF- α , las líneas celulares se cultivaron en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de los compuestos durante 24 horas. Al final de las incubaciones, las células se cosecharon, lavaron y procesaron según los diferentes procedimientos para los que se emplearon.

Western blot

La presencia de los receptores IL-1R1, IL-1R2, TNFR1, TNFR2 y VDR en las células SUM-229PE, HCC1806 y MCF7 se evaluó a partir de lisados celulares. Después de cosechar las células, se lisaron en buffer RIPA (9.1 mM fosfato dibásico de sodio, 1.7 mM fosfato monobásico de sodio, 150 mM cloruro de sodio, 1 % Nonidet P-40, 0.1 % dodecil sulfato de sodio, pH 7.4), y se cuantificó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford. Las proteínas se separaron por medio de electroforesis en geles al 12 % de poliacrilamida a partir de 25 μ g de proteína total. Posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se bloquearon durante toda la noche con solución de bloqueo TBST (10 nM de Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM de NaCl, 0.1% de Tween 20) con 5% de leche descremada. Las membranas se lavaron y se incubaron durante toda la noche a 4° C en presencia de los anticuerpos monoclonales: anti-IL-1R1, anti-IL-1R2, anti-TNFR1, anti-TNFR2, anti-VDR (sc- 393998, sc-376247, sc-8436, sc-393614 y sc-13133, respectivamente (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, EE. UU.) y anti-GAPDH (MAB374, Millipore; (Massachusetts, EE. UU). Posteriormente, las membranas se lavaron e incubaron con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (sc-2031, Santa Cruz Biotechnology) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las proteínas detectadas por los anticuerpos específicos se visualizaron mediante quimioluminiscencia, usando ECL-Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) como substrato y el equipo Chemi Doc XRS+ Bio-Rad; (California EE. UU).

Ensayo de proliferación

Las líneas celulares de cáncer de mama se sembraron por triplicado en placas de cultivo de 96 pozos a una densidad de 1000-1200 células / pozo, dependiendo de la línea celular. Posteriormente, las células se trataron en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de calcitriol y EB-1089 (0.01 – 100 nM), y de las citocinas IL-1 β y TNF- α (0.05 – 100 ng/ml), o la combinación de calcitriol con TNF- α . Además, las células se trataron con los anticuerpos anti-IL-1R1 y anti-TNFR1 solos o en combinación con calcitriol o las citocinas. Se utilizó etanol como vehículo de calcitriol y EB1089 y PBS para las citocinas. Las células se incubaron durante 6 días a 37 °C, 95 % de aire, 5 % de CO₂, en un ambiente húmedo. Al término de la incubación, a cada pozo se le adicionaron 50 μ l de la mezcla del reactivo colorimétrico XTT (Roche) y se incubó durante 4 horas más para determinar la proliferación celular. La intensidad del producto colorido fue directamente proporcional a la cantidad de células vivas y se cuantificó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 492 nm en un espectrofotómetro para microplacas (BioTek; Winooski, VT, EE. UU.).

Extracción de RNA total

El RNA total se extrajo de las células utilizando el reactivo de TRIzol. El paquete celular se resuspendió en 1 ml de TRIzol, se le adicionaron 200 μ l de cloroformo, se homogeneizó y se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 20 minutos a 4° C. El RNA se recuperó de la fase acuosa y se precipitó con 500 μ l de isopropanol durante 24 horas. Posteriormente, el RNA se lavó con 1 ml de etanol al 80 %, se resuspendió en agua grado PCR y se cuantificó a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro con funcionalidad avanzada para microplacas (BioTek; Winooski, VT, EE. UU.). También se determinó la relación 260/280 nm para evaluar integridad y pureza.

Síntesis de DNA complementario por transcriptasa reversa (RT)

El DNA complementario (DNAc) se sintetizó a partir de RNA mensajero (RNAm), por acción de la enzima transcriptasa reversa. A partir de 1 µg de RNA total se sintetizó la primera cadena de DNAc utilizando el estuche comercial Transcriptor First Stand cDNA synthesis Kit (Roche), en un termociclador (Applied Biosystems), con un ciclo a 65° C durante 10 minutos, un ciclo a 55° C por 30 minutos y un ciclo de 85° C por 5 minutos. El DNAc se almacenó a -20° C hasta su procesamiento.

Cuantificación de expresión de genes mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

La expresión de genes se evaluó por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) a partir del DNAc. Se utilizaron oligonucleótidos y sondas específicos para qPCR que fueron diseñadas en la plataforma Universal ProbeLibrary System Assay Design (roche.com). Las secuencias sentido y anti-sentido utilizadas se muestran en la Tabla 2. La amplificación de los genes se realizó utilizando los termocicladores: LightCycler® 2.0 y 480 II (Roche) con base en el siguiente protocolo: activación de la Taq DNA polimerasa, desnaturalización a 95° C por 10 minutos, seguido por 45 ciclos de amplificación que consistió en 10 segundos a 95° C, 30 segundos a 60° C y 1 segundo a 72° C. El gen constitutivo GAPDH se utilizó para normalizar los valores de expresión de los genes blanco.

Tabla 2 Secuencias sentido y anti-sentido de oligonucleótidos para qPCR.

Gen	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido anti-sentido	Fragmento generado (bp)	No. de sonda
CYP24A1	CAT CAT GGC CAT CAA AAC AA	GCA GCT CGA CTG GAG TGA C	65	88
IL-1β	TAC CTG TCC TGC GTG TTG AA	TCT TTG GGT AAT TTT TGG GAT CT	76	78
TNF-α	CAG CCT CTT CTC CTT CCT GA	GCC AGA GGG CTG ATT AGA GA	123	29
GAPDH	AGC CAC ATC GCT CAG ACA C	GCC CAA TAC GAC CAA ATC C	66	60

Cuantificación de IL-1 β y TNF- α por el método ELISA

Las líneas celulares se cultivaron por triplicado en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de calcitriol y su análogo durante 3 y 72 horas para IL-1 β y TNF- α , respectivamente, para cuantificar las citocinas secretadas a los medios de cultivo a través del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), utilizando estuches comerciales de R & D Systems (Minneapolis EE. UU.) y siguiendo las recomendaciones incluidas en el mismo.

Análisis de expresión de RNA IL-1 β y TNF- α en pacientes

Se realizó una búsqueda en la base de datos Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org>) se realizó con los niveles de expresión por RNAseq de IL-1 β y TNF- α en Fragmento Por Kilobase Millón (FPKM) para 1075 pacientes con todo tipo de cáncer de mama de la base de datos The Cancer Genome Atlas o TCGA (<https://www.genome.gov>). El punto de corte óptimo para IL-1 β y TNF- α se evaluó con el software X-tile y Cutoff Finder [76, 77] para la supervivencia global (SG). El análisis de supervivencia se evaluó mediante el gráfico de Kaplan-Meier y la prueba de log-rank en el software SPSS (SPSS Inc.; Chicago, IL, EE. UU.).

Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar (D.E.). Los análisis estadísticos se determinaron mediante ANOVA de una vía seguido del método Holm-Sidak, utilizando un paquete de software especializado SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). Las diferencias se consideraron significativas para $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Efecto del calcitriol en la expresión génica de *CYP24A1* en líneas celulares de cáncer de mama

La expresión del gen que codifica para la enzima *CYP24A1* fue evaluada en respuesta a diferentes concentraciones de calcitriol en las líneas celulares de cáncer de mama a estudiar. En la Figura 5 se muestra que el calcitriol estimuló, significativamente y dependiente de la concentración, la expresión de *CYP24A1* en las líneas celulares de cáncer de mama estudiadas. El efecto estimulador del calcitriol se observó en mayor medida en las líneas celulares SUM-229PE y MCF7 que en las células HCC1806.

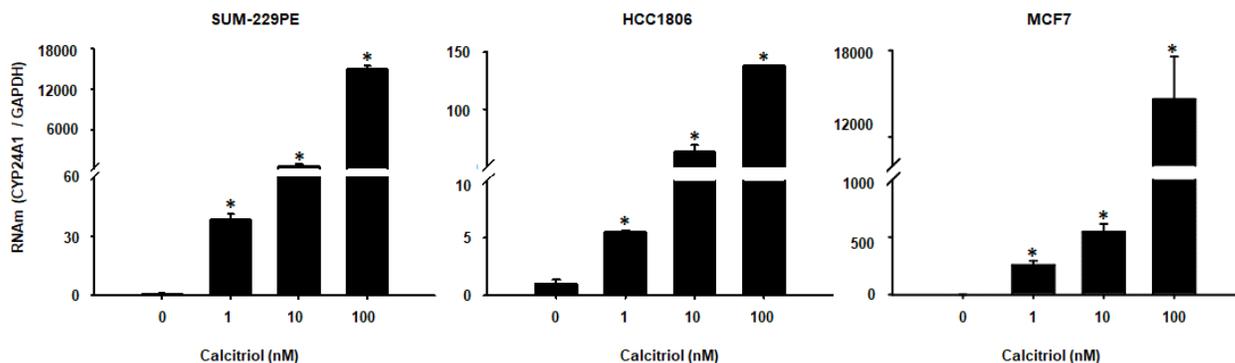


Figura 5. Efecto del calcitriol en la expresión del RNAm de *CYP24A1* en las líneas celulares de TNBC SUM-229PE, HCC1806 y MCF7. Las células se cultivaron durante 24 horas en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de calcitriol. La expresión génica se evaluó mediante qPCR. La expresión del gen de la *CYP24A1* se expresó relativa al RNAm de GAPDH. Los resultados representan la media de 3 experimentos \pm S.D. Para la normalización de datos, la expresión génica en células sin tratamiento se consideró como 1. * $p < 0.05$ vs 0.

