

PROCOLO CINVA- BRE-1291-14/171

**“INFLUENCIA DEL CONSUMO DE ALCOHOL
SOBRE EL METABOLISMO DE LA
VITAMINA D Y SU IMPACTO EN EL DESARROLLO
DE CÁNCER DE MAMA”**

INVESTIGADOR: DRA. LORENZA DÍAZ NIETO

DEPARTAMENTO: BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F. a 8 de abril de 2017

Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de
Investigación en Animales (CINVA)

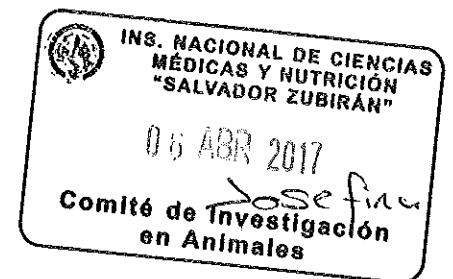
PRESENTE

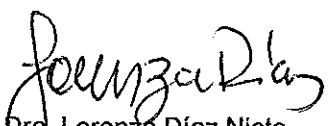
Estimada Dra. Bobadilla:

Anexo a la presente le hago llegar el informe técnico final del proyecto de investigación a mi cargo titulado: *"Influencia del consumo de alcohol sobre el metabolismo de la vitamina D y su impacto en el desarrollo del cáncer de mama"*, con No. de registro CIIBH: BRE-1291-14/17-1 y CINVA 1291. Adjunto también encontrará los comprobantes que lo avalan, incluyendo el artículo publicado.

Sin más por el momento aprovecho para enviarle un cordial saludo y agradezco enormemente las facilidades brindadas por la CINVA y el Bioterio del Instituto para la realización de éste proyecto de investigación.

Atentamente:




Dra. Lorenza Díaz Nieto
Investigador en Ciencias Médicas E, SNI 3
Departamento de Biología de la Reproducción

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Dominguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

Informe Técnico Final del proyecto:

Influencia del consumo de alcohol sobre el metabolismo de la vitamina D y su impacto en el desarrollo del cáncer de mama

Responsable técnico: Dra. Lorenza Díaz Nieto

A continuación se destacan los logros del proyecto de investigación titulado: "*Influencia del consumo de alcohol sobre el metabolismo de la vitamina D y su impacto en el desarrollo del cáncer de mama*", con No. de registro CIIBH: BRE-1291-14/17-1 y CINVA 1291.

I. Formación de Recursos Humanos

La Dra. Janice García Quiroz, quien fue el investigador beneficiado de la convocatoria de Retención en cuyo marco se desarrolló este proyecto, logró su incorporación al S.N.I. el 1 de septiembre del 2014. El Sistema Nacional de Investigadores otorgó a la Dra. Janice García Quiroz la distinción de CANDIDATO A INVESTIGADOR NACIONAL, durante el período del 1 de enero de 2015 al 31 de Diciembre de 2017. Se anexa constancia.

Además, la realización de este proyecto permitió cumplir con el principal objetivo de la convocatoria de Retención, que fue el incorporar al investigador beneficiado a la plantilla académica de la institución. A este respecto, el 27 de abril del 2015, la Comisión Externa de Investigación en Salud dictaminó el ingreso de la Dra. Janice García Quiroz como Investigador en Ciencias Médicas "C" adscrita al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Con base en lo anterior, el 1 de Junio del 2015, el investigador apoyado firmó el contrato de prestación de servicios con el Instituto. Se anexa constancia.

El 29 de abril del 2016 se graduó a la alumna Galia Lara Sotelo en la Licenciatura en Nutrición de la Escuela de Nutrición de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Galia participó activamente en todas las actividades relacionadas con este proyecto. El título de su tesis fue: "*Influencia del consumo del alcohol sobre el metabolismo de la vitamina D y su impacto en el desarrollo del cáncer de mama*". Se anexa comprobante.

II. Artículos publicados

Con los resultados obtenidos en el proyecto, se logró la publicación del siguiente artículo:

García-Quiroz J, García-Becerra R, Lara-Sotelo G, Avila E, López S, Santos-Martínez N, Halhali A, Ordaz-Rosado D, Barrera D, Olmos-Ortiz A, Ibarra-Sánchez MJ, Esparza-López J, Larrea F, Díaz L. "*Chronic moderate ethanol intake differentially regulates vitamin D hydroxylases gene expression in kidneys and xenografted breast cancer cells in female mice*". J Steroid Biochem Mol Biol (2017) En prensa. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.09.011>

III. Congresos

Con los resultados de este proyecto, participamos en los siguientes congresos con los trabajos indicados:

1) 2014. Conferencia "*Hablando de cáncer*". Puebla de Zaragoza, México. "*Nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer de mama*" Janice García Quiroz.

2) 2016: 4o. Congreso Mexicano de Nutriología. Ciudad de México, México. "*Influencia del consumo de alcohol sobre la función oncoprotectora de la vitamina D en un modelo murino de*

cáncer de mama" Lara-Sotelo G, García-Quiroz J, García-Becerra R, Avila E, López S, Zárate-Pérez A, Ordaz-Rosado D, Larrea F, Díaz L.

3) 2016: 18th Workshop on Vitamin D. Boston, MA, EUA. "Moderate chronic ethanol consumption stimulates the gene expression of CYP24A1 in xenografted human breast cancer cells while inhibits renal CYP27B1 in mice". García-Quiróz J, García-Becerra R, Avila E, Lara-Sotelo G, López S, Santos-Martínez N, Ordaz-Rosado D, Barrera D, Ibarra-Sánchez MJ, Esparza-López J, Halhali A, Larrea F, Díaz L.

IV. IV. Resultados obtenidos

Las metas y objetivos que nos planteamos para el desarrollo del proyecto fueron las siguientes:

El principal objetivo de nuestro trabajo consistió en conocer si el etanol afecta el metabolismo de la vitamina D (VD) en células de cáncer de mama modificando la expresión de CYP27B1 y CYP24A1 *in vitro* e *in vivo*. Por ello, evaluamos el efecto de distintas concentraciones de etanol en presencia y ausencia de 25OHD3 sobre la expresión de las enzimas involucradas en el metabolismo y catabolismo de la VD (CYP27B1 y CYP24A1, respectivamente). Utilizamos células que representan distintos subtipos de cáncer de mama: D5 (triple negativo), SUM-229PE (HER-2neu) y MCF-7 (receptor de estrógenos positivas). Además, se determinó la presencia del receptor para la VD y/o funcionalidad del mismo en dichas células. Posteriormente se procedió a determinar la regulación de la expresión génica de CYP27B1 y CYP24A1 por el etanol mediante PCR en tiempo real. Si bien se realizaron varios experimentos en las tres líneas celulares, dada la gran variabilidad de la respuesta aún es necesario incrementar la N para poder concluir adecuadamente. Sin embargo, en lo que concierne a los estudios *in vivo*, si encontramos diferencias estadísticamente significativas. En particular, en lo que respecta a la masa tumoral, encontramos que el etanol incrementó significativamente la expresión de CYP24A1, mientras que no afectó la de CYP27B1. Esto indica que el tumor de los ratones expuestos al consumo crónico de etanol degrada más rápidamente el calcitriol, y en consecuencia los efectos benéficos de esta hormona en la protección contra el cáncer pueden disminuir. Interesantemente, al evaluar en el tumor un marcador regulado transcripcionalmente por el calcitriol, la catelicidina, encontramos por Western blot que esta proteína está disminuida en el grupo tratado con etanol, lo cual apoya nuestros resultados discutidos previamente.

Por otro lado, a nivel del riñón, se observaron resultados similares en cuanto a CYP24A1: el etanol incrementó significativamente su expresión génica. Además, el consumo de etanol provocó la disminución en la expresión de CYP27B1 renal. Estos resultados están de acuerdo con nuestra hipótesis y sugieren fuertemente que el consumo crónico y moderado de etanol disminuye la bioconversión de 25OHD3 en calcitriol, mientras que incrementa su catabolismo. Así, esto se reflejaría en menores concentraciones de calcitriol bioactivo y de todos sus efectos antineoplásicos. En cuanto a la evaluación de la expresión de CYP3A4 hepática, no se encontraron cambios significativos con los tratamientos.

Además, se evaluó la tumorigenicidad de las células D5, SUM-229PE y MCF-7. Con base en lo anterior se determinó que D5 es tumorigénica, la cual generó tumor aproximadamente 2 semanas posteriores al xenoinjerto (2 millones de células). SUM-229PE, solo generó tumores al ser injertada en presencia de matrigel, lo cual no es viable para los objetivos de este proyecto. En lo que respecta a MCF-7, se hizo el seguimiento hasta dos meses después de haberla injertado (3 millones de células) y no generó tumor. En consecuencia, utilizamos D5 para los estudios *in vivo*.

Otro de los objetivos principales de este trabajo fue el estudiar el posible efecto adverso del consumo crónico de alcohol sobre la actividad protectora de la 25OHD3 en el cáncer mamario *in vivo*, mediante la evaluación del desarrollo tumoral en un modelo murino. Al respecto, se realizaron 5 experimentos *in vivo* y los resultados fueron los siguientes:

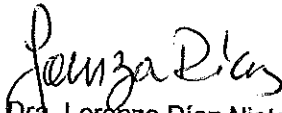
En los ratones expuestos al consumo crónico de alcohol durante un mes, se observó mayor número de tumores, mismos que aparecieron más temprano con respecto a los demás grupos. Interesantemente, la administración de 25OHD3 contrarrestó significativamente los efectos del etanol en la tumorigénesis. En efecto, en cuanto al volumen tumoral, el consumo de etanol resultó en la generación de tumores más grandes, en comparación con los controles y el grupo de 25OHD3. Sin embargo, cuando se co-administró el etanol y la 25OHD3, los volúmenes tumorales fueron similares al control. Esto destaca el papel protector de la 25OHD3 en el cáncer de mama, ya que retardó el crecimiento acelerado propiciado por el consumo de etanol en los tumores.

Por otro lado, se evaluaron los niveles séricos de 25OHD3, calcio y calcitriol en los diferentes grupos experimentales en el modelo murino. Con respecto a la 25OHD3, la administración de etanol no resultó en cambios significativos en las concentraciones de este metabolito, ni en los grupos tratados con 25OHD3 ni en los controles. La concentración del calcio total fue significativamente mayor en el grupo tratado con 25OHD3 al compararla con los grupos no tratados con este nutrimento. Acorde a lo esperado, la calcemia se asoció de manera significativa con la concentración de 25OHD3. Cabe mencionar que el tratamiento con 25OHD3 no generó hipercalcemia.

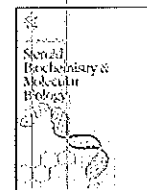
Además, estudiamos la expresión del marcador de proliferación Ki-67 en los tumores de los diferentes grupos experimentales. El consumo de etanol en algunos casos incrementó significativamente la expresión del marcador de proliferación Ki-67, lo cual sugiere que el etanol incrementa la tasa de crecimiento tumoral.

Se anexa la publicación generada con los resultados aquí descritos.

Atentamente



Dra. Lorenza Díaz Nieto
Investigadora en Ciencias Médicas E, SNI 3
Departamento de Biología de la Reproducción



Chronic moderate ethanol intake differentially regulates vitamin D hydroxylases gene expression in kidneys and xenografted breast cancer cells in female mice

Janice García-Quiroz^a, Rocío García-Becerra^a, Galia Lara-Sotelo^a, Euclides Avila^a,
Sofía López^a, Nancy Santos-Martínez^a, Ali Halhali^a, David Ordaz-Rosado^a,
David Barrera^a, Andrea Olmos-Ortiz^a, María J. Ibarra-Sánchez^b, José Esparza-López^b,
Fernando Larrea^a, Lorenza Díaz^{a,*}

^a Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Avenida Vasco de Quiroga No. 15, Col. Belisario Domínguez Sección XVI, C.P. 14080, Ciudad de México, Mexico

^b Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Avenida Vasco de Quiroga No. 15, Col. Belisario Domínguez Sección XVI, C.P. 14080, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2016
Received in revised form 12 August 2016
Accepted 12 September 2016
Available online xxx

Keywords:

Alcohol
Vitamin D metabolism
Calcitriol
Breast cancer

ABSTRACT

Factors affecting vitamin D metabolism may preclude anti-carcinogenic effects of its active metabolite calcitriol. Chronic ethanol consumption is an etiological factor for breast cancer that affects vitamin D metabolism; however, the mechanisms underlying this causal association have not been fully clarified. Using a murine model, we examined the effects of chronic moderate ethanol intake on tumoral and renal *CYP27B1* and *CYP24A1* gene expression, the enzymes involved in calcitriol synthesis and inactivation, respectively. Ethanol (5% w/v) was administered to 25-hydroxyvitamin D₃-treated or control mice during one month. Afterwards, human breast cancer cells were xenografted and treatments continued another month. Ethanol intake decreased renal *Cyp27b1* while increased tumoral *CYP24A1* gene expression. Treatment with 25-hydroxyvitamin D₃ significantly stimulated *CYP27B1* in tumors of non-alcohol-drinking mice, while increased both renal and tumoral *CYP24A1*. Coadministration of ethanol and 25-hydroxyvitamin D₃ reduced in 60% renal 25-hydroxyvitamin D₃-dependent *Cyp24a1* upregulation ($P < 0.05$). We found 5 folds higher basal *Cyp27b1* than *Cyp24a1* gene expression in kidneys, whereas this relation was inverted in tumors, showing 5 folds more *CYP24A1* than *CYP27B1*. Tumor expression of the calcitriol target cathelicidin increased only in 25-hydroxyvitamin D₃-treated non-ethanol drinking animals ($P < 0.05$). Mean final body weight was higher in 25-hydroxyvitamin D₃ treated groups ($P < 0.001$). Overall, these results suggest that moderate ethanol intake decreases renal and tumoral 25-hydroxyvitamin D₃ bioconversion into calcitriol, while favors degradation of both vitamin D metabolites in breast cancer cells. The latter may partially explain why alcohol consumption is associated with vitamin D deficiency and increased breast cancer risk and progression.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Breast cancer is the leading cause of cancer death among women worldwide and its incidence is still increasing. For this reason, identifying preventable risk factors is a priority for public health intervention. Amongst known risk factors, chronic ethanol intake stands as an important and modifiable etiological factor in

the development and progression of breast cancer. In general, calculated percentage of alcohol-attributable breast cancer cases ranges between 5 and 9.4% [1–3]. In addition, for each additional 10g alcohol (1 standard drink) per day, breast cancer risk is estimated to increase around 7% [4–6] and even moderate low levels of alcohol consumption (5.0–9.9 g/d) have been associated with a small rise in breast cancer risk [7]. Likewise, ethanol administration to female mice (10–15% ethanol in the drinking water) during 25 months induced spontaneous mammary tumors in almost half the number of ethanol-drinking mice, while no tumors were found in the control group [8]. A number of

* Corresponding author.