La expresión del VDR y de los receptores de citocinas en líneas celulares de TNBC

La expresión basal de las proteínas del VDR (48 kDa), IL-1R1 (80 kDa), IL-1R2 (46 kDa), TNFR1 (55 KDa) y TNFR2 (75 KDa) se estudió a través de Western-blot en líneas celulares TNBC. Las células MCF7 se incluyeron como controles positivos de la presencia de los receptores. Como se muestra en la Figura 6, todas las líneas celulares estudiadas mostraron la presencia de los receptores evaluados, lo que sugiere que las células TNBC pueden responder a calcitriol, IL-1 β y TNF- α . Es de destacar que las células de TNBC tuvieron mayor expresión del IL-1R1 y menor expresión de la proteína VDR en comparación con las células MCF7 (RE-positivas). Entre las células de TNBC estudiadas, las SUM-229PE mostraron una aparente menor expresión proteica de TNFR2 que las células HCC1806.

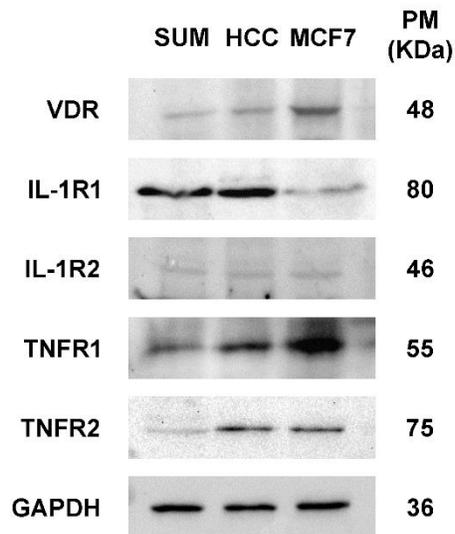


Figura 6. Expresión de los receptores de VD, IL-1 β y TNF- α en líneas celulares establecidas de TNBC. Los lisados celulares de SUM-229PE (SUM) HCC1806 (HCC) o MCF7 no tratadas se analizaron mediante Western blot. La proteína GAPDH se usó como control de carga. Se muestra una imagen representativa de dos experimentos independientes.

Efectos del calcitriol, el EB-1089, la IL-1 β y el TNF- α en la proliferación celular

Se evaluaron los efectos de diferentes concentraciones de calcitriol, EB1089, IL-1 β y TNF- α en la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama usando el método del XTT. En la Figura 7 se muestra que la sensibilidad de las células a los compuestos es diferente entre las líneas celulares. El calcitriol y su análogo EB1089 inhibieron la proliferación de las células SUM-229PE y MCF7. Con respecto a las citocinas, la IL-1 β disminuyó el crecimiento de las células SUM-229PE, mientras que el TNF- α tuvo efectos inhibitorios en las tres líneas celulares probadas. El calcitriol, el análogo y la IL- β no tuvieron efectos sobre el crecimiento de las células HCC1806.

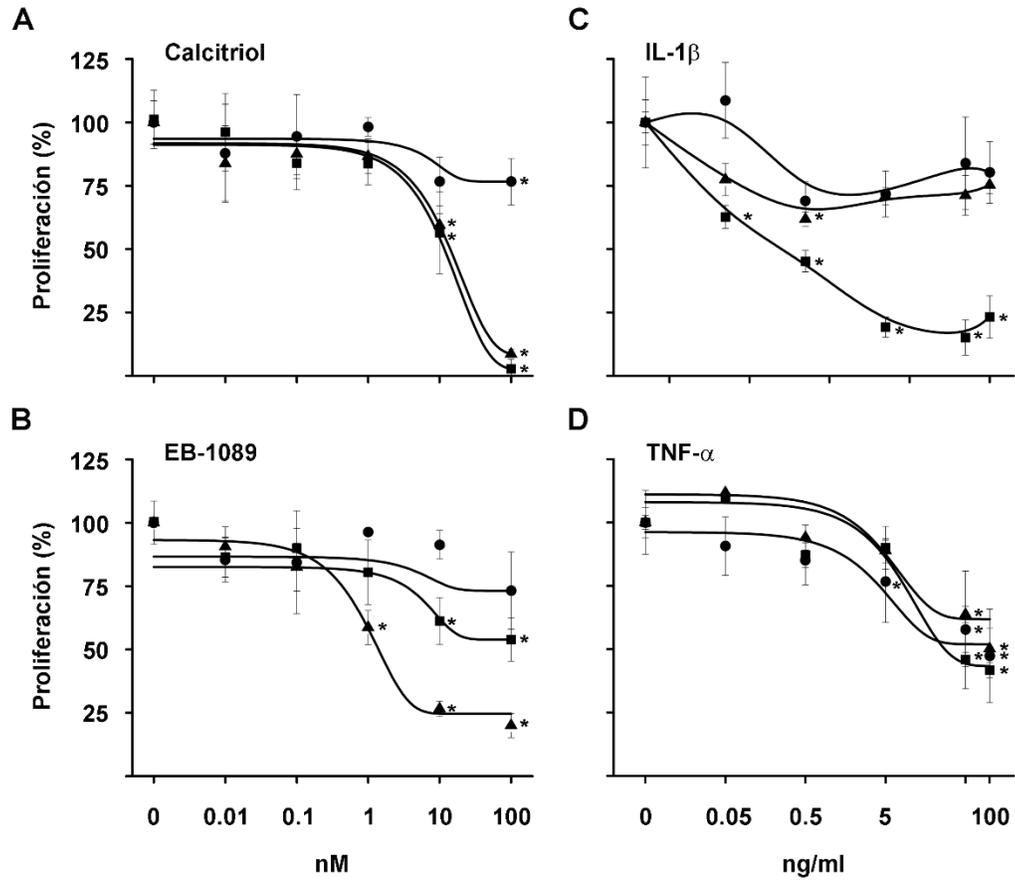


Figura 7. Efecto del calcitriol, EB1089, IL-1 β y TNF- α en la proliferación celular. Las células SUM-229PE (■), HCC1806 (●) y MCF7 (▲) se cultivaron en ausencia (0) o presencia de diferentes concentraciones de calcitriol (A), EB1089 (B), IL-1 β (C) o TNF- α (D) durante 6 días. La proliferación celular se evaluó mediante el método XTT. Los resultados representan el promedio de 3 experimentos, cada uno por triplicado \pm S.D. *p <0.05 vs control. Los valores obtenidos se normalizaron considerando las células no tratadas como el 100% de la proliferación celular.

El calcitriol y el EB1089 indujeron la expresión génica de la IL-1 β y el TNF- α en células de TNBC

Se evaluaron los efectos del calcitriol y su análogo en la producción de citocinas en células de TNBC. La Figura 8 muestra que tanto el calcitriol como el EB1089 estimularon la expresión de los genes de IL-1 β y TNF- α en las células SUM-229PE, donde los niveles de expresión de RNAm de IL-1 β aumentaron significativamente a la concentración de 100 nM de calcitriol y a todas las concentraciones de EB1089 utilizadas (figura 8A). En esta misma línea celular, se observó el aumento significativo de la expresión del gen de TNF- α a la concentración de 100 nM de calcitriol y desde 10 nM en el caso de EB1089 (figura 8B). Con respecto a las células HCC1809, el tratamiento con calcitriol aumentó significativamente los niveles del RNAm de TNF- α solo a 100 nM (figura 8D), mientras que en MCF7 el EB1089 indujo la expresión del gen de IL-1 β a todas las concentraciones evaluadas (figura 8E). El calcitriol y su análogo no tuvieron efectos significativos sobre la expresión génica de IL-1 β en HCC1809 (figura 8C) ni de IL-1 β y TNF- α en células MCF7 (figura 8E y 8F, respectivamente).

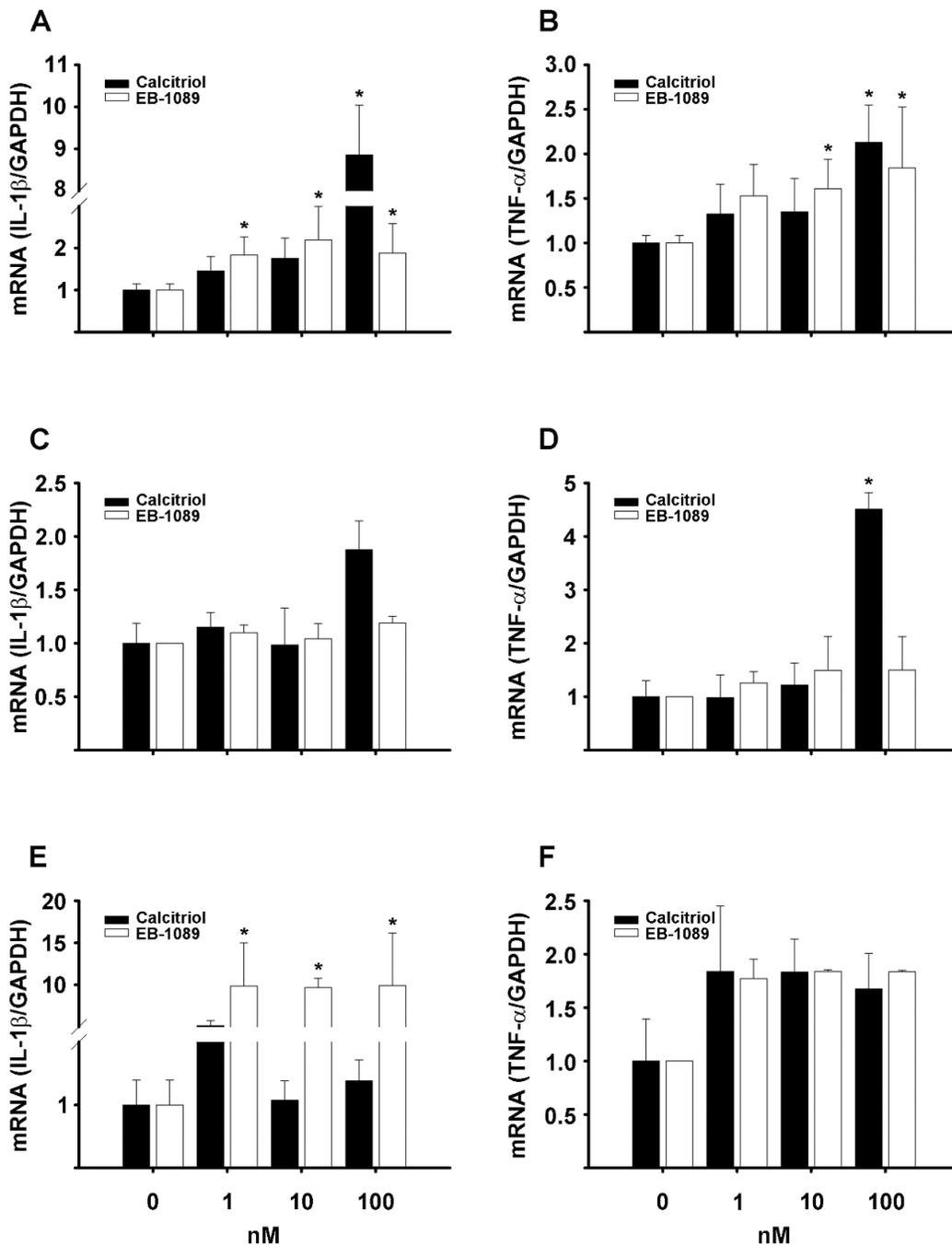


Figura 8. Efectos del calcitriol y su análogo en la expresión del gen de IL-1 β y TNF- α en células de TNBC. Las células se cultivaron en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de calcitriol (barras negras) o EB1089 (barras blancas) durante 24 horas. La expresión del gen de IL-1 β y TNF- α se evaluó mediante qPCR en las células SUM-229PE (A y B), HCC1806 (C y D), y MCF7 (E y F). Los resultados representan el promedio de al menos 3 experimentos por triplicado \pm S.D. * $p < 0.05$ vs control (0). Para la normalización de datos, la expresión génica de las células sin tratamiento se consideró como 1.

El calcitriol y el EB1089 indujeron la secreción de la IL-1 β y el TNF- α en células TNBC

Se evaluó el efecto de calcitriol y su análogo sobre la secreción de las citocinas, como se muestra en la tabla 3. En las células SUM-229PE, las concentraciones de calcitriol de 100 y 10 nM aumentaron significativamente la secreción de IL-1 β y TNF- α , respectivamente; mientras que los niveles de IL-1 β y TNF- α se incrementaron significativamente por EB1089 a todas las concentraciones examinadas. En células HCC1806, solo la secreción de IL-1 β aumentó significativamente con el tratamiento con EB1089 (1-100 nM). Ni calcitriol ni EB1089 modificaron los niveles de IL-1 β y TNF- α en las células MCF7. Estos resultados demostraron que el calcitriol y su análogo tienen la capacidad de modular la respuesta de IL-1 β y TNF- α *in vitro* preferentemente en las células SUM-229PE, por lo tanto, dichas células fueron elegidas para investigar el próximo objetivo.

Tabla 3. Secreción de citocinas inducida por el calcitriol y su análogo EB1089 en líneas celulares de cáncer de mama.

		SUM-229PE		HCC1806		MCF7	
		IL-1 β (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
Calcitriol (nM)	0	14.9 \pm 8.9	7.1 \pm 2.2	29.2 \pm 2.5	28.4 \pm 9.9	15.4 \pm 4.9	27.9 \pm 10.5
	1	16.3 \pm 1.2	10.5 \pm 1.7	24.9 \pm 1.7	23.7 \pm 0.4	13.8 \pm 4.0	34.3 \pm 9.9
	10	19.1 \pm 2.3	22.9 \pm 6.6*	31.3 \pm 1.8	19.9 \pm 1.7	12.8 \pm 2.4	26.7 \pm 3.1
	100	33.4 \pm 2.4*	10.9 \pm 3.1	32.1 \pm 3.4	20.3 \pm 1.0	20.5 \pm 3.4	36.4 \pm 8.2
EB1089 (nM)	1	39.2 \pm 11.2*	13.1 \pm 1.3*	46.4 \pm 3.4*	23.5 \pm 6.3	11.76 \pm 4.5	24.5 \pm 8.6
	10	24.3 \pm 0.9*	17.9 \pm 0.9*	41.7 \pm 3.4*	21.3 \pm 6.2	13.54 \pm 1.3	25.0 \pm 11.4
	100	27.4 \pm 5.1*	17.7 \pm 1.6*	38.7 \pm 0.8*	28.4 \pm 7.3	17.84 \pm 6.6	35.7 \pm 0.7

Los resultados son expresados como la media \pm S.D. La secreción de las citocinas se determinó por triplicado y representa el promedio de tres experimentos independientes. *p <0.05 vs células no tratadas (0).

Los efectos antiproliferativos del calcitriol se revirtieron bloqueando el IL-1R1 y el TNFR1

Considerando que el calcitriol inhibe la proliferación de las células SUM-229PE y a su vez induce la expresión de IL-1 β y TNF- α , evaluamos si los efectos antiproliferativos de calcitriol observados podrían ser mediados a través de la síntesis de IL-1 β y TNF- α . Se realizaron ensayos de proliferación en presencia de calcitriol, IL-1 β , TNF- α , anticuerpos contra los receptores de IL-1 β y TNF- α , así como la combinación de calcitriol o las citocinas con los anticuerpos. Como se esperaba, calcitriol, IL-1 β y TNF- α provocaron una disminución significativa en el crecimiento celular. De manera interesante, el efecto inhibitorio de estos compuestos se revirtió significativamente cuando las células se trataron con las combinaciones de calcitriol o IL-1 β en presencia de anti-IL-1R1 (figura 9A); y las combinaciones de calcitriol o TNF- α con anti TNFR1 (figura 9B). Los anticuerpos anti-IL-1 β , anti-IL-1R2, anti-TNF- α y anti-TNFR2 no tuvieron efectos en la proliferación celular (Ver anexo1 Figura 12). La presencia de anticuerpos solos no modificó la proliferación celular. Estos resultados demostraron que el calcitriol disminuyó la proliferación celular, en parte al inducir la síntesis endógena de las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α .

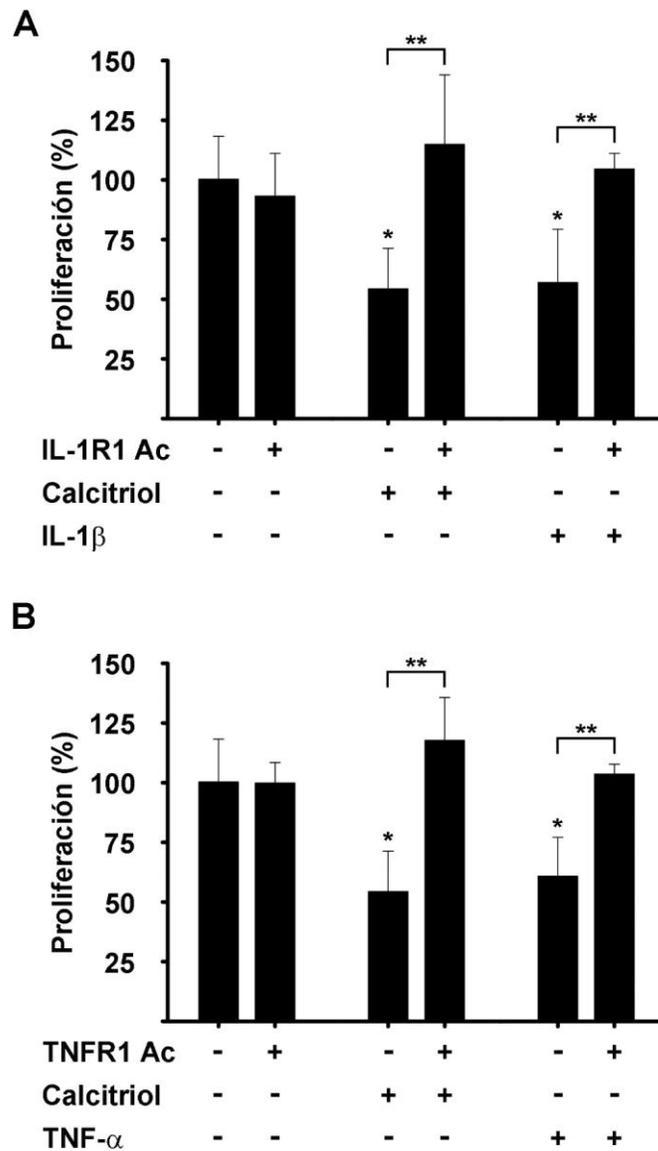


Figura 9. El calcitriol inhibe la proliferación celular por inducir la producción endógena de IL-1β (A) y TNF-α (B). Las células SUM-229PE se trataron con calcitriol (10 nM), IL-1β (0.5 ng / ml), TNF-α (5 ng / ml), anti-IL-1R1 (5 ng / ml) y anti-TNFR1 (2 ng / ml), individualmente o combinados. La proliferación celular se evaluó después de 6 días de tratamiento usando el método XTT. Las células no tratadas se consideraron como el 100% de la proliferación celular. Los resultados representan el promedio de 3 experimentos, cada uno por triplicado ± S.D. * p <0.05 vs células no tratadas. ** p <0.05 calcitriol o citocina sola vs tratamientos combinados. Anticuerpo anti IL-1R1 (IL-1R1 Ac). Anticuerpo anti TNFR1 (TNFR1 Ac).