E-mail address: lorenzadiaz@gmail.com (L. Díaz).

hypotheses have been raised in the literature to explain how alcohol increases breast cancer risk and tumor progression. For instance, ethanol impairs natural killer cells tumoricidal ability and activates estrogen related cell proliferation [9,10]. In addition, some alcohol metabolites such as acetaldehyde and oxygen reactive species are potentially carcinogenic [11]. In the present study, we aimed at identifying another potential mechanism that may help to explain the association between alcohol consumption and breast cancer. Given that high rates of incidence, relapse and mortality of breast cancer have been associated with vitamin D deficiency [12–14], we hypothesized that alcohol consumption could interfere with vitamin D metabolism in breast tumor cells, lowering production of the vitamin D active metabolite calcitriol and thus, preventing its local anti-carcinogenic effects. Indeed, vitamin D has become increasingly relevant in the oncological field due to the well-known calcitriol antineoplastic properties. Particularly in normal mammary epithelial cells, calcitriol mediates growth inhibition and terminal differentiation [15], while in malignant cells calcitriol interferes in almost every step of breast carcinogenesis and tumor progression by regulating the expression of genes involved in development and progression of breast cancer [16–18]. Endogenous calcitriol antitumorogenic effects take place in mammary epithelial cells given that all components of the vitamin D endocrine system are expressed in these cells. This includes the enzymes involved in vitamin D metabolism and the vitamin D receptor (VDR) [15]. Calcitriol is produced from 25-hydroxyvitamin D₃ (25OHD₃) after hydroxylation of its carbon-1 by the enzyme 25OHD₃-1 α -hydroxylase (CYP27B1). While the biological actions of calcitriol are mediated by the VDR, its bioavailability is decreased by the enzyme 1,25-dihydroxyvitamin D₃-24 hydroxylase (CYP24A1), which rapidly inactivates this metabolite. Of note, CYP24A1 may also hydroxylate 25OHD₃, thus lowering availability of the substrate for CYP27B1 activity, and consequently, reducing calcitriol production [19,20]. Our hypothesis was conceived on the basis of previous studies showing that alcoholic subjects have reduced 25OHD₃ and calcitriol serum concentrations and frequently suffer from alterations in calcium homeostasis [21,22]. Supporting the latter, animal models have shown that ethanol intake interferes with renal vitamin D metabolism [23–25]. However, to date there are no studies analyzing the regulation of CYP27B1 and CYP24A1 gene expression by moderate ethanol consumption in human breast cancer cells. Therefore, herein we investigated the latter in a murine model of chronic alcohol intake. Also, we studied the regulatory effect of ethanol consumption in intracrine vitamin D metabolism in xenografted breast cancer cells by analyzing calcitriol known transcriptional targets involved in angiogenesis and carcinogenesis. The results presented herein could provide partial mechanistic insights into causal relationships between chronic alcohol consumption and increased breast cancer risk, development and progression.

2. Material and methods

2.1. Reagents

Calcidiol (25-hydroxyvitamin D₃, 25OHD₃) was purchased from Sigma-Aldrich (MO, USA) and was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). Ethanol was obtained from Herschi Trading (Mexico City, Mexico). Cell culture medium, fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, and Trizol were obtained from Invitrogen Life Technologies (NY, USA). The oligonucleotides for real time polymerase chain reaction (qPCR) were from Integrated DNA Technologies (IO, USA). The reverse transcription (RT) system, TaqMan master reaction, TaqMan probes, and PCR microplates were from Roche Applied Science (IN, USA).

2.2. Characterization of cells by immunocytochemistry

The primary cell culture (MBCDF-D5 cells) was generated from a biopsy obtained from a female Mexican patient with invasive ductal breast carcinoma. The protocol was approved by the Human Research and Ethics Committee from the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán at Mexico City (Ref 1549, BQO- 008-06/9-1) and written informed consent was obtained from the patient. Cells were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 100 units/ml penicillin plus 100 μ g/ml streptomycin and 5% heat-inactivated FBS in humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C.

Cultured cells were grown on glass coverslips and fixated in 96% ethanol. Antigen retrieval was achieved by autoclaving in immuno/DNA retriever with EDTA (BioSB, CA, USA) solution during 5 min. Slides were blocked with immunodetector peroxidase blocker (BioSB) and incubated with anti-estrogen receptor (ER α , 1:250, BioSB), anti-progesterone receptor (PR, 1:250, BioSB), anti-human epidermal growth factor receptor 1 (EGFR, 1:100, BioSB), anti-human epidermal growth factor receptor 2 (HER2, 1:100, Cell Signaling Technology, MA, USA), anti-VDR (1:100, Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA), anti-vimentin (VIM, 1:100, Santa Cruz) and anti-cytokeratin 7 (CK-7, 1:300, BioSB) during 1 h or 2 h for the anti-ether λ -go-go-1 potassium channel (KCNH1, 1:300, Novus Biologicals, CO, USA) antibody. After washing, the slides were sequentially incubated with immuno-Detector Biotin-Link and immunoDetector HRP label (BioSB) during 10 min each. Staining was completed with diaminobenzidine (DAB) and slides were counterstained with hematoxylin.

2.3. Therapeutic protocol and induction of tumors in athymic mice

Studies involving mice were performed according to the Official Mexican Norm 062- ZOO-1999. The study was approved by the Institutional Committee for the care and use of laboratory animals (protocol number BRE-1291-14/17-1, CINVA 1291) of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, where mice were housed in the animal facility. Athymic female BALB/c homozygous, inbred Crl:NU (NCR)-Foxn1nu nude mice (~6 weeks of age) were maintained in standard conditions. Sterilized water and feed (standard PMI 5053 feed) were given *ad libitum*. Animals were weighted and checked thrice per week in order to detect and alleviate any symptoms of pain. We carefully observed endpoints compatible with the scientific objectives of this work. Mice were randomly divided in 5 groups: 1) control, 2) ethanol (5% w/v, equivalent to approximately 12.5 g/day/kg in the drinking water), 3) vehicle (i.p. DMSO 17.5 μ L/100 μ L sterile saline solution), 4) 25OHD₃ (i.p. 350 μ g/kg/week in 100 μ L sterile saline solution), and 5) combined ethanol+25OHD₃. Of note, for 25OHD₃ dosing we administered the equivalent to 50 μ g/kg/day all in one single shot per week, in order to reduce manipulation and discomfort of mice. Regarding alcohol administration, each mouse is estimated to drink 5–7 mL of water per day [26], which was taken into consideration to calculate the amount of ethanol added to the drinking water. As reference, a moderate ethanol consuming regimen in mice has been suggested to be around 5–10% ethanol in drinking water daily [27–29]; while in humans 10 g ethanol/day, which is equivalent to 3–6 drinks per week [7]. Supplemented water was changed every day. Mice were exposed to treatments during one month prior to subcutaneous breast cancer cell injection (2.0 \times 10⁶ cells in 0.1 mL of sterile saline solution into the upper part of the posterior limb of each mouse) and were maintained on alcohol and 25OHD₃ treatments for another month after xenografting. Tumor dimensions were estimated three times per week with a caliper always by the same person. Tumor volume was calculated using the standard formula (length \times width²)/2,

where length is the largest dimension and width the smallest dimension perpendicular to the length. Relative tumor volume (RTV) was calculated for each tumor by dividing the tumor volume on the day of sacrifice by that on day 0 (which corresponded to the tumor volume at onset). Fold increase from initial volume was calculated subtracting 1 from RTV. Mice were euthanized 4 weeks after tumor cell injection and blood, tumors and kidneys were collected 14 h after the last 25OHD₃ dose.

2.4. Real time PCR (qPCR)

Total RNA was extracted by homogenizing tumor or renal tissue in the presence of Trizol reagent using the MagNA Lyser equipment (Roche) and 1.4-mm diameter ceramic beads. Two μ g of total RNA were reverse-transcribed and resulting cDNAs were used for the qPCR. Amplifications were carried out in the LightCycler[®] 480 II from Roche, according to the following protocol: activation of Taq

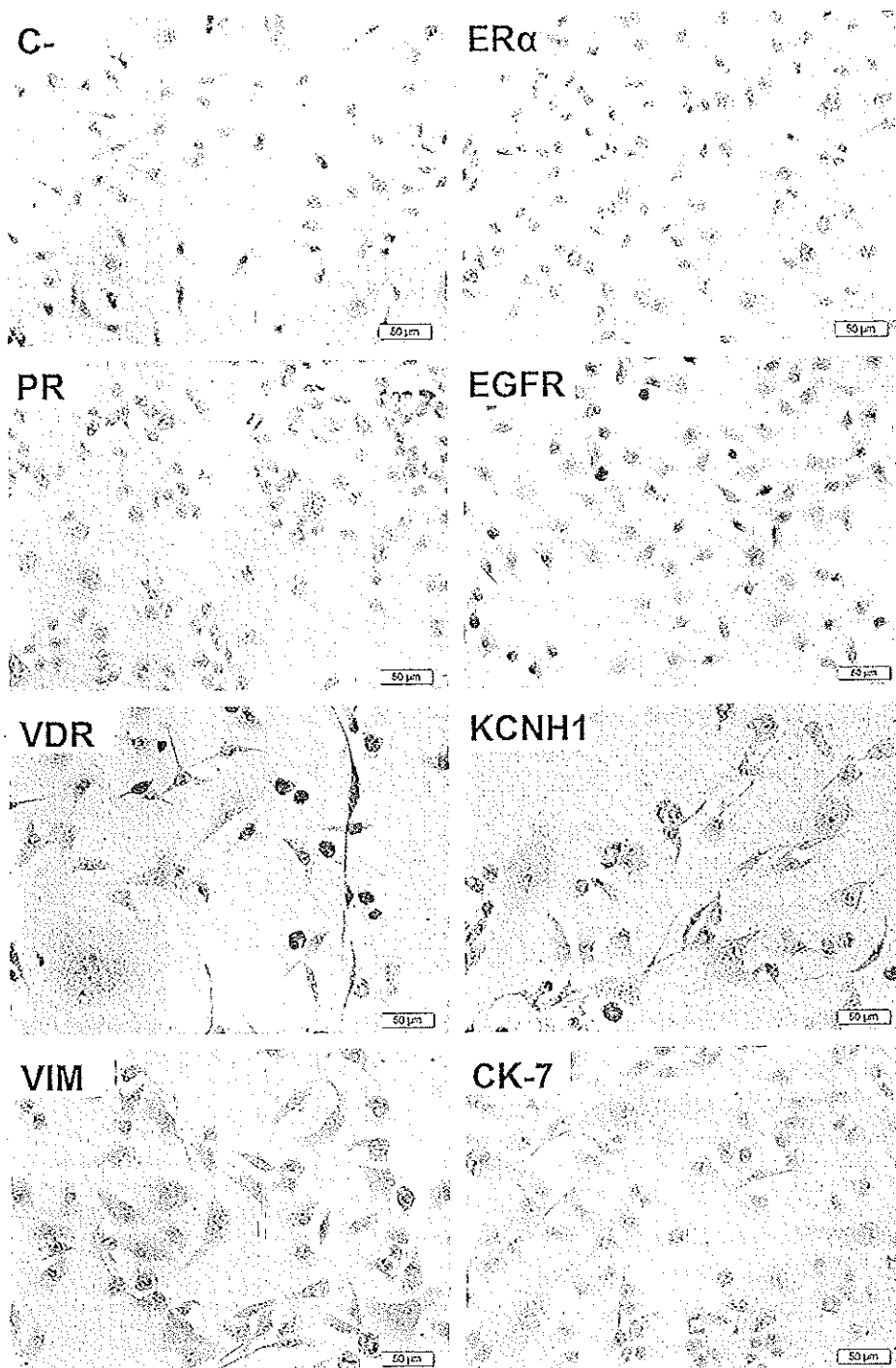


Fig. 1. Immunohistochemical characterization of cultured MBCDF-D5 cells. MBCDF-D5 cells were negative for estrogen receptor- α (ER α) and progesterone receptor (PR), while were positive (brown staining) for epidermal growth factor receptor 1 (EGFR), vitamin D receptor (VDR), ether λ -go-go-1 potassium channel (KCNH1), vimentin (VIM) and cytokeratin-7 (CK-7). Negative control (C-) was carried out in the absence of primary antibody. Representative images of cultured MBCDF-D5 cells are shown.

DNA polymerase and DNA denaturation at 95°C for 10 min, followed by 45 amplification cycles consisting of 10 s at 95°C, 30 s at 60°C, and 1 s at 72°C. The oligonucleotides pairs are shown in supplementary Table 1. In all cases gene expression was normalized against the housekeeping gene human β -actin (*ACTB*) or mouse β -actin (*Actb*), as corresponded.

2.5. Serum 25OHD₃ and calcium levels

Blood samples were obtained by cardiac puncture under anesthesia, causing exsanguination. Animal death was further guaranteed by cervical dislocation. The blood was centrifuged (3000 rpm/10 min) and serum samples of all mice in each experimental group were pooled and stored at -70°C until analysis. Experiments were repeated at least 4 times. Serum calcium and 25OHD₃ concentrations were determined in the institutional clinical laboratories by colorimetric reaction between calcium and Arsenazo III (Beckman Coulter 2700, Beckman Coulter Inc., CA, USA) and by the Architect immunoassay (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany), respectively.