La combinación de calcitriol con TNF- α disminuyó la proliferación celular en mayor medida que con cada compuesto solo en células de cáncer de mama

Considerando que tanto el calcitriol como el TNF- α inhibieron la proliferación celular en las tres líneas celulares de cáncer de mama establecidas utilizadas en este estudio, se evaluó la combinación de ambos compuestos en el crecimiento celular. Las concentraciones de calcitriol fueron diferentes para cada línea celular y se muestran los resultados en donde se observó la mejor respuesta. Las concentraciones de calcitriol que no indujeron respuesta se muestran en el Anexo 1 figura 13. La figura 10 muestra que el tratamiento simultáneo con calcitriol y TNF- α indujo respuestas significativas sobre la inhibición del crecimiento celular en comparación con los compuestos solos (Figura 10A-C). En el caso de las células MCF7, ninguno de los compuestos mostró ningún efecto en el crecimiento; sin embargo, el tratamiento combinado inhibió significativamente la proliferación celular (Figura 10C).

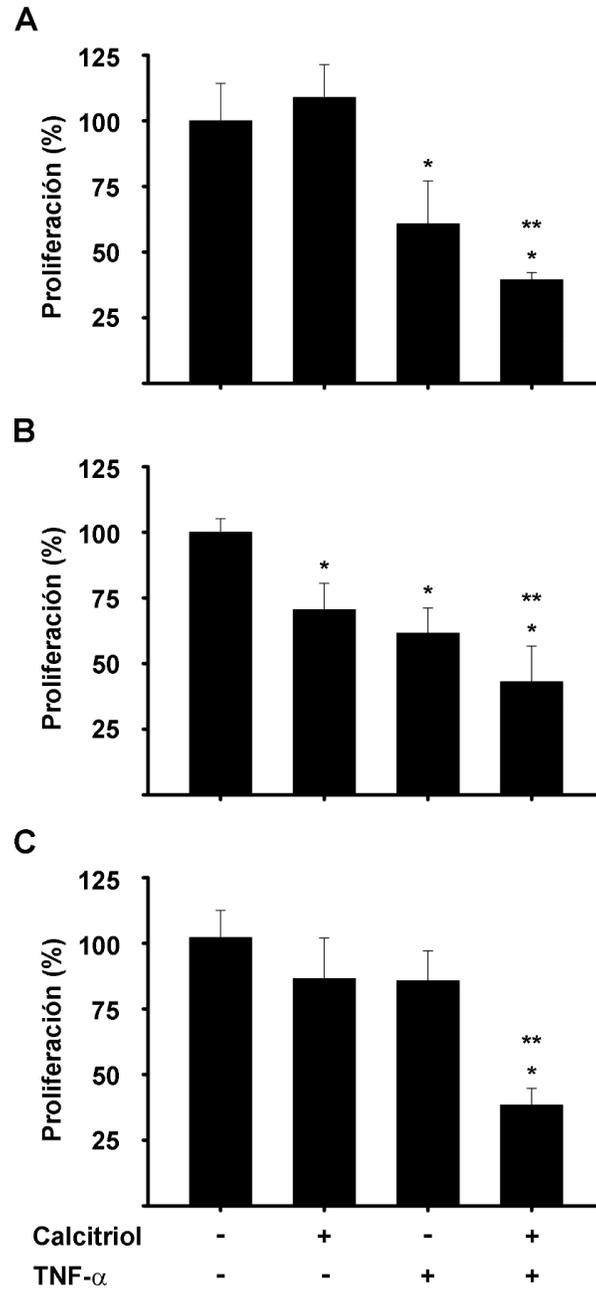


Figura 10. Efecto de la combinación de calcitriol y TNF- α en la proliferación de células de cáncer de mama. Las células SUM-229PE (A), HCC1806 (B) y MCF7 (C) se incubaron con calcitriol, TNF- α o su combinación durante 6 días y se evaluó la proliferación celular. El calcitriol se usó a las concentraciones de 0,1, 100 y 10 nM para las células SUM-229PE, HCC1806 y MCF7, respectivamente. TNF- α se usó a una concentración de 5 ng/ml para las 3 líneas celulares. Los datos de las células no tratadas (-) se normalizaron al 100%. Los resultados representan el promedio de 3 experimentos, cada uno por triplicado \pm S.D. * p <0.05 vs vehículo y ** p <0.05 vs las moléculas solas.

La alta expresión del RNAm de IL- β y TNF- α se asocia con mayor sobrevida de pacientes con cáncer de mama

Considerando los efectos de IL-1 β y TNF- α en la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama, decidimos investigar la relación entre los niveles del RNAm de las citocinas proinflamatorias estudiadas y la supervivencia de pacientes con cáncer de mama, utilizando los datos públicos del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) recuperados de la base de datos del Human Protein Atlas. Los resultados demostraron que los pacientes con altos niveles de expresión de RNAm de IL-1 β tuvieron mejor sobrevida que aquellos con niveles bajos. Los pacientes con IL-1 β alta tuvieron una mediana de SG de 18.0 años *versus* 9.4 años para el resto ($p= 0.007$). En el caso del TNF- α , el grupo con alta expresión del RNAm presentó una mediana de SG de 10.8 años *versus* 9.4 años ($P= 0.249$); aunque no fue estadísticamente significativo. Los puntos de corte óptimos fueron 0.62 y 0.96 FPKM para IL-1 β y TNF- α , respectivamente (Figura 11). El análisis de estos datos fueron asesorados por el Dr. Giovanni Soca Chafre.

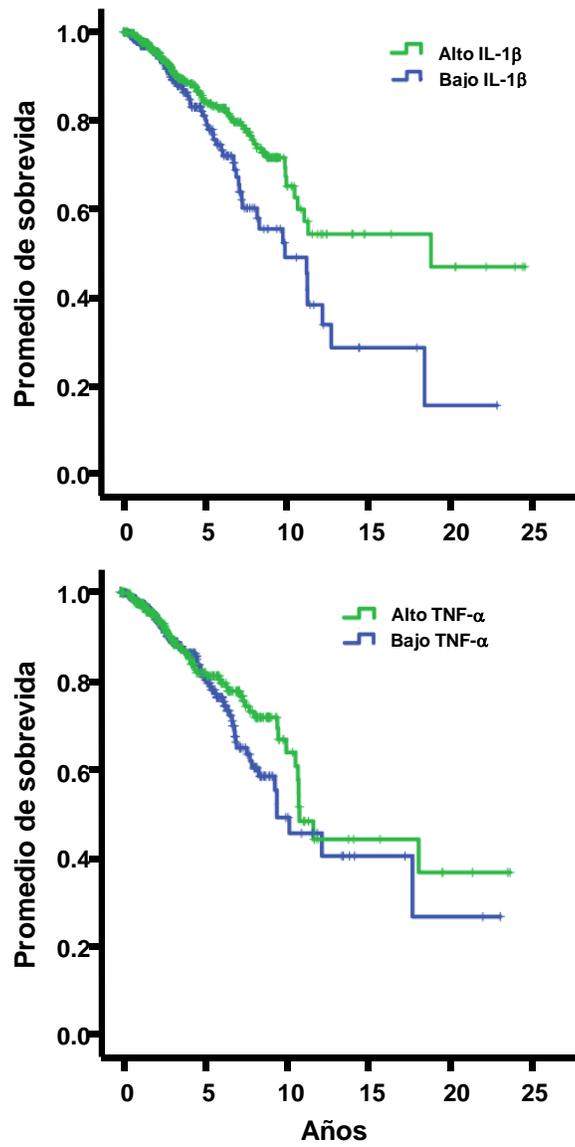


Figura 1. Tasa de supervivencia en pacientes con cáncer de mama con base en la expresión del RNAm de IL- β y TNF- α . Las gráficas Kaplan-Meier muestran la supervivencia promedio de pacientes con cáncer de mama con base en los niveles de expresión del RNAm de IL- β (A) y TNF- α (B) de la base de datos TCGA. n=1075

DISCUSIÓN

El TNBC representa un desafío para el desarrollo de estrategias terapéuticas debido al grado de desdiferenciación celular y la desregulación de las moléculas implicadas en el control de la proliferación, la apoptosis, la migración, la invasión y los procesos de células inmunitarias [4]. La deficiencia de calcitriol se ha asociado con mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama [62, 63]. De hecho, los niveles bajos de la vitamina D se asociaron significativamente con TNBC en mujeres afroamericanas además de varios trastornos inflamatorios autoinmunes y crónicos [21, 65, 78]. Además de sus conocidas funciones antitumorales y antiproliferativas, el calcitriol tiene efectos inmunomoduladores para mantener la tolerancia y promover la inmunidad protectora [48]. Específicamente, el calcitriol potencia la producción de TNF- α inducida por el dipéptido de muramilo en células dendríticas derivadas de monocitos de pacientes con enfermedad de Crohn [79]. Además, tanto el calcitriol como su precursor, el calcidiol, indujeron la secreción de IL-1 β a partir de monocitos diferenciados [80]. Sin embargo, la regulación de IL-1 β y TNF- α por calcitriol en TNBC no se había estudiado. En el presente trabajo, demostramos que las células SUM-229PE y HCC1806 expresaron los receptores para IL-1 β , TNF- α y vitamina D. Es importante resaltar que la presencia de IL-1R1, IL-1R2, TNFR1 y TNFR2 en estas líneas celulares no se había reportado anteriormente. Además, nuestros datos apoyan efectos inmunomoduladores del calcitriol y su análogo, ya que ambos aumentaron la expresión y secreción de IL-1 β y TNF- α en células SUM-229PE, así como la secreción de IL-1 β en células HCC1806 inducida por EB-1089.