2.6. Western blot

A piece of the excised tumors was homogenized in RIPA buffer (9.1 mM dibasic sodium phosphate, 1.7 mM monobasic sodium phosphate, 150 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, pH 7.4) in the presence of a protease inhibitor cocktail (Roche) using the MagNA Lyser equipment and ceramic beads. An equal amount of protein (55 micrograms) of tissue lysates was separated on 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blocked with 5% non-fat milk in TBS-Tween. Membranes were incubated with rabbit anti-VDR (Santa Cruz Biotechnology CA, C-20 sc-1008, 1:200) overnight at 4°C. As loading control, a monoclonal anti-GAPDH antibody was used (Millipore MA, MAB374, 1:8000). In the case of the cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP), the proteins were separated using the Tricine-SDS-PAGE protocol containing 10% and 16% polyacrylamide. These membranes were incubated with mouse anti-CAMP (Santa Cruz Biotechnology CA, sc-166770, 1:200) and as loading control, a goat polyclonal anti-ACTB-horseradish peroxidase (HRP, I-19 sc-1616-HRP Santa Cruz Biotechnology CA, 1:200). For visualization of CAMP, VDR and GAPDH, membranes were incubated with goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, sc-2031, 1:2000) or goat anti-rabbit IgG-HRP (BioRad, CA, 1706515, 1:8000), as corresponded. Afterwards membranes were processed with the ECL+Plus Western blotting detection system (GE Healthcare, UK). Densitometric analysis of bands was performed using the Molecular Imager ChemiDoc XRS System and the Image Lab Software (BioRad, CA, USA).

2.7. Statistical analysis

Statistical differences were determined by One-Way ANOVA followed by the Holm-Sidak test for pair-wise comparisons (SigmaStat, Jandel Scientific). Differences were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Cell characterization

MBCDF-D5 cells were negative for ER α and PR (Fig. 1). HER2 expression was not detected by immunocytochemistry but was found in low levels by Western blot (Esparza-López J. et al., unpublished data). In addition, cells moderately expressed CK-7 while presented high abundance of VIM, probably indicating

epithelial-to-mesenchymal transition. Also, EGFR, the oncogenic protein KCNH1 and the VDR were highly expressed by these cells (Fig. 1). Overexpression of KCNH1 may confer a growth advantage to cancer cells while favors tumor progression [30]. Due to VDR endogenous expression, it is possible that these tumor-derived cells are able to respond to calcitriol stimuli. Functionality of VDR in cultured MBCDF-D5 cells was further corroborated by studying *CYP24A1* gene expression in the presence of 10 nM calcitriol. This resulted in significant *CYP24A1* gene expression stimulation compared to control cells (Supplementary Fig. 1).

3.2. In vivo impact of chronic ethanol intake upon vitamin D-dependent effects

3.2.1. Chronic moderate ethanol intake differentially regulated *CYP27B1* and *CYP24A1* gene expression in mice kidneys and xenografted human breast cancer cells

In the kidneys, chronic ethanol intake significantly decreased renal *Cyp27b1* ($P < 0.05$) while a non-significant increase of *Cyp24a1* gene expression was observed compared to controls. On the other hand, 25OHD₃ had no effect upon *Cyp27b1* but significantly stimulated *Cyp24a1* gene expression. Interestingly, coadministration of ethanol and 25OHD₃ diminished in 60% renal 25OHD₃-dependent *Cyp24a1* upregulation ($P < 0.05$, Fig. 2A and B).

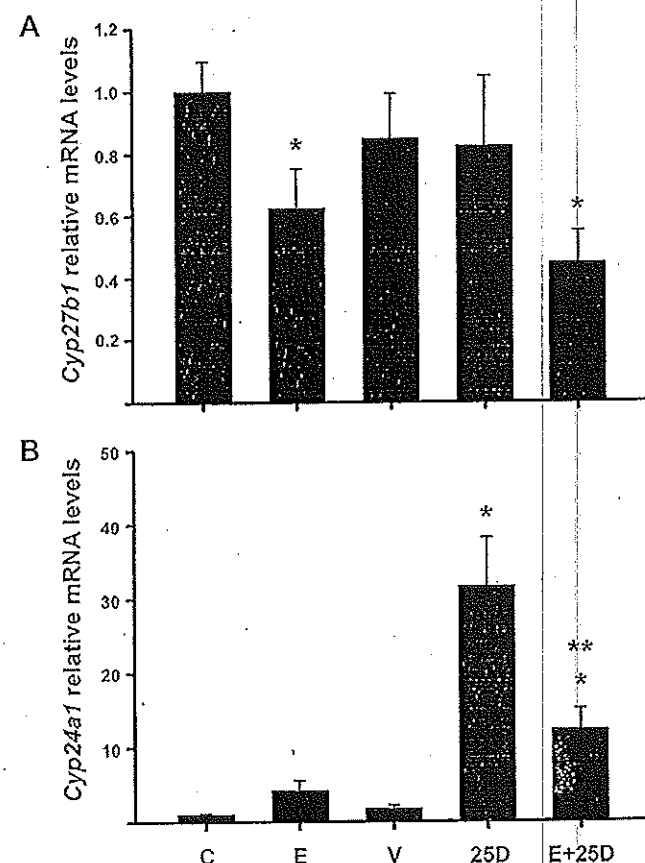


Fig. 2. Regulation of *Cyp27b1* and *Cyp24a1* gene expression in mice kidney. Mice were divided in the following groups: control (C), ethanol (E), vehicle (V), 25OHD₃ (25D), or combined E+25D. A) The gene expression of *Cyp27b1* was significantly downregulated by E, while 25D had no effect upon this gene. However, the coadministration of E+25D reduced *Cyp27b1* gene expression B) The gene expression of *Cyp24a1* was significantly upregulated by 25D, while its coadministration with E reduced this effect. Data are depicted as the mean \pm SEM. Results were normalized against *Actb* mRNA expression; control values were set to one. $N \geq 12$, * $P < 0.05$ vs C and V, ** $P < 0.05$ vs 25D.

In tumoral tissue, ethanol, 25OHD₃ and their combination increased tumoral *CYP24A1* in a similar manner, while *CYP27B1* gene expression was also stimulated by 25OHD₃ in non-ethanol-drinking mice (Fig. 3A and B). Since *CYP27B1* and *CYP24A1* ratio dictates whether 25OHD₃ will either be used for bioactive calcitriol production or will be inactivated, we evaluated the basal relative expression of the genes encoding for these two enzymes in tumors and kidneys. Of note, we found 5 folds higher basal *Cyp27b1* than *Cyp24a1* gene expression in kidneys, whereas this relation was inverted in MBCDF-D5 tumors, showing 5 folds more *CYP24A1* than *CYP27B1*. Renal tissue also showed significantly increased gene expression of both cytochromes when compared to xenografted breast cancer cells (Fig. 4).

3.2.2. Effects of endogenous calcitriol in the tumor mass

As a reflect of locally biosynthesized calcitriol, we studied known transcriptional targets of this secosteroid in order to get an insight into the effects of ethanol intake on 25OHD₃ metabolism and its consequences on tumor mass. For this, total RNA and protein were extracted from tumors. Selected genes were chosen based on their previously reported susceptibility to calcitriol regulation in breast cancer cells, and their involvement in pathways relevant for tumor progression. These genes were: *VEGFA*, *THBS1* and *KCNH1* [31–34]. The first two genes encode for vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1, a proangiogenic and antiangiogenic factor, respectively; while the

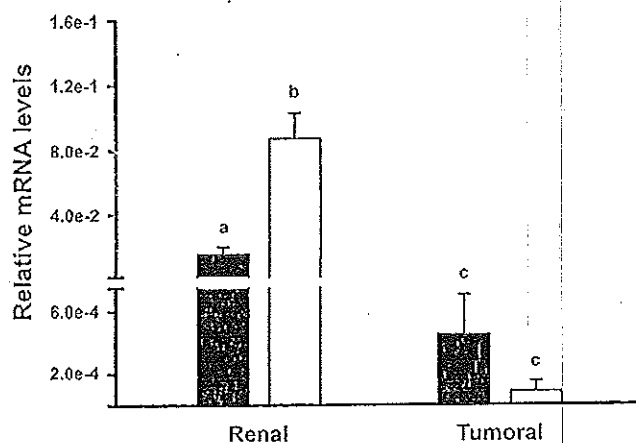


Fig. 4. Differential vitamin D cytochromes gene expression in renal and tumoral tissue. We evaluated the relative expression of *CYP27B1* and *CYP24A1* at renal and tumoral level. In the mice kidneys, the basal expression of *Cyp27b1* was ~5 folds higher than that of *Cyp24a1*, while this relation was inverted in MBCDF-D5 tumors, showing 5 folds more *CYP24A1* than *CYP27B1* basal gene expression. Renal tissue also showed significantly more gene expression of both cytochromes compared to xenografted breast cancer cells. Data are depicted as the mean \pm SEM. Results were normalized against actin mRNA expression. $N \geq 12$, different letters indicate $P < 0.05$.

last one encodes for a voltage gated potassium channel which overexpression has been related to carcinogenesis, as previously mentioned. None of these genes were differentially expressed in tumors of xenotransplanted mice (data not shown). So, we decided to evaluate another calcitriol target with canonical vitamin D response elements. We chose cathelicidin (CAMP) due its high

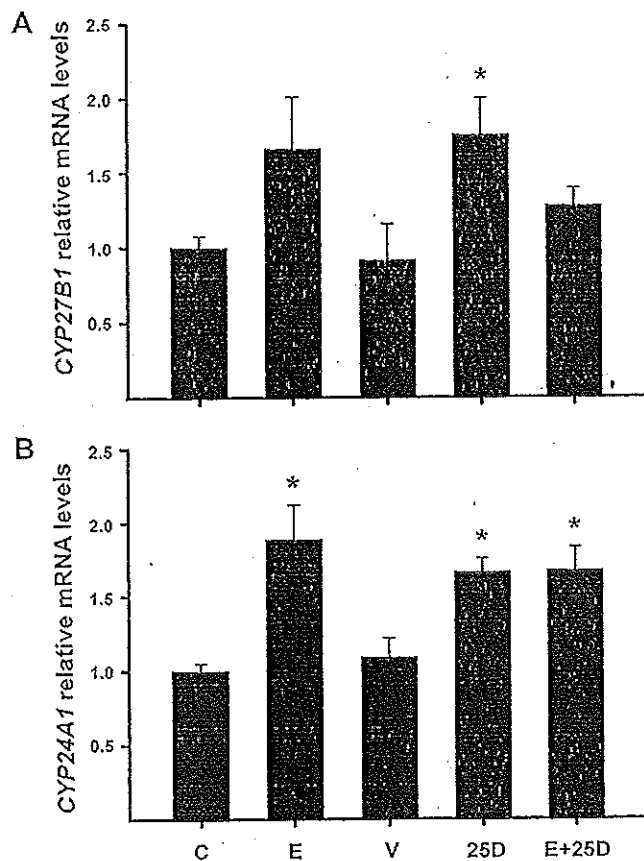


Fig. 3. Regulation of *CYP24A1* and *CYP27B1* gene expression in tumor tissue. Mice were divided in the following groups: control (C), ethanol (E), vehicle (V), 25OHD₃ (25D), or combined E+25D. A) *CYP27B1* gene expression was stimulated in 25D-treated non-ethanol drinking mice. B) *CYP24A1* gene expression was significantly upregulated by E, 25D and the combined group (E+25D). Data are depicted as the mean \pm SEM. Results were normalized against *ACTB* mRNA expression; controls values were set to one. $N \geq 12$, * $P < 0.05$ vs C.

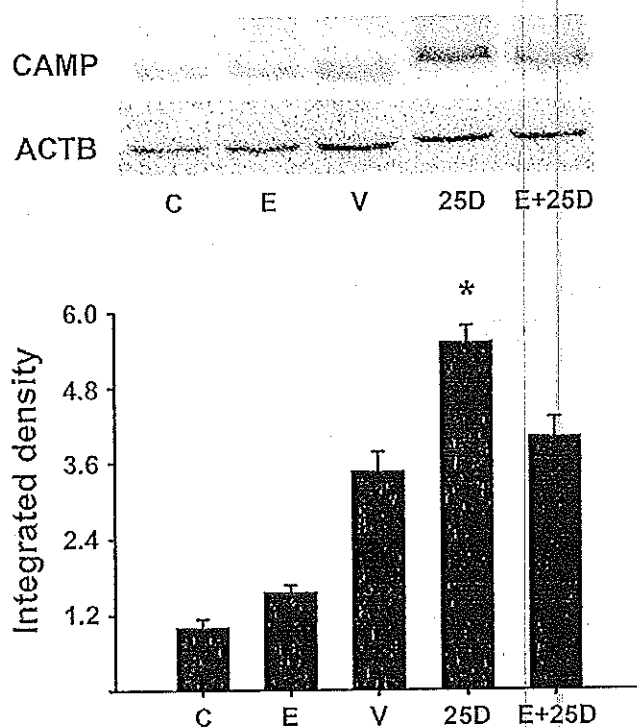


Fig. 5. Modulation of CAMP protein expression in xenografted tumors. Mice were divided in the following groups: control (C), ethanol (E), vehicle (V), 25OHD₃ (25D), or combined E+25D. CAMP protein (25 kDa) was significantly more abundant in tumors from 25D treated mice, compared to controls (* $P < 0.05$). Data are depicted as the mean \pm SEM. Actin (*ACTB*) protein (43 kDa) was used as a loading control. Control values were set to one. Representative images are shown. $N \geq 4$ different tumors.

sensitivity to calcitriol in human cells [35]. As shown in Fig. 5 and as expected, Western blots of tumor homogenates showed that CAMP was significantly more abundant in samples from 25OHD₃-treated-mice than those from controls. Interestingly, when mice were concomitantly treated with ethanol and 25OHD₃, no statistical difference in CAMP expression was observed when compared to controls (Fig. 5). Two immunoreactive bands were detected: ~75 kDa and ~25 kDa. These bands might represent associations of uncleaved CAMP pro-protein with other proteins, since CAMP may form high molecular weight complexes [36,37] and different molecular weight CAMP bands have been described in breast tumors [38]. The relative abundance of these two CAMP variants was similar; therefore we only show results for the 25 kDa form (Fig. 5).

We also analyzed tumor VDR expression by Western blots. Regarding this, two immunoreactive bands were detected: a more abundant high molecular weight variant and the classic 50 kDa VDR band, which was weakly detected, as reported previously in breast cancer cells [39]. Optical density analysis showed a similar VDR protein abundance regardless the treatment (Supplementary Fig. 2).