Se han atribuido funciones controversiales a IL-1 β y TNF- α en cáncer de mama, asociadas a la inhibición de la proliferación celular así como promoción de la invasión, propagación y comportamiento agresivo del tumor [81-84]. En concordancia con trabajos previos, nuestros resultados mostraron que las citocinas IL-1 β y TNF- α inhibieron o no tuvieron efecto sobre la proliferación en las tres líneas celulares evaluadas en este estudio. Previamente se habían

demostrado las funciones antiproliferativas de estas citocinas en células MCF7 [83]. Como se esperaba, el calcitriol y su análogo disminuyeron la proliferación de células SUM-229PE y MCF7 [73, 85], pero no afectaron el crecimiento de las células HCC1806. En nuestro estudio, observamos que las células SUM-229PE fueron más sensibles a todos los compuestos evaluados en comparación con las células HCC1806, lo cual podría estar relacionado su fenotipo molecular, ya que aunque ambas líneas son células de TNBC, las SUM-229PE pertenecen al subtipo BL1 y las células HCC1806 al BL2. Se sabe que el subtipo BL1 se caracteriza por una mayor proliferación, pérdida del control del ciclo celular y alta expresión de genes que responden al daño del DNA [12]. Mientras que, el subtipo BL2 se distingue por la alta expresión de factores de crecimiento, glucólisis y gluconeogénesis [86]. Teniendo en cuenta lo anterior, las citocinas, así como el análogo del calcitriol podrían estar afectando el fenotipo BL1 de las células SUM-229PE al inducir la detención en el ciclo celular para causar la inhibición de la proliferación, como se ha observado en otros tejidos [87, 88]. Sin embargo, se requiere mayor investigación al respecto.

Considerando que el calcitriol estimuló la secreción de IL- β y TNF- α y que estas citocinas inhibieron la proliferación celular, se planteó la hipótesis de que los efectos antiproliferativos del calcitriol podrían llevarse a cabo, al menos parcialmente, mediante la regulación de la producción endógena de IL-1 β y TNF- α en las células de TNBC SUM-229PE. Nuestros resultados demostraron que cuando se bloqueó la acción de IL-1R1 y TNFR1 con anticuerpos específicos, el efecto inhibitor de calcitriol se anuló significativamente. Se esperaba la reversibilidad de las acciones inhibitoras del crecimiento de calcitriol por anti-IL-1R1 y anti-TNFR1 debido a que se sabe que la señalización en respuesta a IL-1 β requiere principalmente del IL-1R1 en tanto que IL-1R2 actúa como receptor señuelo [26, 28], y la activación inducida por TNFR1 induce principalmente apoptosis en contraste con el TNFR2 que promueve proliferación [41, 89]. De hecho, las células SUM-229PE tuvieron mayor expresión proteica de IL-1R1 y TNFR1 en comparación con IL-1R2 y TNFR2, lo que podría ser uno de los

factores que contribuye a la señalización de estos receptores. En contraste con este mecanismo de acción del calcitriol, Peleg y colaboradores demostraron que el calcitriol y algunos análogos bloquean el crecimiento inducido por IL-1 β en células progenitoras de la leucemia mielógena aguda [59].

Las observaciones anteriores sugieren que el contexto celular, las condiciones y el microambiente juegan un papel preponderante en la señalización de calcitriol y las citocinas y sus efectos biológicos finales. Además, nuestros resultados comprueban que la producción de IL-1 β y TNF- α inducida por calcitriol funciona de manera autocrina como un factor de inhibición en la proliferación de células de TNBC. Colectivamente, nuestros datos demostraron que otro mecanismo por el que el calcitriol ejerce sus efectos inhibidores es mediante la inducción de la síntesis de IL-1 β y TNF- α y a su vez la activación de IL-1R1 y TNFR1, respectivamente, destacando las funciones inmunomoduladoras y antiproliferativas del calcitriol en el subtipo TNBC.

En los últimos años, los regímenes de combinación de fármacos han mejorado los resultados del tratamiento del cáncer. En este sentido, nuestro laboratorio y otros han demostrado claramente los efectos del calcitriol sobre la proliferación celular en una variedad de líneas de células cancerosas, particularmente cuando se combina con otras terapias contra el cáncer bien establecidas [73-75]. El TNF- α combinado con radioterapia o criocirugía da como resultado una respuesta antitumoral sinérgica o la destrucción completa del tumor, respectivamente, en modelos murinos de cáncer de mama [90, 91]. Por otro lado, el pretratamiento con análogos del calcitriol potenció los efectos citotóxicos del TNF- α en células de cáncer de mama ER-positivas en términos de pérdida de viabilidad celular y fragmentación del ADN [70]. De manera similar, en este estudio demostramos que la combinación de calcitriol con el TNF- α resultó en un mayor efecto antiproliferativo que cada compuesto solo en todas las células de cáncer de mama evaluadas. En particular, las células HCC1806, que eran menos sensibles al calcitriol, mostraron una reducción significativa en la proliferación celular

cuando se expusieron a la combinación de los compuestos. Posiblemente, el tratamiento combinado de calcitriol y TNF- α mejoró la respuesta inhibitoria del crecimiento de las células debido a la capacidad del calcitriol para aumentar la apoptosis inducida por TNF- α , como ya habían demostrado Pirianov y Colston con derivados de vitamina D en células MCF7 [70].

En cuanto a la combinación de calcitriol con IL-1 β no se ha estudiado previamente en cáncer de mama. En el presente trabajo estudiamos el efecto de la combinación de dichas moléculas en la proliferación celular, sin embargo, no observamos diferencias significativas con respecto al tratamiento con las moléculas solas (ver Anexo 1 Figura 14) excepto en las células MCF7.

Entre las perspectivas del trabajo se tiene considerado evaluar si los efectos observados en estudios in vitro se reproducen en modelos in vivo, si el mecanismo del calcitriol para inducir la inhibición de la proliferación mediante la inducción de citocinas se lleva a cabo en otros subtipos de cáncer de mama, si los resultados de la combinación de compuestos se reproduce en otros subtipos de cáncer de mama o en otros tipos de cáncer, además de continuar el estudio utilizando otras citocinas u otros mediadores de la respuesta inmunológica con el fin entender el comportamiento de las células tumorales frente a moléculas del sistema inmunitario.

CONCLUSIÓN

Las acciones antiproliferativas de calcitriol implican la participación de las citocinas proinflamatorias endógenas IL-1 β y TNF- α en células de TNBC. Estos resultados son de particular importancia, especialmente por sus implicaciones en el tratamiento de algunos cánceres de mama, como los que tienen un fenotipo triple negativo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS *et al*: **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(19):10869-10874.
2. Yip CH, Rhodes A: **Estrogen and progesterone receptors in breast cancer.** *Future oncology* 2014, **10**(14):2293-2301.
3. Ronchi A, Pagliuca F, Zito Marino F, Accardo M, Cozzolino I, Franco R: **Current and potential immunohistochemical biomarkers for prognosis and therapeutic stratification of breast carcinoma.** *Semin Cancer Biol* 2020.
4. Wuerstlein R, Harbeck N: **Neoadjuvant Therapy for HER2-positive Breast Cancer.** *Reviews on recent clinical trials* 2017, **12**(2):81-92.
5. Rida P, Ogden A, Ellis IO, Varga Z, Wolff AC, Traina TA, Hatzis C, Palmer JR, Ambrosone CB, Lehmann BD *et al*: **First international TNBC conference meeting report.** *Breast Cancer Res Treat* 2018.
6. Bollinger S: **Biopsychosocial Challenges and Needs of Young African American Women with Triple-Negative Breast Cancer.** *Health & social work* 2018, **43**(2):84-92.
7. Dietze EC, Sistrunk C, Miranda-Carboni G, O'Regan R, Seewaldt VL: **Triple-negative breast cancer in African-American women: disparities versus biology.** *Nat Rev Cancer* 2015, **15**(4):248-254.
8. Liu M, Liu Y, Deng L, Wang D, He X, Zhou L, Wicha MS, Bai F, Liu S: **Transcriptional profiles of different states of cancer stem cells in triple-negative breast cancer.** *Mol Cancer* 2018 **17**(1):65.
9. Bareche Y, Venet D, Ignatiadis M, Aftimos P, Piccart M, Rothe F, Sotiriou C: **Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis.** *Ann Oncol* 2018, **29**(4):895-902.
10. Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trumper L, Balkwill FR, Binder C: **Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases.** *Carcinogenesis* 2004, **25**(8):1543-1549.
11. Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F, Valero V, Lehmann BD, Pietenpol JA, Hortobagyi GN *et al*: **Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes.** *Clin Cancer Res* 2013, **19**(19):5533-5540.
12. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA: **Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies.** *J Clin Invest* 2011, **121**(7):2750-2767.
13. Zhao S, Zuo WJ, Shao ZM, Jiang YZ: **Molecular subtypes and precision treatment of triple-negative breast cancer.** *Annals of translational medicine* 2020, **8**(7):499.
14. Moran MS: **Radiation therapy in the locoregional treatment of triple-negative breast cancer.** *Lancet Oncol* 2015, **16**(3):e113-122.