3.2.3. Effects of treatments upon 25OHD₃ and calcium serum concentrations

Blood samples were drawn at the time of sacrifice, 14 h after the final 25OHD₃ weekly dose. As expected, in the case of 25OHD₃ mean serum levels were significantly higher in mice treated with this vitamin D metabolite compared to non-supplemented animals, reaching very high values in both ethanol-drinking and non-drinking groups (Table 1). On the other hand, ethanol intake increased 25OHD₃ levels compared to controls; however, this difference was not statistically different (Table 1). Regarding serum calcium levels, the administration of ethanol alone did not result in significant changes in calcemia compared to controls. However, in 25OHD₃-treated groups with or without ethanol drinking regimen, calcemia values were significantly higher when compared to the control group ($P < 0.05$), without reaching a hypercalcemic state (Table 1). In addition, serum calcium and 25OHD₃ levels were positively and significantly associated ($R = 0.824$, $P = 0.006$) in the 25OHD₃-treated groups (Fig. 6A), and without a significant association ($R = 0.055$, $P = 0.846$) in the non-25OHD₃ treated groups (Fig. 6B).

3.2.4. Tumor volume

Compared to the control group, neither alcohol consumption nor 25OHD₃ treatment significantly affected the establishment of MBCDF-D5 tumors after implantation. However, a suggestive delay on tumor onset was observed in the 25OHD₃-treated group versus all other groups, reaching significance when compared to ethanol-treated animals (Table 2). In general, increased tumor volume was observed in the ethanol-treated group; although this effect did not reach statistical significance (Fig. 7).

Table 1
Serum levels of calcium and 25OHD₃.

Parameters	C	E	V	25D	25D+E
Calcium (mg/dL)	9.3 ± 0.3	9.6 ± 0.1	9.7 ± 0.3	10.2 ± 0.6*	10.1 ± 0.3*
25OHD ₃ (ng/mL)	59 ± 9	71 ± 15	63 ± 5	1499 ± 840**	1390 ± 1005**

Data are presented as mean ± standard deviation. Mice were divided in the following groups: control (C), ethanol (E), vehicle (V), 25OHD₃ (25D), or combined E+25D. N ≥ 4 different pools, each pool included at least 3 mice from the same experimental group.

* $P < 0.05$ vs C and E.

** $P < 0.05$ vs C, E and V.

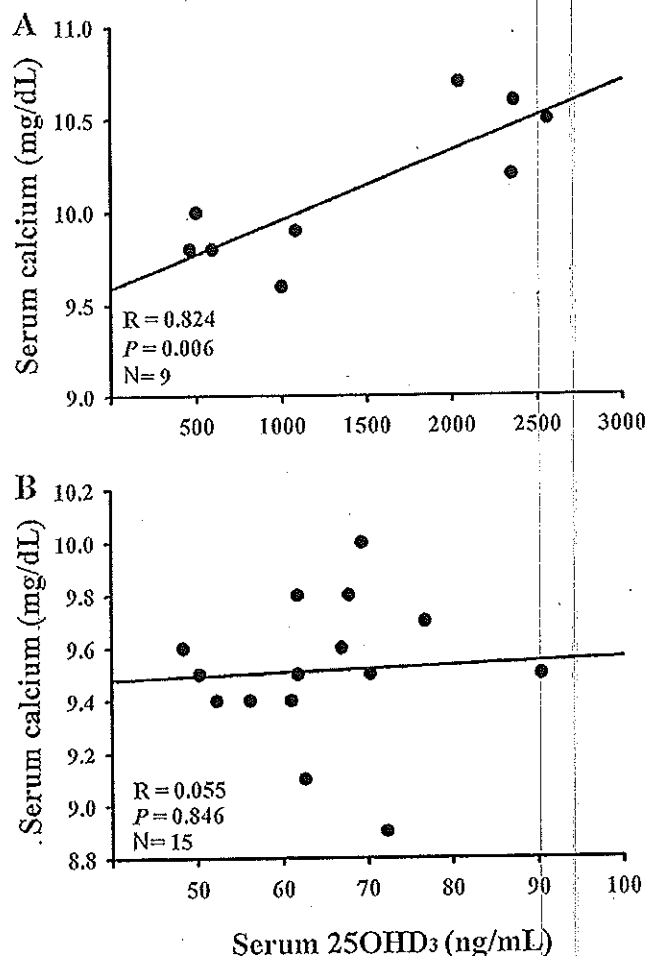


Fig. 6. Serum calcium and 25-hydroxy-vitaminD₃ association. A) 25OHD₃-treated groups. Serum calcium and 25OHD₃ were positively and significantly associated. B) Non-25OHD₃ treated groups. No association was found between the two parameters tested. The N represents pools of samples which include at least 3 mice in each pool from the same group.

3.3. In vivo effects of treatments upon body weight and animal wellbeing

Initial body weights mean from all groups was 17.94 ± 0.161 g. Final body weights mean in each group were: control 20.11 g ± 1.40 g, ethanol 20.74 g ± 1.57 g, vehicle 21.05 g ± 0.19 g, 25OHD₃ 22.07 g ± 0.96 g and 25OHD₃ plus ethanol 21.74 g ± 1.63 g. Only the groups supplemented with 25OHD₃ had higher mean body weight compared to the control group at the end of experiments ($P < 0.001$). In general, we did not find signs of health deterioration associated to treatment (e.g. dehydration, altered behavior, loss of

Table 2
Tumor onset.

Treatment	Media ± SD
C	17.7 ± 4.79
E	13.9 ± 7.24
V	17.54 ± 4.7
25D	20.63 ± 6.25*
E+25D	18.75 ± 5.74

Data are presented as mean ± S.D of time elapsed between xenograft and tumor onset (days). Mice were divided in the following groups: control (C), ethanol (E), vehicle (V), 25OHD₃ (25D), or combined E+25D. N ≥ 13.

* $P = 0.01$ vs E.

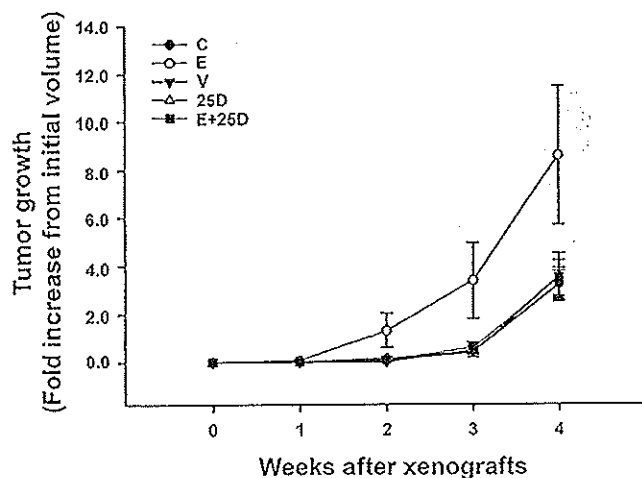


Fig. 7. Tumor growth depicted as fold increase from initial volume by weekly measures. Human breast cancer cells were injected on day 0 and afterwards tumor dimensions were measured. Mice were divided in the following groups: control (C), ethanol (E), vehicle (V), 25OH₂ (25D), or combined E+25D. The graphic depicts weekly measures (fold increase from initial volume) as the mean \pm SEM.

appetite, weight loss), suggesting that the tested doses of ethanol and 25OH₂ were well tolerated.

4. Discussion

In the current study, we examined the possibility that chronic moderate ethanol consumption might affect gene expression of enzymes involved in vitamin D metabolism in breast cancer cells, and consequently, impact on 25OH₂-dependent expression of some calcitriol targets with relevant roles in breast cancer genesis and progression. We chose 25OH₂ instead of cholecalciferol to bypass hepatic hydroxylation, given that liver functions may be compromised by alcohol intake; hence, 25OH₂ bioavailability would not be a limiting factor. Under these conditions, we found that moderate chronic ethanol intake significantly increased *CYP24A1* but did not modify *CYP27B1* gene expression in tumor cells. However, ethanol drinking did significantly decrease renal *Cyp27b1*. These results suggest that the ethanol consumption regimen tested herein decreased 25OH₂ bioconversion into calcitriol in the kidney, while increased breast cancer cells ability to degrade these two vitamin D metabolites. Our results are in line with those from a previous study performed in female rats, where ethanol drinking increased *Cyp24a1* while decreased *Cyp27b1* expression in the kidneys, resulting in reduced serum calcitriol levels [23]. Thus, we tested the impact of ethanol consumption on biological markers of calcitriol activity (*i.e.* gene expression and tumor volume) in xenografted breast tumors. Under the conditions used in this study, 25OH₂ administration did not significantly delay tumor onset nor decreased tumor growth. This could be explained either by the cell phenotype (MBCDF-D5 cells are highly undifferentiated) or by the low intratumoral calcitriol concentration due to high degradation. The latter is possible given the high tumoral *CYP24A1/CYP27B1* ratio observed herein, which, on the other hand, might also explain why we did not find a significant modulation of *KCNH1*, *VEGFA* or *THSB1* gene expression by 25OH₂ treatment. In contrast, in kidneys there were 5 folds higher basal *Cyp27b1* than *Cyp24a1*, suggesting that compared to kidneys, MBCDF-D5 tumors are very inefficient in producing calcitriol. Nevertheless, the results on tumoral CAMP protein and *CYP24A1* gene expression strongly suggest that local conversion of 25OH₂ to calcitriol actually occurred in our xenografted breast cancer cells both in the presence and absence of systemic ethanol. CAMP is an

antimicrobial peptide that in neoplastic cells has shown cytotoxic, antiproliferative and pro-apoptotic effects [40–42]. Transcription of *CAMP* is highly stimulated by calcitriol due to the vitamin D response element located in its promoter [35]. Interestingly, even though in both 25OH₂-treated groups *CAMP* protein expression augmented compared to controls, the magnitude of the response was higher and significant only in mice non-consuming alcohol. This observation further supported that in the tumor mass calcitriol production and bioavailability were restricted by alcohol intake, consistently with our results showing increased tumoral *CYP24A1* in ethanol drinking mice and decreased *CYP27B1* in tumors from mice treated with the combined regimen compared to those treated only with 25OH₂. Likewise, our results also suggest that a similar process is taking place at the renal level, given that co-administration of ethanol and 25OH₂ reduced in 60% 25OH₂-dependent *Cyp24a1* upregulation in this tissue, probably reflecting less bioactive calcitriol and thus, less expression of this canonical calcitriol-responsive gene. Elsewhere, ethanol consumption has shown to stimulate the production of oxidative stress in kidneys, resulting in increased renal *CYP24A1* gene transcription as a result of mitogen-activated protein kinases signaling pathway activation. This specific mechanism of action of ethanol remains to be studied in our breast tumor-murine model [23]. On the other hand, given that calcitriol is a known negative regulator of renal *CYP27B1* [43], we expected to find its gene expression reduced by 25OH₂ treatment in both kidneys and tumors. However; this was not the case. In fact, renal *Cyp27b1* gene expression was only reduced when mice were exposed to chronic ethanol intake, suggesting that alcohol may decrease systemic calcitriol concentration as a result of reduced renal *CYP27B1* expression; hence, lowering vitamin D anticancer effects in the whole body. Instead, in xenografted breast tumor cells 25OH₂ significantly increased *CYP27B1* gene expression. This outcome agrees with previous studies showing that calcitriol and cholecalciferol augmented *CYP27B1* gene expression in breast cancer cells both *in vivo* and *in vitro* [44,45], and with reports showing breast tumor spilling of calcitriol into the circulation in cholecalciferol-supplemented mice [45]. This is explainable on the basis that extrarenal regulation of *CYP27B1* by calcitriol is a cell-type-selective event [46,47], and implies that bioconversion of 25OH₂ into calcitriol in the mammary gland depends more on vitamin D nutritional status. Importantly, our results on tumor *CYP27B1* showed that alcohol intake may diminish 25OH₂-dependent calcitriol production, preventing in this manner its beneficial antineoplastic effects in breast cancer cells. The latter highlights the importance of vitamin D sufficiency and the perils of alcohol consumption in women with risk of breast cancer or currently under therapy for this pathology.

In the present study, ethanol administration *per se* was not associated with significant changes in serum calcium or 25OH₂. However, a non-significant increase in 25OH₂ values was observed in ethanol consuming mice not-treated with this vitamin D metabolite compared to controls, which has also been observed in rat and human models of alcoholism [23,24,48]. In this regard, it has been suggested that higher serum 25OH₂ levels in alcohol users may reflect disturbed vitamin D metabolism as a result of reduced bioconversion into calcitriol, rather than vitamin D sufficiency [48].

The highest values of calcemia were observed in the 25OH₂-treated mice, in accordance with the stimulatory effect of calcitriol upon active intestinal calcium absorption and with previous studies showing that 25OH₂ is more potent and effective than cholecalciferol in rising 25OH₂ serum levels [49]. Herein, even though very high 25OH₂ serum levels were reached in the groups treated with this metabolite, hypercalcemia was not detected in any mice and the clinical status of these animals was similar to

those observed in the other groups studied. This observation may suggest a differential vitamin D pharmacotoxicity between mice and humans. Most probably, vitamin D toxicity was avoided in 25OHD₃-treated groups by the classical feedback autoregulatory loop involving increased *CYP24A1* expression, as seen in our renal and tumor data. Also, it is possible that urinary calcium excretion was higher in 25OHD₃-treated groups. On the other hand, the positive association between serum calcium and 25OHD₃ levels observed only in 25OHD₃-treated mice corroborates that nutritional vitamin D status is one of the determinants of calcemia.

Whereas total body fat has been inversely associated with 25OHD₃ levels in humans [50], in the murine model used herein we found a significantly higher mean final body weight in mice that received 25OHD₃ compared to controls. This might be explained considering the fact that both VDR and its ligand positively and significantly impact on lipid accumulation, as seen in the VDR-KO-associated lean phenotype [51]. Alternatively, since mice were still developing at the beginning of the study, it is possible that 25OHD₃ supplementation increased body weights as a result of augmented bone mineral content and decreased bone resorption, as reported in young girls [52]. These assumptions need to be further investigated. In line with this, vitamin D supplementation is known to protect against bone loss associated with chronic alcohol administration in female mice [53]. Nonetheless, in our study alcohol intake did not result in weight loss, must probably due to the moderate dose of alcohol used in this study.

In summary, our study indicates that chronic moderate alcohol intake rises renal and tumoral *CYP24A1* while lowers renal *Cyp27b1* gene expression. In addition, 25OHD₃ supplementation significantly stimulated tumoral *CYP27B1* gene expression only in non-alcohol-drinking mice. These results suggest that even a low ethanol intake habit can actually decrease renal and tumoral 25OHD₃ bioconversion into calcitriol and stimulate its degradation in breast tumors. The latter may partially explain why alcohol consumption is associated with vitamin D deficiency and breast cancer risk and progression.

Acknowledgments

We acknowledge with thank to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México, who supported this study with grant numbers 153862, 241034 and MOD-ORD-18-2014, PCI-006-06-14 to LD, EA and JGQ, respectively. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.09.011>.

References

- [1] M. Schutze, H. Boeing, T. Pischon, J. Rehm, T. Kehoe, G. Gmel, A. Olsen, A.M. Tjonneland, C.C. Dahm, K. Overvad, F. Clavel-Chapelon, M.C. Boutron-Ruault, A. Trichopoulos, V. Benetou, D. Zyllis, R. Kaaks, S. Rohrmann, D. Palli, F. Berrino, R. Tumino, P. Vineis, L. Rodriguez, A. Agudo, M.J. Sanchez, M. Dorronsoro, M.D. Chirlaque, A. Barricarte, P.H. Peeters, C.H. van Gils, K.T. Khaw, N. Wareham, N.E. Allen, T.J. Key, P. Boffetta, N. Slimani, M. Jenab, D. Romaguera, P.A. Wark, E. Riboli, M.M. Bergmann, Alcohol attributable burden of incidence of cancer in eight European countries based on results from prospective cohort study, *BMJ* 342 (2011) d1584.
- [2] C. Scoccianti, B. Lauby-Secretan, P.Y. Bello, V. Chajes, I. Romieu, Female breast cancer and alcohol consumption: a review of the literature, *Am. J. Prev. Med.* 46 (2014) S16–25.
- [3] P. Boffetta, M. Tubiana, C. Hill, M. Boniol, A. Aurengo, R. Masse, A.J. Valleron, R. Monier, G. de The, P. Boyle, P. Autier, The causes of cancer in France, *Ann. Oncol.* 20 (2009) 550–555.
- [4] N.E. Allen, V. Beral, D. Casabonne, S.W. Kan, G.K. Reeves, A. Brown, J. Green, Moderate alcohol intake and cancer incidence in women, *J. Natl. Cancer Inst.* 101 (2009) 296–305.
- [5] R.C. Ellison, Y. Zhang, C.E. McLennan, K.J. Rothman, Exploring the relation of alcohol consumption to risk of breast cancer, *Am. J. Epidemiol.* 154 (2001) 740–747.
- [6] L.S. Mørch, D. Johansen, L.C. Thygesen, A. Tjønneland, E. Løkkegaard, C. Stahlberg, M. Grønbaek, Alcohol drinking, consumption patterns and breast cancer among Danish nurses: a cohort study, *Eur. J. Public Health* 17 (2007) 624–629.
- [7] W.Y. Chen, B. Rosner, S.E. Hankinson, G.A. Colditz, W.C. Willett, Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk, *JAMA* 306 (2011) 1884–1890.
- [8] T. Watabiki, Y. Okii, T. Tokiyasu, S. Yoshimura, M. Yoshida, A. Akane, N. Shikata, A. Tsubura, Long-term ethanol consumption in ICR mice causes mammary tumor in females and liver fibrosis in males, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 24 (2000) 1175–1225.
- [9] R. Yirmiya, S. Ben-Eliyahu, R.P. Gale, Y. Shavit, J.C. Liebeskind, A.N. Taylor, Ethanol increases tumor progression in rats: possible involvement of natural killer cells, *Brain Behav. Immun.* 6 (1992) 74–86.
- [10] P.J. Brooks, S. Zakhari, Moderate alcohol consumption and breast cancer in women: from epidemiology to mechanisms and interventions, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 37 (2013) 23–30.
- [11] G. Millonig, Y. Wang, N. Homann, F. Bernhardt, H. Qin, S. Mueller, H. Bartsch, H. K. Seitz, Ethanol-mediated carcinogenesis in the human esophagus implicates *CYP2E1* induction and the generation of carcinogenic DNA-lesions, *Int. J. Cancer* 128 (2011) 533–540.
- [12] A.A. Rose, C. Elser, M. Ennis, P.J. Goodwin, Blood levels of vitamin D and early stage breast cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis, *Breast Cancer Res. Treat.* 141 (2013) 331–339.
- [13] C.F. Garland, E.D. Gorham, S.B. Mohr, W.B. Grant, E.L. Giovannucci, M. Lipkin, H. Newmark, M.F. Holick, F.C. Garland, Vitamin D and prevention of breast cancer: pooled analysis, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 103 (2007) 708–711.
- [14] T. Shao, P. Klein, M.L. Grossbard, Vitamin D and breast cancer, *Oncologist* 17 (2012) 36–45.
- [15] J. Welsh, Vitamin D metabolism in mammary gland and breast cancer, *Mol. Cell Endocrinol.* 347 (2011) 55–60.
- [16] L. Lowe, C.M. Hansen, S. Senaratne, K.W. Colston, Mechanisms implicated in the growth regulatory effects of vitamin D compounds in breast cancer cells, *Recent Results Cancer Res.* 164 (2003) 99–110.
- [17] J.C. Fleet, Molecular actions of vitamin D contributing to cancer prevention, *Mol. Aspects Med.* 29 (2008) 388–396.
- [18] J. Welsh, Cellular and molecular effects of vitamin D on carcinogenesis, *Arch. Biochem. Biophys.* 523 (2012) 107–114.
- [19] N. Lopes, B. Sousa, D. Martins, M. Gomes, D. Vieira, L.A. Veronese, F. Milanezi, J. Paredes, J.L. Costa, F. Schmitt, Alterations in vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR *CYP27B1* and *CYP24A1* expression in benign and malignant breast lesions, *BMC Cancer* 10 (2010) 483.
- [20] K. Townsend, C.M. Banwell, M. Guy, K.W. Colston, J.L. Mansi, P.M. Stewart, M.J. Campbell, M. Hewison, Autocrine metabolism of vitamin D in normal and malignant breast tissue, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 3579–3586.
- [21] J. Alvisa-Negrin, E. Gonzalez-Reimers, F. Santolaria-Fernandez, E. Garcia-Valdecasas-Campelo, M.R. Valls, R. Pelaez-Gonzalez, M.C. Duran-Castellon, M. de Los Angeles Gomez-Rodriguez, Osteopenia in alcoholics: effect of alcohol abstinence, *Alcohol Alcohol* 44 (2009) 468–475.
- [22] K. Laitinen, M. Valimäki, C. Lamberg-Allardt, L. Kivisaari, M. Lalla, M. Karkkainen, R. Ylikahri, Deranged vitamin D metabolism but normal bone mineral density in Finnish noncirrhotic male alcoholics, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 14 (1990) 551–556.
- [23] K. Shankar, X. Liu, R. Singhal, J.R. Chen, S. Nagarajan, T.M. Badger, M.J. Ronis, Chronic ethanol consumption leads to disruption of vitamin D3 homeostasis associated with induction of renal 1,25 dihydroxyvitamin D3-24-hydroxylase (*CYP24A1*), *Endocrinology* 149 (2008) 1748–1756.
- [24] R.T. Turner, R.C. Aloia, L.D. Segel, K.S. Hannon, N.H. Bell, Chronic alcohol treatment results in disturbed vitamin D metabolism and skeletal abnormalities in rats, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 12 (1988) 159–162.
- [25] M. Gascon-Barre, Interrelationships between vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 during chronic ethanol administration in the rat, *Metabolism* 31 (1982) 67–72.
- [26] R. Jacoby, J. Fox, Biology and disease of mice, in: L.C.A.J. Fox, F.M. Loew, F.W. Quimby (Eds.), *Laboratory Animal Medicine*, Academic Press, Inc, San Diego, CA, 1984, pp. 31–89.
- [27] E. Aberg, C.P. Hofstetter, L. Olson, S. Brene, Moderate ethanol consumption increases hippocampal cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 8 (2005) 557–567.
- [28] E. Cebral, A. Motta, M. Boquet, M.A. de Gimeno, Effects of low chronic ethanol exposure on prostaglandin E synthesis by preimplantation mouse embryos, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 58 (1998) 249–255.
- [29] B.A. Vorderstrasse, T. Wang, A.K. Myers, K.L. Wyrick, G.G. Meadows, Alcohol consumption suppresses mammary tumor metastasis in a syngeneic tumor transplantation model, *Breast Cancer Res. Treat.* 136 (2012) 729–737.
- [30] L.A. Pardo, D. del Camino, A. Sanchez, F. Alves, A. Bruggeman, S. Beckh, W. Stuhmer, Oncogenic potential of EAG K(+) channels, *EMBO J.* 18 (1999) 5540–5547.
- [31] J. García-Quiroz, M. Rivas-Suarez, R. García-Becerra, D. Barrera, I. Martínez-Reza, D. Ordaz-Rosado, N. Santos-Martínez, O. Villanueva, C.L. Santos-Cuevas,

- E. Avila, A. Gamboa-Dominguez, A. Halhali, F. Larrea, L. Diaz, Calcitriol reduces thrombospondin-1 and increases vascular endothelial growth factor in breast cancer cells: implications for tumor angiogenesis, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 144 (Pt A) (2014) 215–222.
- [32] J. García-Quiroz, R. García-Becerra, N. Santos-Martínez, D. Barrera, D. Ordaz-Rosado, E. Avila, A. Halhali, O. Villanueva, M.J. Ibarra-Sánchez, J. Esparza-Lopez, A. Gamboa-Dominguez, J. Camacho, F. Larrea, L. Diaz, in vivo dual targeting of the oncogenic Ether-a-go-go-1 potassium channel by calcitriol and astemizole results in enhanced antineoplastic effects in breast tumors, *BMC Cancer* 14 (2014) 745.
- [33] R. García-Becerra, L. Diaz, J. Camacho, D. Barrera, D. Ordaz-Rosado, A. Morales, C.S. Ortiz, E. Avila, E. Bargallo, M. Arrecillas, A. Halhali, F. Larrea, Calcitriol inhibits ether-a-go-go potassium channel expression and cell proliferation in human breast cancer cells, *Exp. Cell Res.* 316 (2010) 433–442.
- [34] V. Cazares-Ordóñez, R.J. Gonzalez-Duarte, L. Diaz, M. Ishizawa, S. Uno, V. Ortiz, M.L. Ordóñez-Sánchez, M. Makishima, F. Larrea, E. Avila, A cis-acting element in the promoter of human ether a go-go 1 potassium channel gene mediates repression by calcitriol in human cervical cancer cells, *Biochem. Cell Biol.* 93 (2015) 94–101.
- [35] T.T. Wang, F.P. Nestel, V. Bourdeau, Y. Nagai, Q. Wang, J. Liao, L. Tavera-Mendoza, R. Lin, J.W. Hanrahan, S. Mader, J.H. White, Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression, *J. Immunol.* 173 (2004) 2909–2912.
- [36] O. Sorensen, J.B. Cowland, J. Askaa, N. Borregaard, An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma, *J. Immunol. Methods* 206 (1997) 53–59.
- [37] Y. Wang, B. Agerberth, A. Lofgren, A. Almstedt, J. Johansson, Apolipoprotein A-1 binds and inhibits the human antibacterial/cytotoxic peptide LL-37, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 33115–33118.
- [38] J.D. Heilborn, M.F. Nilsson, C.I. Jimenez, B. Sandstedt, N. Borregaard, E. Tham, O. E. Sorensen, G. Weber, M. Stahl, Antimicrobial protein hCAP18/LL-37 is highly expressed in breast cancer and is a putative growth factor for epithelial cells, *Int. J. Cancer* 114 (2005) 713–719.
- [39] J. García-Quiroz, R. García-Becerra, D. Barrera, N. Santos, E. Avila, D. Ordaz-Rosado, M. Rivas-Suarez, A. Halhali, P. Rodriguez, A. Gamboa-Dominguez, H. Medina-Franco, J. Camacho, F. Larrea, L. Diaz, Astemizole synergizes calcitriol antiproliferative activity by inhibiting CYP24A1 and upregulating VDR: a novel approach for breast cancer therapy, *PLoS One* 7 (2012) e45063.
- [40] K. Okumura, A. Itoh, E. Isogai, K. Hirose, Y. Hosokawa, Y. Abiko, T. Shibata, M. Hirata, H. Isogai, C-terminal domain of human CAP18 antimicrobial peptide induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma SAS-H1 cells, *Cancer Lett.* 212 (2004) 185–194.
- [41] D. Winder, W.H. Gunzburg, V. Erfle, B. Salmons, Expression of antimicrobial peptides has an antitumor effect in human cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242 (1998) 608–612.
- [42] H. Bruns, M. Buttner, M. Fabri, D. Mouggiakakos, J.T. Bittenbring, M.H. Hoffmann, F. Beier, S. Pasemann, R. Jitschin, A.D. Hofmann, F. Neumann, C. Daniel, A. Maurberger, B. Kempkes, K. Amann, A. Mackensen, A. Gerbitz, Vitamin D dependent induction of cathelicidin in human macrophages results in cytotoxicity against high-grade B cell lymphoma, *Sci. Trans. Med.* 7 (2015) 282ra247.
- [43] H.L. Henry, Regulation of vitamin D metabolism, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25 (2011) 531–541.
- [44] L.L. Ooi, Y. Zheng, H. Zhou, T. Trivedi, A.D. Conigrave, M.J. Seibel, C.R. Dunstan, Vitamin D deficiency promotes growth of MCF-7 human breast cancer in a rodent model of osteosclerotic bone metastasis, *Bone* 47 (2010) 795–803.
- [45] S. Swami, A.V. Krishnan, J.Y. Wang, K. Jensen, R. Horst, M.A. Albertelli, D. Feldman, Dietary vitamin D(3) and 1,25-dihydroxyvitamin D(3) (calcitriol) exhibit equivalent anticancer activity in mouse xenograft models of breast and prostate cancer, *Endocrinology* 153 (2012) 2576–2587.
- [46] M.V. Young, G.C. Schwartz, L. Wang, D.P. Jamieson, L.W. Whitlatch, J.N. Flanagan, B.L. Lokeshwar, M.F. Hollick, T.C. Chen, The prostate 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase is not influenced by parathyroid hormone and calcium: implications for prostate cancer chemoprevention by vitamin D, *Carcinogenesis* 25 (2004) 967–971.
- [47] M.M. Turunen, T.W. Dunlop, C. Carlberg, S. Vaisanen, Selective use of multiple vitamin D response elements underlies the 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-mediated negative regulation of the human CYP27B1 gene, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 2734–2747.
- [48] K. Lee, Sex-specific relationships between alcohol consumption and vitamin D levels: the Korea national health and nutrition examination survey 2009, *Nutr. Res. Pract.* 6 (2012) 86–90.
- [49] H.A. Bischoff-Ferrari, B. Dawson-Hughes, E. Stocklin, E. Sidelnikov, W.C. Willett, J.O. Edell, H.B. Stahelin, S. Wolfgram, A. Jetter, J. Schwager, J. Henschkowski, A. von Eckardstein, A. Egli, Oral supplementation with 25(OH)D3 versus vitamin D3: effects on 25(OH)D levels, lower extremity function, blood pressure, and markers of innate immunity, *J. Bone Miner. Res.* 27 (2012) 160–169.
- [50] M.B. Snijder, R.M. van Dam, M. Visser, D.J. Deeg, J.M. Dekker, L.M. Bouter, J.C. Seidell, P. Lips, Adiposity in relation to vitamin D status and parathyroid hormone levels: a population-based study in older men and women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90 (2005) 4119–4123.
- [51] C.J. Narvaez, D. Matthews, E. Broun, M. Chan, J. Welsh, Lean phenotype and resistance to diet-induced obesity in vitamin D receptor knockout mice correlates with induction of uncoupling protein-1 in white adipose tissue, *Endocrinology* 150 (2009) 651–661.
- [52] H.T. Viikari-Juntura, A.M. Natri, M. Karjalainen, M.M. Huttunen, A. Palssa, J. Jakobsen, K.D. Cashman, C. Molgaard, C. Lambert-Alardi, A positive dose-response effect of vitamin D supplementation on site-specific bone mineral augmentation in adolescent girls: a double-blinded randomized placebo-controlled 1-year intervention, *J. Bone Miner. Res.* 21 (2006) 836–844.
- [53] K.E. Mercer, R.A. Wynne, O.P. Lazarenko, C.K. Lumpkin, W.R. Hogue, L.J. Suva, J. R. Chen, A.Z. Mason, T.M. Badger, M.J. Ronis, Vitamin D supplementation protects against bone loss associated with chronic alcohol administration in female mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343 (2012) 401–412.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE MORELOS
ESCUELA DE NUTRICIÓN