15. Slater H: **FDA Approves Pembrolizumab + Chemotherapy Combination for Locally Recurrent Unresectable or Metastatic TNBC.** *Oncology (Williston Park)* 2020, **34**(12):547.
16. Liubomirski Y, Lerrer S, Meshel T, Rubinstein-Achiasaf L, Morein D, Wiemann S, Korner C, Ben-Baruch A: **Tumor-Stroma-Inflammation Networks Promote Pro-metastatic Chemokines and Aggressiveness Characteristics in Triple-Negative Breast Cancer.** *Front Immunol* 2019, **10**:757.
17. Teschendorff AE, Gomez S, Arenas A, El-Ashry D, Schmidt M, Gehrman M, Caldas C: **Improved prognostic classification of breast cancer defined by antagonistic activation patterns of immune response pathway modules.** *BMC Cancer* 2010, **10**:604.
18. Matsumoto H, Koo SL, Dent R, Tan PH, Iqbal J: **Role of inflammatory infiltrates in triple negative breast cancer.** *Journal of clinical pathology* 2015, **68**(7):506-510.
19. Fouad TM, Kogawa T, Reuben JM, Ueno NT: **The role of inflammation in inflammatory breast cancer.** *Adv Exp Med Biol* 2014, **816**:53-73.
20. Martinez-Canales S, Cifuentes F, Lopez De Rodas Gregorio M, Serrano-Oviedo L, Galan-Moya EM, Amir E, Pandiella A, Gyorffy B, Ocana A: **Transcriptomic immunologic signature associated with favorable clinical outcome in basal-like breast tumors.** *PLoS One* 2017, **12**(5):e0175128.
21. Mantovani A, Marchesi F, Porta C, Sica A, Allavena P: **Inflammation and cancer: breast cancer as a prototype.** *Breast* 2007, **16 Suppl 2**:S27-33.
22. Dinarello CA: **Interleukin-1.** *Reviews of infectious diseases* 1984, **6**(1):51-95.
23. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A: **The interleukin-1 family: back to the future.** *Immunity* 2013, **39**(6):1003-1018.
24. Palomo J, Dietrich D, Martin P, Palmer G, Gabay C: **The interleukin (IL)-1 cytokine family-Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases.** *Cytokine* 2015, **76**(1):25-37.
25. Apte RN, Voronov E: **Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy?** *Immunol Rev* 2008, **222**:222-241.
26. Subramaniam S, Stansberg C, Cunningham C: **The interleukin 1 receptor family.** *Dev Comp Immunol* 2004, **28**(5):415-428.
27. Hazuda DJ, Lee JC, Young PR: **The kinetics of interleukin 1 secretion from activated monocytes. Differences between interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta.** *J Biol Chem* 1988, **263**(17):8473-8479.
28. Apte RN, Voronov E: **Interleukin-1-a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions.** *Semin Cancer Biol* 2002, **12**(4):277-290.
29. Slack J, McMahan CJ, Waugh S, Schooley K, Spriggs MK, Sims JE, Dower SK: **Independent binding of interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta to type I and type II interleukin-1 receptors.** *J Biol Chem* 1993, **268**(4):2513-2524.
30. Xu Y, Tao X, Shen B, Horng T, Medzhitov R, Manley JL, Tong L: **Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains.** *Nature* 2000, **408**(6808):111-115.
31. Vigers GP, Anderson LJ, Caffes P, Brandhuber BJ: **Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1beta.** *Nature* 1997, **386**(6621):190-194.
32. Martinez-Reza I, Diaz L, Barrera D, Segovia-Mendoza M, Pedraza-Sanchez S, Soca-Chafre G, Larrea F, Garcia-Becerra R: **Calcitriol Inhibits the Proliferation of Triple-Negative Breast Cancer Cells through a Mechanism Involving the Proinflammatory Cytokines IL-1beta and TNF-alpha.** *J Immunol Res* 2019, **2019**:6384278.

33. Colotta F, Dower SK, Sims JE, Mantovani A: **The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1.** *Immunol Today* 1994, **15**(12):562-566.
34. Song X, Voronov E, Dvorkin T, Fima E, Cagnano E, Benharroch D, Shendler Y, Bjorkdahl O, Segal S, Dinarello CA *et al*: **Differential effects of IL-1 alpha and IL-1 beta on tumorigenicity patterns and invasiveness.** *J Immunol* 2003, **171**(12):6448-6456.
35. Filippi I, Carraro F, Naldini A: **Interleukin-1beta Affects MDAMB231 Breast Cancer Cell Migration under Hypoxia: Role of HIF-1alpha and NFkappaB Transcription Factors.** *Mediators Inflamm* 2015, **2015**:789414.
36. Mon NN, Senga T, Ito S: **Interleukin-1beta activates focal adhesion kinase and Src to induce matrix metalloproteinase-9 production and invasion of MCF-7 breast cancer cells.** *Oncology letters* 2017, **13**(2):955-960.
37. McCune CS, Marquis DM: **Interleukin 1 as an adjuvant for active specific immunotherapy in a murine tumor model.** *Cancer Res* 1990, **50**(4):1212-1215.
38. Angus Thomson ML: **The cytokine Handbook**, vol. 2; 2003.
39. Selby P, Hobbs S, Viner C, Jackson E, Jones A, Newell D, Calvert AH, McElwain T, Fearon K, Humphreys J *et al*: **Tumour necrosis factor in man: clinical and biological observations.** *Br J Cancer* 1987, **56**(6):803-808.
40. Sedger LM, McDermott MF: **TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2014, **25**(4):453-472.
41. Fuchs P, Strehl S, Dworzak M, Himmeler A, Ambros PF: **Structure of the human TNF receptor 1 (p60) gene (TNFR1) and localization to chromosome 12p13 [corrected].** *Genomics* 1992, **13**(1):219-224.
42. Gomez Flores-Ramos L, Escoto-De Dios A, Puebla-Perez AM, Figuera-Villanueva LE, Ramos-Silva A, Ramirez-Patino R, Delgado-Saucedo JI, Salas-Gonzalez E, Zuniga-Gonzalez GM, Alonzo-Rojo A *et al*: **Association of the tumor necrosis factor-alpha -308G>A polymorphism with breast cancer in Mexican women.** *Genet Mol Res* 2013, **12**(4):5680-5693.
43. Sheng Y, Li F, Qin Z: **TNF Receptor 2 Makes Tumor Necrosis Factor a Friend of Tumors.** *Frontiers in immunology* 2018, **9**:1170.
44. Lebrech H, Ponce R, Preston BD, Iles J, Born TL, Hooper M: **Tumor necrosis factor, tumor necrosis factor inhibition, and cancer risk.** *Curr Med Res Opin* 2015, **31**(3):557-574.
45. Micheau O, Tschopp J: **Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes.** *Cell* 2003, **114**(2):181-190.
46. Balkwill F: **TNF-alpha in promotion and progression of cancer.** *Cancer Metastasis Rev* 2006, **25**(3):409-416.
47. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E: **Vitamin D.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2005, **289**(1):F8-28.
48. Wei R, Christakos S: **Mechanisms Underlying the Regulation of Innate and Adaptive Immunity by Vitamin D.** *Nutrients* 2015, **7**(10):8251-8260.
49. Norman AW: **From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health.** *Am J Clin Nutr* 2008, **88**(2):491S-499S.
50. Dwivedi PP, Omdahl JL, Kola I, Hume DA, May BK: **Regulation of rat cytochrome P450C24 (CYP24) gene expression. Evidence for functional cooperation of Ras-activated Ets transcription factors with the vitamin D**