INFLUENCIA DEL CONSUMO DE ALCOHOL SOBRE LA FUNCIÓN
ONCOPROTECTORA DE LA VITAMINA D EN UN MODELO MURINO DE
CANCER DE MAMA.

TESIS PROFESIONAL

Para obtener el grado de:

LICENCIADA EN NUTRICIÓN

P R E S E N T A:

GALIA LARA SOTELO

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Janice García Quiroz

ASESOR INTERNO:

M. en C. Liliana Valencia Estañón

SINODALES:

M. en C. Jorge Octavio Acosta Montes

M. en C. Gabriela Añorve Valdez

Dra. Ollín Celeste Martínez Ramírez

Dra. Angélica Gabriela Mendoza Madrigal

Dr. Jesús Reynaga Obregón

CUERNAVACA, MORELOS

Febrero, 2016

PROGRAM BOOK
2016
VITAMIN D WORKSHOP



www.vitamindworkshop.org

NEXT MEETING

20th Workshop on Vitamin D – Orlando, FL – March 28 – 31, 2017

Wednesday Poster Board 26 / Loft 2

GENOME-WIDE IDENTIFICATION OF VITAMIN D RECEPTOR BINDING SITES IN THE HUMAN PROSTATE EPITHELIAL CELL LINE RWPE1. J.C. Fleet, M. Cui, Department of Nutrition Science, Purdue University, West Lafayette, IN 47906-2059.

High vitamin D has been proposed to reduce prostate cancer risk in human population studies. The vitamin D receptor (VDR) is a transcription factor that plays a key regulatory role in mediating the actions of 1,25 dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂D). We conducted VDR-chromatin immunoprecipitation (ChIP) in the immortalized, but non-tumorigenic, human prostate epithelial cell line RWPE1 to identify candidate genes that could mediate the cancer protective effects of vitamin D. Cells were treated with vehicle or 1,25(OH)₂D (10 nM, 3 h), ChIP was conducted using either non-immune IgG or an anti-VDR antibody, and DNA was analyzed by Illumina sequencing. Compared to the IgG ChIP, 1236 and 1175 VDR binding peaks were found in 1,25(OH)₂D and vehicle-treated cells after VDR ChIP (0.1 FDR, 200 bp window, CisGenome; 14% overlap). 203 ligand-induced and 179 ligand-suppressed peaks were identified in a comparison of VDR ChIP on vehicle and 1,25(OH)₂D-treated samples. 95% of VDR ChIP peaks were found outside the proximal promoter region of an annotated gene. Examination of the correlation between ChIP-seq peaks and RWPE1 microarray data (+/- 100 nM 1,25(OH)₂D for 6, 24, 48 h) revealed that ~25% of VDR peaks were close to genes encoding 1,25(OH)₂D-regulated transcripts. The VDR response element (VDRE) sequence was enriched within a subset of peaks and the highest enrichment ratio for the presence of a VDRE was seen in ligand-induced peaks associated with vitamin D-upregulated transcripts (56%). Pathway analysis on genes with ligand-induced VDR ChIP peaks identified enrichment of pathways controlling Wnt signaling, NFκB signaling, and the cellular antioxidant response. Our data provide a genome scale picture of VDR binding events in the prostate epithelial cell that may contribute to vitamin D-mediated cancer protection.

Wednesday Poster Board 27 / Loft 2

MODERATED CHRONIC ETHANOL CONSUMPTION STIMULATES THE GENE EXPRESSION OF CYP24A1 IN XENOGRAFTED HUMAN BREAST CANCER CELLS, WHILE INHIBITS RENAL CYP27B1 IN MICE. García-Quiroz J¹, García-Becerra R¹, Avila E¹, Lara-Sotelo G¹, López S¹, Santos-Martínez N¹, Ordaz-Rosado D¹, Barrera D¹, López-Ibarra M², Esparza-Lopez J², Halhali A¹, Larrea-Gallo F¹ and Díaz L¹, ¹Departamento de Biología de la Reproducción and ²Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México D.F., México 14080.

Calcitriol, the most active form of vitamin D, inhibits cancer cell proliferation, promotes a more differentiated phenotype and induces apoptosis. Epidemiologic studies have shown that low serum levels of the calcitriol precursor 25-hydroxyvitamin D (25OHD₃) correlate with increased risk of breast cancer. Furthermore, chronic ethanol consumption stands as a prominent and avoidable risk factor for breast cancer. On the other hand, alcohol affects vitamin D metabolism, resulting in low serum calcitriol and 25OHD₃ concentrations. However, the mechanisms underlying this causal relation have not been fully clarified. Therefore, the aim of this study was to evaluate in a murine model the effects of moderated chronic ethanol consumption on the enzymes involved in calcitriol synthesis and inactivation; namely, CYP27B1 and CYP24A1, respectively. Mice were treated either with 25OHD₃ (i.p. 14000 UI/Kg/week), its vehicle, ethanol (*per os* 5% w/v) or ethanol + 25OHD₃ for one month. A control group was also included. Tumors were induced by subcutaneous injection of human breast tumor derived cancer cells (MBCDF-D5) and the treatments continued for one month. After euthanasia, tumors and kidneys were collected and processed for qPCR. Results: Ethanol consumption increased only tumoral CYP24A1 gene expression, while decreased only renal CYP27B1. 25OHD₃ significantly stimulated CYP24A1 but did not modify CYP27B1 in both tumor and kidney. However, the concomitant administration of ethanol and 25OHD₃ significantly reduced renal CYP27B1 gene expression and was different from ethanol alone, while inhibited the 25OHD₃-dependent CYP24A1 stimulation ($P < 0.05$). These results suggest that ethanol diminishes renal 25OHD₃ bioconversion while stimulates tumoral calcitriol and 25OHD₃ degradation, which may partially explain why alcohol consumption is associated with vitamin D deficiency and breast cancer risk. The major finding of the present study is that ethanol consumption differentially modifies the gene expression of the enzymes involved in vitamin D metabolism in breast cancer xenografts and kidneys. This study was supported by CONACYT México, grants MOD-OR-18-2014 PCI-006-06-14 and 153862 to JGQ and LD.

Agrupación para la Educación Continua

Con apoyo del ISSSTE



Otorgan la presente:

CONSTANCIA

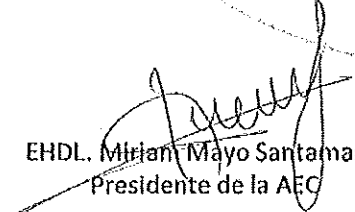
DRA. JANICE GARCIA QUIROZ

Por impartir la conferencia

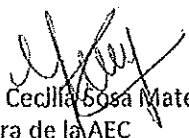
“Nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del
cáncer de mama”.

*en el evento HABLANDO DE CANCER realizado el
27 de Septiembre del 2014*

H. Puebla de Z., a 27 de Septiembre de 2014


EHDL. Miriam Mayo Santamaría
Presidente de la AEC


QFB. Juan Carlos Oliver Pérez
Secretario de la AEC


QFB. Margarita Cecilia Gosa Mateos
Tesorera de la AEC



Asociación Mexicana de Nutriología A.C.

La Asociación Mexicana de Nutriología A.C.
expide la presente

CONSTANCIA

Lara-Sotelo G, García-Quiroz J, García-Becerra R, Avila
^a E, López S, Zárate-Pérez A, Ordaz-Rosado D, Larrea F,
Díaz L

Por su valiosa participación en los trabajos libres

Con el trabajo:

Influencia del consumo de alcohol sobre la función
oncoprotectora de la vitamina D en un modelo murino de cáncer
de mama

Dentro del 4º Congreso Mexicano de Nutriología

Llevado a cabo del 22 al 24 de Agosto
En el INCMNSZ, Ciudad de México, México.

LN Sophia E. Martínez Vázquez
Presidenta

LN Niko A. Cruz Sancén
Secretario Académico



El Sistema Nacional de Investigadores otorga a la

DRA. JANICE GARCÍA QUIROZ

la distinción de

CANDIDATO A INVESTIGADOR NACIONAL

Durante el periodo del 1 de enero de 2015 al 31 de diciembre de 2017 en reconocimiento a su capacidad para realizar investigación científica.

DRA. JULIA TAGÜEÑA PARGA
Secretaria Ejecutiva del SNI

xO8kJ5U3LqJHXYAGv/dwaEGYwngBCUnWiHmLbms7ldNGpq5wq9Y=

Documento firmado electrónicamente.

1 de septiembre de 2014

SALUD

SECRETARÍA DE SALUD



**COMISIÓN COORDINADORA DE INSTITUTOS NACIONALES DE
SALUD Y HOSPITALES DE ALTA ESPECIALIDAD**
DIRECCIÓN GENERAL DE POLÍTICAS DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

EN CUMPLIMIENTO CON EL ARTÍCULO 31 DEL REGLAMENTO VIGENTE PARA EL INGRESO, LA PROMOCIÓN Y LA PERMANENCIA AL SISTEMA INSTITUCIONAL DE INVESTIGADORES EN CIENCIAS MÉDICAS DE LA SECRETARÍA DE SALUD, LA COMISIÓN EXTERNA DE INVESTIGACIÓN EN SALUD HA DICTAMINADO EL INGRESO DE:

GARCIA QUIROZ JANICE

COMO

INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS "C"

ADSCRITA AL

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN**

DURANTE EL PERIODO DEL 1 DE MAYO DE 2015 AL 30 DE ABRIL DE 2018

DR. JUAN JOSÉ HICKS GÓMEZ

PRESIDENTE EJECUTIVO

*Dirección General de Políticas de Investigación en Salud
Dirección de Investigación en Salud*

*Válido únicamente para el trámite administrativo
de obtención de plaza*

DR. RODOLFO CANO JIMENEZ
Director de Investigación en Salud

Fecha 27 abril 2015



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

LIC. IRMA LUCIA REYES BALLEZA
JEFE DEL DEPTO. DE CONSOLIDACION
INSTITUCIONAL CONACYT.
PRESENTE:

Por medio de la presente, se hace constar que el (la) C. GARCIA QUIROZ JANICE, presta sus servicios en esta Institución, con categoría de INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED C, adscrito (a) al DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION, con número de empleado 14448.

Su fecha de ingreso al instituto fue a partir del 01/06/2015, el tiempo comprometido en sus actividades es de 40 horas semanales, cubriendo un horario VARIABLE, cuenta con dos periodos vacacionales de 10 días hábiles los mismos que serán programados de acuerdo a la necesidad del Departamento.

Se extiende la presente constancia en la Ciudad de México, D.F., el día SEIS DE JULIO DE 2015.

ATENTAMENTE
EL SUBDIRECTOR DE RECURSOS HUMANOS

JOSE ANTONIO MELO MANZANILLA

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx



ACUSE

2017 "Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

CDMX 30 de marzo del 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

DRA. LORENZA DIAZ NIETO
Depto. Biología de la Reproducción
Presente

Estimada Dra. Díaz:

Por este medio solicito a usted el informe final del protocolo "INFLUENCIA DEL CONSUMO DE ALCOHOL SOBRE EL METABOLISMO DE LA VITAMINA D Y SU IMPACTO EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE MAMA", con registro CINVA: BRE-1291-14/17-1, concluido el pasado 1 de Marzo del 2017.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA

RECIBIDO
31/03/17
JF

INS. NACIONAL DE CIENCIAS
MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"
9 Y MAR 2017 *m*
DIRECCIÓN DE
INVESTIGACIÓN



INVEST. EXPERIMENTAL Y
BIOTERIO

30 MAR 2017

INST. NAL. CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN INCMYN "S.Z."