- receptor in 1,25-dihydroxyvitamin D(3)-mediated induction. *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(1):47-55.
51. Novakovic B, Sibson M, Ng HK, Manuelpillai U, Rakyen V, Down T, Beck S, Fournier T, Evain-Brion D, Dimitriadis E *et al*: **Placenta-specific methylation of the vitamin D 24-hydroxylase gene: implications for feedback autoregulation of active vitamin D levels at the fetomaternal interface.** *The Journal of biological chemistry* 2009, **284**(22):14838-14848.
 52. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G: **Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects.** *Physiol Rev* 2016, **96**(1):365-408.
 53. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW: **The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed.** *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 1998, **13**(3):325-349.
 54. Kissmeyer AM, Binderup E, Binderup L, Mork Hansen C, Andersen NR, Makin HL, Schroeder NJ, Shankar VN, Jones G: **Metabolism of the vitamin D analog EB 1089: identification of in vivo and in vitro liver metabolites and their biological activities.** *Biochem Pharmacol* 1997, **53**(8):1087-1097.
 55. Shankar VN, Dilworth FJ, Makin HL, Schroeder NJ, Trafford DJ, Kissmeyer AM, Calverley MJ, Binderup E, Jones G: **Metabolism of the vitamin D analog EB1089 by cultured human cells: redirection of hydroxylation site to distal carbons of the side-chain.** *Biochem Pharmacol* 1997, **53**(6):783-793.
 56. Diaz L, Noyola-Martinez N, Barrera D, Hernandez G, Avila E, Halhali A, Larrea F: **Calcitriol inhibits TNF-alpha-induced inflammatory cytokines in human trophoblasts.** *Journal of reproductive immunology* 2009, **81**(1):17-24.
 57. Nakashyan V, Tipton DA, Karydis A, Livada R, Stein SH: **Effect of 1,25(OH)₂ D₃ and 20(OH)D₃ on interleukin-1beta-stimulated interleukin-6 and -8 production by human gingival fibroblasts.** *J Periodontal Res* 2017, **52**(5):832-841.
 58. Noyola-Martinez N, Diaz L, Avila E, Halhali A, Larrea F, Barrera D: **Calcitriol downregulates TNF-alpha and IL-6 expression in cultured placental cells from preeclamptic women.** *Cytokine* 2012, **61**(1):245-250.
 59. Peleg S, Qiu H, Reddy S, Harris D, Van Q, Estey EH, Talpaz M, Estrov Z: **1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and its analogues inhibit acute myelogenous leukemia progenitor proliferation by suppressing interleukin-1beta production.** *J Clin Invest* 1997, **100**(7):1716-1724.
 60. Garcia-Becerra R, Diaz L, Camacho J, Barrera D, Ordaz-Rosado D, Morales A, Ortiz CS, Avila E, Bargallo E, Arrecillas M *et al*: **Calcitriol inhibits Ether-a go-go potassium channel expression and cell proliferation in human breast cancer cells.** *Exp Cell Res* 2009, **316**(3):433-442.
 61. Garcia-Quiroz J, Garcia-Becerra R, Barrera D, Santos N, Avila E, Ordaz-Rosado D, Rivas-Suarez M, Halhali A, Rodriguez P, Gamboa-Dominguez A *et al*: **Astemizole synergizes calcitriol antiproliferative activity by inhibiting CYP24A1 and upregulating VDR: a novel approach for breast cancer therapy.** *PLoS One* 2012, **7**(9):e45063.
 62. Janowsky EC, Lester GE, Weinberg CR, Millikan RC, Schildkraut JM, Garrett PA, Hulka BS: **Association between low levels of 1,25-dihydroxyvitamin D and breast cancer risk.** *Public Health Nutr* 1999, **2**(3):283-291.
 63. Mawer EB, Walls J, Howell A, Davies M, Ratcliffe WA, Bundred NJ: **Serum 1,25-dihydroxyvitamin D may be related inversely to disease activity in breast**

- cancer patients with bone metastases. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, **82**(1):118-122.
64. Wu Y, Sarkissyan M, Clayton S, Chlebowski R, Vadgama JV: **Association of Vitamin D3 Level with Breast Cancer Risk and Prognosis in African-American and Hispanic Women.** *Cancers* 2017, **9**(10).
 65. Yao S, Ambrosone CB: **Associations between vitamin D deficiency and risk of aggressive breast cancer in African-American women.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013, **136**:337-341.
 66. Richards SE, Weierstahl KA, Kelts JL: **Vitamin D Effect on Growth and Vitamin D Metabolizing Enzymes in Triple-negative Breast Cancer.** *Anticancer Research* 2015, **35**(2):805-810.
 67. Beer TM: **Development of weekly high-dose calcitriol based therapy for prostate cancer.** *Urol Oncol* 2003, **21**(5):399-405.
 68. Sookprasert A, Pugkhem A, Khuntikeo N, Chur-in S, Chamadol N, Prawan A, Janeklang S, Vaeteewoottacharn K, Kukongviriyapan V, Pairojkul C *et al*: **Evaluation of efficacy, safety and tolerability of high dose-intermittent calcitriol supplementation to advanced intrahepatic cholangiocarcinoma patients--a pilot study.** *Asian Pac J Cancer Prev* 2012, **13** Suppl:161-167.
 69. Hansen CM, Maenpaa PH: **EB 1089, a novel vitamin D analog with strong antiproliferative and differentiation-inducing effects on target cells.** *Biochem Pharmacol* 1997, **54**(11):1173-1179.
 70. Pirianov G, Colston KW: **Interactions of vitamin D analogue CB1093, TNFalpha and ceramide on breast cancer cell apoptosis.** *Mol Cell Endocrinol* 2001, **172**(1-2):69-78.
 71. Ben-Eltriki M, Deb S, Guns ES: **Calcitriol in Combination Therapy for Prostate Cancer: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Interactions.** *Journal of Cancer* 2016, **7**(4):391-407.
 72. Findlay VJ, Moretz RE, Wang C, Vaena SG, Bandurraga SG, Ashenafi M, Marshall DT, Watson DK, Camp ER: **Slug expression inhibits calcitriol-mediated sensitivity to radiation in colorectal cancer.** *Molecular carcinogenesis* 2014, **53** Suppl 1:E130-139.
 73. Santos-Martinez N, Diaz L, Ordaz-Rosado D, Garcia-Quiroz J, Barrera D, Avila E, Halhali A, Medina-Franco H, Ibarra-Sanchez MJ, Esparza-Lopez J *et al*: **Calcitriol restores antiestrogen responsiveness in estrogen receptor negative breast cancer cells: a potential new therapeutic approach.** *BMC cancer* 2014, **14**:230.
 74. Segovia-Mendoza M, Diaz L, Gonzalez-Gonzalez ME, Martinez-Reza I, Garcia-Quiroz J, Prado-Garcia H, Ibarra-Sanchez MJ, Esparza-Lopez J, Larrea F, Garcia-Becerra R: **Calcitriol and its analogues enhance the antiproliferative activity of gefitinib in breast cancer cells.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015, **148**:122-131.
 75. Segovia-Mendoza M, Diaz L, Prado-Garcia H, Reginato MJ, Larrea F, Garcia-Becerra R: **The addition of calcitriol or its synthetic analog EB1089 to lapatinib and neratinib treatment inhibits cell growth and promotes apoptosis in breast cancer cells.** *Am J Cancer Res* 2017, **7**(7):1486-1500.
 76. Camp RL, Dolled-Filhart M, Rimm DL: **X-tile: a new bio-informatics tool for biomarker assessment and outcome-based cut-point optimization.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(21):7252-7259.
 77. Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Gyorffy B, Schmitt WD, Darb-Esfahani S, Denkert C: **Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web**

- application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One* 2012, **7**(12):e51862.
78. Wu Y, Sarkissyan M, Clayton S, Chlebowski R, Vadgama JV: **Association of Vitamin D3 Level with Breast Cancer Risk and Prognosis in African-American and Hispanic Women.** *Cancers* 2017, **9**(10).
79. Dionne S, Calderon MR, White JH, Memari B, Elimrani I, Adelson B, Piccirillo C, Seidman EG: **Differential effect of vitamin D on NOD2- and TLR-induced cytokines in Crohn's disease.** *Mucosal immunology* 2014, **7**(6):1405-1415.
80. Tulk SE, Liao KC, Muruve DA, Li Y, Beck PL, MacDonald JA: **Vitamin D(3) metabolites enhance the NLRP3-dependent secretion of IL-1beta from human THP-1 monocytic cells.** *Journal of cellular biochemistry* 2015, **116**(5):711-720.
81. Martínez-Reza I DL, García-Becerra R: **Preclinical and clinical aspects of TNF- α and its receptors TNFR1 and TNFR2 in breast cancer.** *J Biomed Sci* 2017.
82. Matsumoto H, Koo SL, Dent R, Tan PH, Iqbal J: **Role of inflammatory infiltrates in triple negative breast cancer.** *Journal of clinical pathology* 2015, **68**(7):506-510.
83. Shen WH, Zhou JH, Broussard SR, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW: **Proinflammatory cytokines block growth of breast cancer cells by impairing signals from a growth factor receptor.** *Cancer research* 2002, **62**(16):4746-4756.
84. Wu TC, Xu K, Martinek J, Young RR, Banchereau R, George J, Turner J, Kim KI, Zurawski S, Wang X *et al*: **IL1 Receptor Antagonist Controls Transcriptional Signature of Inflammation in Patients with Metastatic Breast Cancer.** *Cancer research* 2018, **78**(18):5243-5258.
85. Segovia-Mendoza M, Diaz L, Prado-Garcia H, Reginato MJ, Larrea F, Garcia-Becerra R: **The addition of calcitriol or its synthetic analog EB1089 to lapatinib and neratinib treatment inhibits cell growth and promotes apoptosis in breast cancer cells.** *American journal of cancer research* 2017, **7**(7):1486-1500.
86. Lehmann BD, Pietenpol JA: **Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes.** *The Journal of pathology* 2014, **232**(2):142-150.
87. Chao G, Tian X, Zhang W, Ou X, Cong F, Song T: **Blocking Smad2 signalling with loganin attenuates SW10 cell cycle arrest induced by TNF-alpha.** *PloS one* 2017, **12**(5):e0176965.
88. Peng W, Wang K, Zheng R, Derwahl M: **1,25 dihydroxyvitamin D3 inhibits the proliferation of thyroid cancer stem-like cells via cell cycle arrest.** *Endocrine research* 2016, **41**(2):71-80.
89. Sheng Y, Li F, Qin Z: **TNF Receptor 2 Makes Tumor Necrosis Factor a Friend of Tumors.** *Frontiers in immunology* 2018, **9**:1170.
90. Goel R, Swanlund D, Coad J, Paciotti GF, Bischof JC: **TNF-alpha-based accentuation in cryoinjury--dose, delivery, and response.** *Mol Cancer Ther* 2007, **6**(7):2039-2047.
91. Koonce NA, Quick CM, Hardee ME, Jamshidi-Parsian A, Dent JA, Paciotti GF, Nedosekin D, Dings RP, Griffin RJ: **Combination of Gold Nanoparticle-Conjugated Tumor Necrosis Factor-alpha and Radiation Therapy Results in a Synergistic Antitumor Response in Murine Carcinoma Models.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2015, **93**(3):588-596.