C.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala.- Director de Investigación y Presidente de la CINVA
MVZ Mariela Contreras Escamilla.- Jefa del Departamento de Investigación Experimental y Bioterio

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México a 1 de marzo de 2017


Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Presente

Estimada Dra. Bobadilla:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo: *Influencia del consumo de alcohol sobre el metabolismo de la Vitamina D y su impacto en el desarrollo del cáncer de mama* con registro CINVA: BRE-1291-14/17-1, debido a que el protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente:


Dra. Lorenza Díaz Nieto
Nombre y Firma del investigador



Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Defegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx



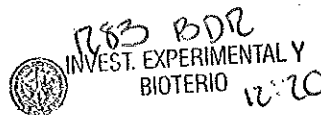
"Año del centenario de la promulgación de la constitución política de los Estados Unidos Mexicanos"

ACUSE

INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F. a 23 de Febrero de 2017

Dra. Lorenza Díaz Nieto
Depto. de Biología de la Reproducción
Presente



INST. NAL. CIENCIAS MEDICAS
Y NUTRUCIÓN INCMNSZ

Estimada Dra. Díaz.:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del Protocolo: "INFLUENCIA DEL CONSUMO DE ALCOHOL SOBRE EL METABOLISMO DE LA VITAMINA D Y SU IMPACTO EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE MAMA, con registro CINVA BRE-1291-14/17-1, debido a que el periodo de realización y la prórroga correspondiente autorizado por la CINVA ha concluido. Favor de llenar el formato de cierre del protocolo que se anexa a la presente. De no recibir el formato de su parte en el plazo de 15 días, el protocolo se dará por cerrado.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación
MVZ Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

RECIBIDO
23/02/17

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

NAB/nom

Alexis

23-02-17



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

deuse

México, D. F., a 11 de marzo de 2016.

Dra. Lorenza Díaz Nieto
Depto. Biología de la Reproducción
Presente.

REF: CINVA-1291 BRE-1291-14/17-1

Estimada Díaz.:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

“Influencia del consumo de alcohol sobre el metabolismo de la vitamina D y su impacto en el desarrollo del cáncer de mama”.

Este comité ha dictaminado **SE AUTORIZA LA PRÓRROGA.**

Que solicita 6 meses y se autorizan 30 ratones BALB/cnu/nu para la realización del protocolo.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

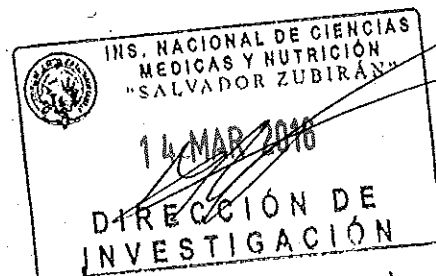
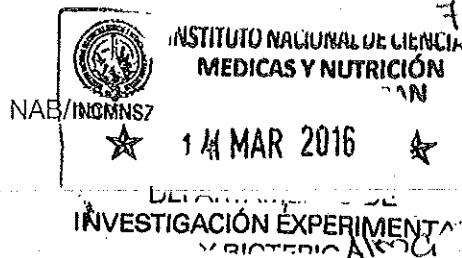
Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval

Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

*Recibi
Lorenza Díaz
14/03/16*

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F. a 17 de febrero de 2016

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA

Estimada Dra. Bobadilla:

Por este conducto le solicito sea tan amable de autorizar una prórroga por 6 meses para el proyecto a mi cargo titulado: **"Influencia del consumo de alcohol sobre el metabolismo de la vitamina D y su impacto en el desarrollo del cáncer de mama"**. Durante el periodo solicitado se contempla llevar a cabo los experimentos necesarios para someter el artículo que tenemos en preparación y contestar posibles dudas de los revisores. A este respecto, un experimento consta de 30 ratones BALBc nu/nu y consideramos montar aproximadamente 4 experimentos más.

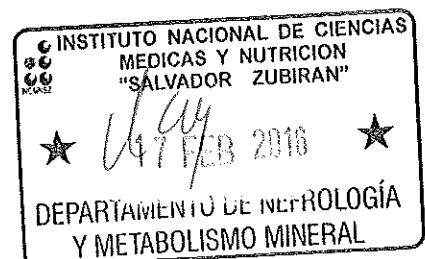
Sin más por el momento agradezco su atención y aprovecho para enviarle un cordial saludo.

Lorenza Díaz Nieto

Atentamente
Dra. Lorenza Díaz Nieto
Investigador en Ciencias Médicas E
Depto. de Biología de la Reproducción

c.c.p. MVZ Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52) 54870900
www.incmnsz.mx





Recibi
Silvia Carrera
10/02/2016

acuse

INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F. a 10 de Febrero de 2016

Dra. Lorenza Díaz Nieto
Depto. Biología de la Reproducción
Presente

Estimada Dra. Díaz:

Por este conducto le informo que su proyecto: "INFLUENCIA DEL CONSUMO DE ALCOHOL SOBRE EL METABOLISMO DE LA VITAMINA D Y SU IMPACTO EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE MAMA.", con registro CINVA: BRE-1291-14/17-1 finalizó en enero del 2016. Por lo que le solicito de la manera más atenta me haga saber si el proyecto requerirá una prórroga. En caso afirmativo, favor de enviar a la CINVA el periodo de extensión que solicita y de requerir un mayor número de animales especificar y justificar como se utilizarán y los procedimientos experimentales que se llevarán a cabo con los mismos. En caso de no requerir una prórroga favor de llenar el formato de cierre del protocolo que se anexa a la presente. De no recibir respuesta de su parte en el plazo de 30 días, el protocolo se dará por cerrado.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS
MÉDICAS Y NUTRICIÓN



10 FEB 2016

INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

INS. NACIONAL DE CIENCIAS
MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"
10 FEB 2016
DIRECCIÓN DE
INVESTIGACIÓN

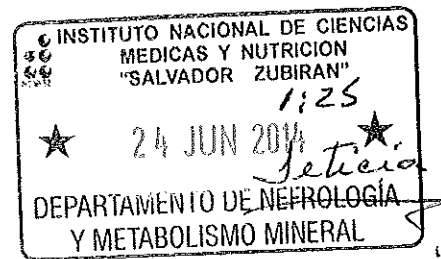
c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación
MVZ Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

NAB/nom

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Dominguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Codigo Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN



24 de Junio de 2014

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

Presente

Estimada Dra. Norma Bobadilla:

En referencia al proyecto BRE-1291-14/17-1, con número de registro CINVA 1291 y titulado: "*Influencia del consumo de alcohol sobre el metabolismo de la vitamina D y su impacto en el desarrollo del cáncer de mama*", y en respuesta a las observaciones del comité especificadas en su comunicado del 19 del presente, a continuación le describo los cambios realizados:

Página 11: se incluyeron los siguientes párrafos:

"Los cadáveres serán recolectados dentro de una bolsa amarilla que se etiquetará siguiendo las especificaciones requeridas para su almacenamiento en el contenedor dispuesto para este fin junto al bioterio".

"Al término del experimento (ocho semanas posteriores al inicio del tratamiento) se sacrificarán los animales mediante anestesia terminal utilizando pentobarbital sódico (40 a 85 mg/Kg de peso)".

Página 15: se incluyó el siguiente párrafo:

"**Criterios de punto final humanitario:** Se considerará como punto final humanitario cuando hay una falta de proporcionalidad entre el sufrimiento del animal y el beneficio obtenido, cuando el sufrimiento del animal ha excedido los límites humanitarios independientemente del beneficio obtenido y cuando por alguna causa los resultados científicos esperables ya no serán útiles por más que se continúe con el experimento".

Una vez revisado el protocolo, hemos también corregido el apartado 4b de la página 2, aclarando lo siguiente:

Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Sección XVI
Delegación Tlalpan
México, D. F. 14600
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

La convocatoria a la que se sometió el proyecto fue la de "Apoyos complementarios para la consolidación Institucional de grupos de investigación en la modalidad de Retención".



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Esta convocatoria contempla el apoyo económico complementario por un año para el investigador joven participante”.

Adjunto a la presente encontrará el documento corregido. Por favor, espero indicaciones para realizar las correcciones aquí descritas en el sistema Latis, ya que ingresé y no me permite modificar el proyecto.

Sin más por el momento, y en espera de su respuesta, aprovecho para enviarle un cordial saludo.

Atentamente:

Dra. Lorenza Díaz Nieto
Investigadora en Ciencias Médicas E
Departamento de Biología de la Reproducción
5487.0900 (2417)
Email: lorenzadiaz@gmail.com



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Recibí
Silvia Carreón
"2014 Año de Octavio Paz"
23/06/2014

Acevedo

México, D.F. a 19 de junio de 2014.

DR. LORENZA DIAZ NIETO
Investigador Principal
Depto. de Biología de la Reproducción
PRESENTE

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

"Influencia del consumo de alcohol sobre el metabolismo de la vitamina D y su impacto en el desarrollo del cáncer de mama."

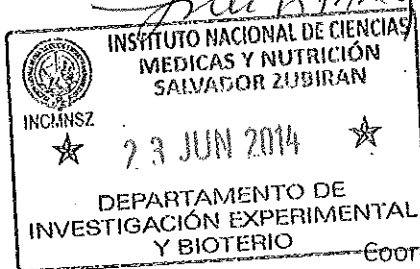
Este comité ha dictaminado aprobar el protocolo con modificaciones menores:

1. Especificar la disposición final de los cadáveres.
2. Especificar la dosis de pentobarbital a utilizar.
3. Aclarar los Criterios de punto final humanitario del protocolo.

Las modificaciones deberán efectuarse en el Sistema Latis y deberán enviarse por escrito a la CINVA.

Su proyecto queda registrado en esta Institución como: CINVA 1291: Clave: BRE-1291-14/17-1. La vigencia de esta resolución es por un año y medio y si requiere un periodo mayor, tendrá que hacer la solicitud correspondiente para obtener una prórroga.

Sin más por el momento quedo de usted.

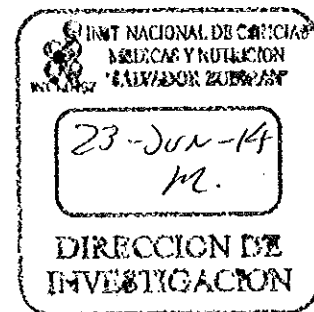


Atentamente,

Norma A. Bobadilla Sandoval

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval

Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales



c.c.p. Dr. Gerardo Gamba A. Director de Investigación
Dr. Rafael Hernández. Jefe de Investigación Experimental y Bioterio

Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Sección XVI
Delegación Tlalpan
México, D. F. 14000
Tel. (52)54870900
www.incmsz.mx

01/06/2015



FORMATO DE EVALUACIÓN DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
COMITÉ INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN HUMANOS
FORMATO DE EVALUACIÓN DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

No. de registro CIIBH: BRE-1291-14/17-1

Influencia del consumo de alcohol sobre el metabolismo de la vitamina D y su impacto en el desarrollo del cáncer de mama

INVESTIGADORES

2a. IDENTIFICACIÓN DE INVESTIGADORES

Nombre, firma y adscripción de cada uno de los investigadores participantes. El investigador principal deberá ser un profesional adscrito a la Institución.

INVESTIGADOR	ADSCRIPCIÓN	POSICIÓN EN EL PROYECTO	FIRMA
Lorenza Díaz Nieto	INCMNSZ	Responsable	
Janice García Quiroz	INCMNSZ	Investigador	
Rocío García Becerra	INCMNSZ	Investigador	
Octavio Villanueva Sánchez	INCMNSZ	Veterinario	

2b. PERTINENCIA DEL GRUPO DE INVESTIGADORES CON RESPECTO DEL PROYECTO

Brevemente describa las calificaciones del grupo investigador con respecto del proceso de investigación científica en general y con respecto del proyecto presentado (v.gr.: grado académico, experiencia laboral, miembro del sistema de investigadores de los INS, del SNI, etc).

- La Dra. Lorenza Díaz cuenta con amplia experiencia en el campo de los efectos biológicos del calcitriol en procesos de salud y enfermedad, manejo de cultivos y técnicas de biología molecular. Ha asesorado tesis de pre y posgrado. Es SNI nivel II. Cuenta con 42 artículos publicados.
- La Dra. Janice García Quiroz tiene gran experiencia en el manejo de animales, biología molecular, técnicas generales de laboratorio y cultivo celular. Es Dra. en Ciencias con especialidad en Farmacología. Cuenta con 4 publicaciones y actualmente está en evaluación en el SNI.
- La Dra. García Becerra cuenta con amplia experiencia en el estudio de compuestos esteroideos utilizados en la anticoncepción y terapia endocrina. Es SNI nivel II.

Cuenta con 34 artículos publicados, ha graduado dos alumnos de pregrado y uno de posgrado.

- El Dr. Octavio Villanueva es integrante del Comité de Investigación en Animales del INCMNSZ. Posee amplia experiencia en la producción y mantenimiento de ratones Balb/c y transgénicos. Pertenece a la Asociación Mexicana de Cirugía Experimental.

➤ INSTITUCIONES PARTICIPANTES

Nombre y dirección de la o las instituciones participantes. Para estudios multicéntricos añadir los datos del centro

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 14000
México, D.F., México.
Tel. (525) 555 73 11 60; Fax: (525) 556 55 98 59

PATROCINIO

4a. ORGANISMOS PATROCINADORES

Nombre, dirección y teléfono de la o las organizaciones, instituciones o laboratorios que aportarán recursos.

El proyecto ha sido sometido a la convocatoria del CONACYT denominada "Apoyos complementarios para la Consolidación Institucional de Grupos de Investigación Retenciones 2014"

4b. ESPECIFICAR SI LOS INVESTIGADORES RECIBEN PAGO (MONETARIO O EN ESPECIE) POR SU PARTICIPACIÓN ESPECÍFICA EN LA INVESTIGACIÓN

La convocatoria a la que se sometió el proyecto fue la de "Apoyos complementarios para la consolidación Institucional de grupos de investigación en la modalidad de Retención". Esta convocatoria contempla el apoyo económico complementario por un año para el investigador joven participante.