ANEXO 1

Los efectos antiproliferativos del calcitriol mediante IL-1 β y TNF- α no se llevan a cabo a través de los IL-1R2 ni TNFR2, respectivamente

Se realizaron ensayos de proliferación en presencia de calcitriol, IL-1 β , TNF- α , anticuerpos contra los receptores de IL-1 β y TNF- α , así como la combinación de calcitriol o las citocinas con los anticuerpos. IL-1 β y el TNF- α inhibieron la proliferación como ya se había observado (ver Figura 12). La presencia de los anticuerpos anti-IL-1 β o anti-IL-1R2 solos o combinados con calcitriol no modificaron la proliferación. En las células tratadas con calcitriol y anti-TNFR2, la presencia del anticuerpo tiende a revertir el efecto inhibitorio de calcitriol, sin embargo, el efecto no fue significativo y el anti-TNF- α no mostró efectos.

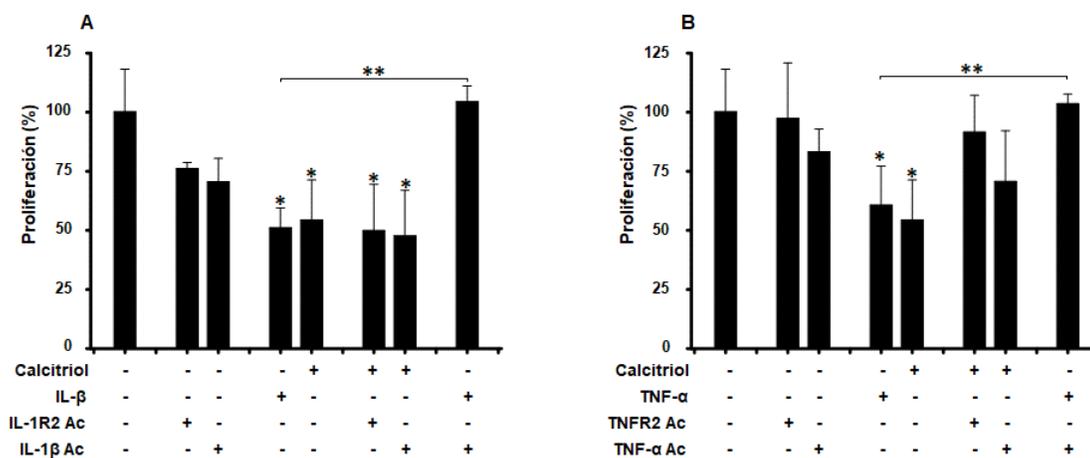


Figura 12. Los anticuerpos anti IL-1R2 y TNFR2 no modificaron la proliferación celular solos ni en combinación con calcitriol. Las células SUM-229PE se trataron con calcitriol (10 nM), anti-IL-1R2 (5 ng / ml), anti IL-1 β (50 ng / ml), y anti-TNFR2 (2 ng / ml), anti TNF- α (5 ng / ml),) individualmente o combinados. Los resultados representan el promedio de 3 experimentos, cada uno por triplicado \pm S.D. * p <0.05 vs células no tratadas y ** p <0.05 vs una sola molécula. Anticuerpo anti IL-1R2 (IL-1R2 Ac). Anticuerpo anti IL-1 β (IL-1 β Ac). Anticuerpo anti TNFR2 (TNFR2 Ac). Anticuerpo anti TNF- α (TNF- α).

Efecto de la combinación de diferentes concentraciones calcitriol con TNF- α en células de cáncer de mama

Diferentes concentraciones de calcitriol fueron probadas en combinación con 5 ng/mL de TNF- α . Como se había observado previamente, el calcitriol 10 nM y el TNF- α inducían inhibición en la proliferación de células SUM-229PE, sin embargo, la combinación de las moléculas utilizando calcitriol 1 y 10 nM con TNF- α , no modificó el efecto de las moléculas por separado (ver Figura 14^a). Por otro lado, el tratamiento simultáneo con calcitriol (1nM) y TNF- α indujo inhibición significativa del crecimiento celular en comparación con los compuestos solos en células HCC1806 (Figura 13B) y MCF7 (Figura 13C).

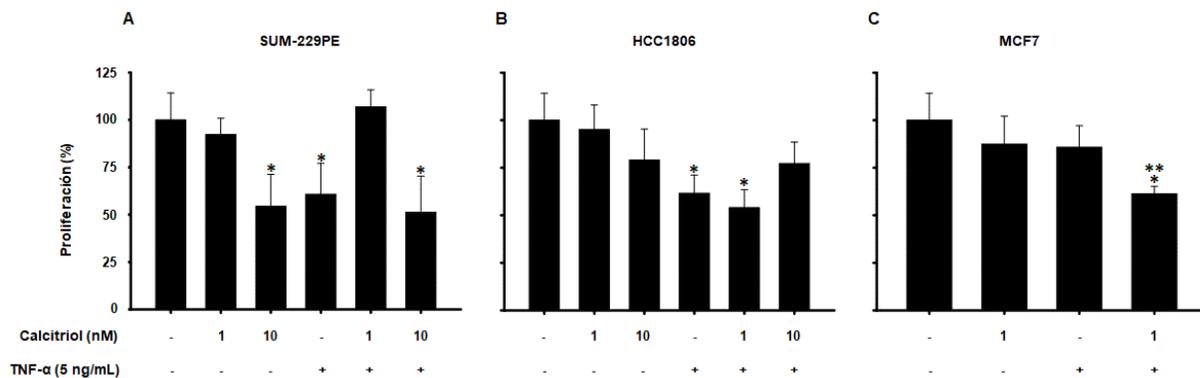


Figura 13 Efecto de la combinación de diferentes concentraciones de calcitriol con TNF- α en la proliferación de células de cáncer de mama. El calcitriol se usó a las concentraciones de 0,1 y 10 nM para las células SUM-229PE y HCC1806 y sólo la concentración 1 nM para las células MCF7. TNF- α se usó a una concentración de 5 ng/ml para las 3 líneas celulares. Los datos de las células no tratadas (-) se normalizaron al 100%. Los resultados representan el promedio de 3 experimentos, cada uno por triplicado \pm S.D. * $p < 0.05$ vs vehículo y ** $p < 0.05$ vs las moléculas solas.

La combinación de calcitriol con IL-1 β disminuyó la proliferación en la línea celular MCF7.

Diferentes concentraciones de calcitriol o IL-1 β fueron probadas en combinación en las células de cáncer de mama. Las células SUM-229PE y las células HCC1806 fueron tratadas con calcitriol 1 y 10 nM y a su vez en combinación con 0.5 ng/mL de IL-1 β ; en ambos casos la combinación de dichos compuestos no modificaron la proliferación celular con respecto a las moléculas por separado. Por otro lado, las células MCF7 fueron tratadas una concentración de calcitriol (10 nM) combinado con 5 y 10 ng/ml de IL-1 β , en ambos casos la combinación de los compuestos indujo inhibición significativa en la proliferación celular con respecto a los compuestos solos.

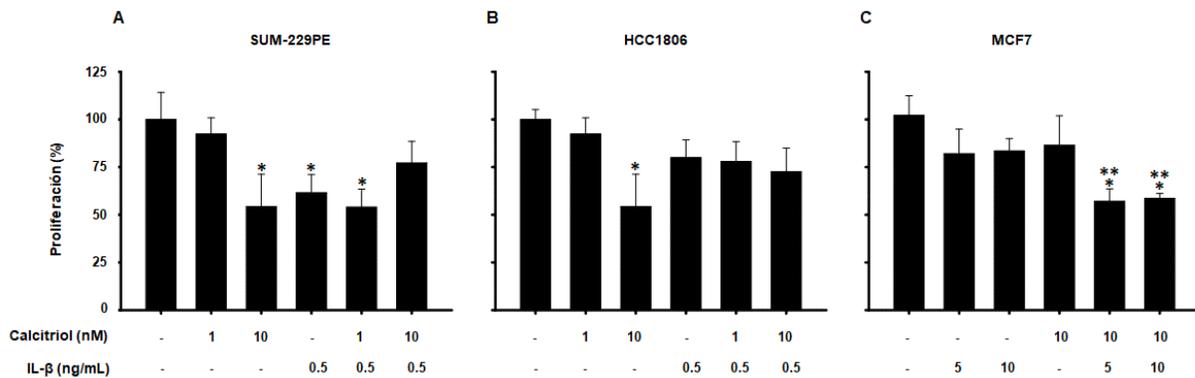


Figura 14. Efecto de la combinación de calcitriol con IL-1 β en la proliferación de células de cáncer de mama. Los datos de las células no tratadas se normalizaron al 100%. Los resultados representan el promedio de 3 experimentos, cada uno por triplicado \pm S.D. * $p < 0.05$ vs vehículo y ** $p < 0.05$ vs las moléculas solas.

ANEXO 2

Contribución científica generada durante la realización del Doctorado en Ciencias Biomédicas.

- **Martínez-Reza I**, Díaz L, Barrera D, Segovia-Mendoza M, Pedraza-Sánchez S, Soca-Chafre G, Larrea F, García-Becerra R. *Calcitriol Inhibits the Proliferation of Triple-Negative Breast Cancer Cells through a Mechanism Involving the Proinflammatory Cytokines IL-1 β and TNF- α* . J Immunol Res. 2019. Volume 2019, Article ID 6384278, Collection 2019.
- **Martínez-Reza I**, Díaz L, García-Becerra R. *Preclinical and clinical aspects of TNF- α and its receptors TNFR1 and TNFR2 in breast cancer*. J Biomed Sci. 2017 Dec 4; 24 (1):90. Review.