5. MARCO TEÓRICO

Explicar detalladamente los fundamentos disponibles a la fecha en los que se basa el estudio que se propone (sentido biológico, datos de experimentos en animales o en humanos):

a) Antecedentes:

En el mundo, la tasa de mortalidad por carcinoma mamario ha mostrado una tendencia creciente, ocupando el primer lugar en incidencia. En México, el cáncer de mama representa un desafío en materia de salud pública ya que constituye la primera causa de defunción por enfermedad neoplásica en la mujer en edad reproductiva. Además, se ha estimado que para el 2020 la mortalidad asociada a dicho cáncer se incrementará en 100% en países en desarrollo [1], por lo que resulta evidente la necesidad de fortalecer en nuestro país la investigación orientada a comprender los procesos implicados en la génesis de dicha patología, con la finalidad de desarrollar nuevas estrategias de tratamiento y prevención.

Se han descrito diversos factores de riesgo implicados en el desarrollo del cáncer de mama; tales como la edad y factores genéticos, nutricios y hormonales, entre otros. Sin embargo, el consumo de bebidas alcohólicas es probablemente el factor de riesgo prevenible y evitable con mayor importancia y repercusión [2]. Se ha determinado que el consumo crónico de alcohol puede derivar en cáncer; y en particular, la posibilidad de padecer cáncer de mama se incrementa de acuerdo al nivel de consumo. En mujeres que consumieron 40 g de alcohol o más por día, se observó un riesgo significativamente alto de desarrollar cáncer de mama comparado con no bebedores: 1.69 (95% CI, 1.19 a 2.40) [3]. De hecho, 9.4% de todos los tumores mamarios se atribuyen al consumo de alcohol [4]. A pesar de que se ha establecido una relación causal entre el consumo de alcohol y el riesgo de desarrollar cáncer de mama, los mecanismos involucrados no han sido aún del todo descritos.

Otro factor de riesgo implicado en el carcinoma mamario es la deficiencia de vitamina D (VD). La asociación entre la deficiencia de VD y el desarrollo de diversos tipos de cáncer ha sido ampliamente descrita [5]. El metabolito de la VD responsable de ejercer sus efectos biológicos es el calcitriol, el cual es un secoesteroide con potente actividad antiproliferativa y prodiferenciante. El calcitriol se produce en diversos tejidos incluida la glándula mamaria, en donde modula proteínas clave implicadas en la proliferación y diferenciación celular. El papel protector de la VD en la mama se sustenta en parte por la presencia de los componentes del sistema de señalización de la VD en dicho tejido; es decir, las enzimas involucradas en su metabolismo y el receptor para la VD (VDR), que es el factor de transcripción que media sus efectos [6,7].

Por otro lado, se sabe que el alcohol interfiere con el metabolismo de la VD, y en consecuencia, los bebedores crónicos pueden presentar bajos niveles de calcitriol y de su precursor [8-10]. Sin embargo, se desconoce el efecto que tiene el etanol sobre la expresión de las enzimas responsables de la síntesis y degradación del calcitriol en la glándula mamaria.

Considerando lo anterior, en el presente trabajo se estudiará el impacto del etanol sobre el metabolismo de la vitamina D en células de cáncer de mama in vitro e in vivo, con la finalidad de determinar si el consumo crónico de alcohol resulta en la inhibición de la producción local de calcitriol y consecuentemente incrementa el riesgo de desarrollar tumores mamarios.

Metabolismo y efectos antineoplásicos de la vitamina D

El metabolismo de la VD comienza en la piel, donde el 7-dehidrocolesterol al exponerse a la radiación ultravioleta se transforma en colecalciferol. El colecalciferol, que también puede obtenerse en menor medida de la dieta, es hidroxilado en el hígado por la enzima VD-25-hidroxilasa (CYP27A1) para convertirse en 25-hidroxivitamina D (25OHD), indicador del estado nutricional de la VD. Este metabolito, si bien es el más abundante, no es la forma activa. En el riñón la 25OHD es hidroxilada por la 25OHD-1 α hidroxilasa (CYP27B1) con lo que se obtiene el calcitriol, forma hormonal y activa de la VD. La enzima 25OHD-24-hidroxilasa (CYP24A1) es responsable del catabolismo del calcitriol [11]. Tanto la CYP27B1 como la CYP24A1 y el VDR se expresan en la glándula mamaria [12].

Los efectos antitumorales del calcitriol se producen a través de diversos mecanismos como la inducción de la apoptosis, citodiferenciación y arresto del ciclo celular. En un tejido dado, los efectos del calcitriol no solo dependen de la presencia y funcionalidad del VDR, sino también de la expresión local de los genes CYP27B1 y CYP24A1, que como ya se mencionó, codifican para las enzimas encargadas de la síntesis y degradación del calcitriol, respectivamente. La CYP24A1 se encuentra sobre-expresada en algunas neoplasias, sugiriendo su participación en la tumorigénesis. Algunos de los marcadores clínicamente relevantes que son modulados por el calcitriol en la mama son el gen que codifica para el inhibidor de cinasas dependiente de ciclinas p21, el gen supresor de tumores p53, el factor de transcripción c-Myc y la ciclina D1 [13]. Nuestro grupo de investigación ha contribuido en el conocimiento de los mecanismos implicados en los efectos antiproliferativos del calcitriol, ya que demostramos que el calcitriol es un potente inhibidor de la expresión del oncogen KCNH1 en células derivadas de tumores mamarios

con diferente fenotipo, resultando en la inhibición significativa de la proliferación celular [14, 15].

Deficiencia de vitamina D y cáncer de mama

Múltiples trabajos epidemiológicos, preclínicos y clínicos han mostrado los beneficios de la VD en la prevención del cáncer de mama, observándose una relación inversa entre los niveles séricos de 25OHD y el desarrollo de esta neoplasia, de su recurrencia y de la tasa de mortalidad [6,16]. Concentraciones de 25OHD < 20 ng/ml, 20–30 ng/ml y de 30–80 ng/ml indican deficiencia, insuficiencia y suficiencia, respectivamente [17]. En particular, mujeres con niveles séricos de 25OHD de 52 ng/mL tuvieron 50% menos incidencia de cáncer de mama en comparación con aquellas con concentraciones de 25OHD <13 ng/ml [18]. Por otro lado, concentraciones elevadas de 25OHD en el suero al momento de diagnosticar la neoplasia correlacionaron con menor tamaño tumoral y mejor pronóstico [19]. Estas investigaciones sugieren fuertemente que mantener niveles adecuados de VD es beneficioso para prevenir la aparición y la recurrencia de tumores de mama. Sin embargo, a pesar de estas prometedoras observaciones, la suplementación con VD y el análisis rutinario de los niveles séricos de 25OHD no se han implementado como medidas para la prevención del cáncer de mama en mujeres con riesgo de desarrollarlo, así como tampoco se han estudiado los factores potencialmente modificables que puedan afectar el metabolismo de la VD.

Metabolismo del alcohol y su relación con el cáncer de mama

En general, las neoplasias más frecuentes relacionadas con el consumo de alcohol son el cáncer hepático, de faringe, cavidad oral, esófago, colon y glándula mamaria [2]. En particular, la relación causal entre el alcohol y el cáncer de mama se sustenta en diversas investigaciones in vitro e in vivo, así como estudios epidemiológicos y meta-análisis [20]. Se calcula que por cada bebida alcohólica adicional consumida por día, el riesgo de desarrollar cáncer de mama se incrementa del 2% (riesgo relativo [RR]=1.02, 95% CI=1.01, 1.03) hasta el 12% (RR=1.12, 95% CI=1.09, 1.14) [2]. De acuerdo a algunos estudios observacionales, a mayor consumo de alcohol aumenta de forma lineal el riesgo de presentar cáncer de mama, y un estudio menciona que el riesgo relativo se incrementa en 7.1% por cada 10 g de alcohol consumido por día [21]. La exposición al alcohol se puede medir por ingesta de etanol en número de bebidas por día o por semana, considerando que cada bebida contiene en promedio 10-12 g de etanol puro. Recientemente, Chen y colaboradores demostraron que incluso el consumo moderado (tres a seis copas de vino a la semana, equivalente a 5 - 9.9 g/día) también aumentó la

probabilidad de desarrollar cáncer de mama (RR, 1.15; 95% CI, 1.06-1.24), y que este riesgo se sumaba a cualquier otro que la mujer ya tenía, por ejemplo, antecedentes familiares [22]. En mujeres menores de 55 años de edad sin factores de riesgo, el riesgo relativo asociado con el consumo ≥ 15 g de alcohol / día fue de 2.5 (95% CI, 1.5 a 4.2) [23].

Los mecanismos implicados en la acción carcinogénica del alcohol en la glándula mamaria no han sido del todo dilucidados; sin embargo, se sabe que el metabolismo del alcohol produce especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno, causando estrés oxidativo, lo que puede causar mutaciones y daño al DNA [24]. Por otro lado, el consumo de alcohol se asocia con el desarrollo de tumores que expresan al receptor de estrógenos y progesterona (ER, PR), así como con el incremento de estrógenos circulantes [25].

El metabolismo del etanol se lleva a cabo primordialmente en el hígado, donde es oxidado a acetaldehído por acción de la alcohol deshidrogenasa (ADH) y del citocromo P450 2E1. El acetaldehído, metabolito más tóxico del alcohol y carcinogénico per se, es a su vez oxidado a acetato mediante la enzima acetaldehído deshidrogenasa (ALDH). Sin embargo, una proporción del etanol presente en la circulación sanguínea puede alcanzar la glándula mamaria, donde es convertido a acetaldehído por la ADH que se expresa en ese sitio. El acetaldehído es capaz de inducir deleciones en las cadenas de DNA, aberraciones cromosómicas y generar aductos con proteínas y DNA. La formación de aductos con proteínas puede inhibir su funcionalidad, mientras que los aductos de DNA pueden ser el inicio de un proceso cancerígeno [26]. Tanto el etanol como el acetaldehído incrementan la expresión de receptores a hormonas, tales como el ER y el PR. Por otro lado, el etanol estimula la proliferación celular y la actividad transcripcional del ER unido a su ligando, lo cual en conjunto, aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de mama [25]. Sin embargo, la señalización estrogénica no explica del todo la asociación positiva observada entre el consumo de alcohol y el desarrollo de cáncer, por lo que los mecanismos implicados en este proceso necesitan ser clarificados.

b) Definición del problema:

Impacto del consumo de alcohol en las funciones de la vitamina D

Desde hace algunas décadas se sabe que el consumo crónico de alcohol se asocia con alteraciones en la homeostasis del calcio, tales como la hipocalcemia, reducción de la densidad mineral ósea, bajo recambio óseo y aumento del riesgo de fracturas. Lo anterior

puede explicarse, al menos en parte, por trastornos en el metabolismo de la VD. En apoyo a lo anterior, en un modelo murino el consumo crónico de etanol disminuyó la expresión de CYP27B1 mientras que aumentó la expresión de CYP24A1 en el riñón [9]. Probablemente como consecuencia de esto último, el alcoholismo se relaciona con concentraciones plasmáticas reducidas de calcitriol y de 25OHD, lo que se agrava en casos de cirrosis, donde se ha reportado que el 66 % de los pacientes con esta patología cursan con niveles reducidos de VD [27]. Por todo lo anterior, nos enfocamos en el estudio del efecto del etanol sobre el metabolismo de la VD en células de cáncer de mama in vitro e in vivo, particularmente en la expresión de las enzimas clave involucradas en la síntesis y degradación del calcitriol.

c) Justificación:

En el mundo, el cáncer de mama representa un desafío en materia de salud pública ya que constituye la primera causa de defunción por enfermedad neoplásica en la mujer en edad reproductiva. La tasa de mortalidad por carcinoma mamario ha ido en aumento, ocupando el primer lugar en incidencia. Se estima que para el 2020 la mortalidad asociada a dicho cáncer se incrementará en 100%. Por ello, es fundamental fortalecer la investigación que permita comprender los procesos implicados en la génesis de dicha patología, con la finalidad de desarrollar nuevas estrategias de tratamiento y prevención.

Se han descrito diversos factores de riesgo implicados en el desarrollo del cáncer de mama; sin embargo, el consumo de bebidas alcohólicas es probablemente el factor de riesgo prevenible y evitable con mayor importancia y repercusión. De hecho, 9.4% de todos los tumores mamarios se atribuyen al consumo de alcohol. A pesar de que se ha establecido una relación causal entre el consumo de alcohol y el riesgo de desarrollar cáncer de mama, los mecanismos involucrados no han sido aún del todo descritos. Otro factor de riesgo implicado con el carcinoma mamario es la deficiencia de vitamina D (VD). La asociación entre la deficiencia de VD y el desarrollo de cáncer es bien conocida. El metabolito de la VD responsable de ejercer sus efectos biológicos es el calcitriol, el cual es un secoesteroide con potente actividad antiproliferativa y prodiferenciante. Por otro lado, se sabe que el alcohol interfiere con el metabolismo de la VD, y en consecuencia, los bebedores crónicos pueden presentar bajos niveles de calcitriol y de su precursor. Sin embargo, se desconoce el efecto que tiene el etanol sobre la expresión de las enzimas

responsables de la síntesis y degradación del calcitriol en las células de la mama y su repercusión en procesos carcinogénicos.

Considerando lo anterior, el presente trabajo se justifica por las siguientes razones:

1. Se estudiará el impacto del etanol sobre el metabolismo de la vitamina D en células de cáncer de mama *in vitro* e *in vivo*, con la finalidad de determinar si el consumo crónico de alcohol resulta en la inhibición de la producción local de calcitriol y consecuentemente incrementa el riesgo de desarrollar tumores mamarios.
2. Se creará conciencia de la necesidad de implementar programas de prevención y tratamiento que contemplen la suplementación con VD o sus metabolitos.
3. Se fortalecerá el grupo de Investigación del cual uno de sus objetivos es prioridad en el ámbito de salud pública: la prevención y el tratamiento del cáncer de mama.
4. Se proporcionará la posibilidad a un joven investigador de alto desempeño y brillante trayectoria científica, de consolidar su proyección.
5. Se formarán recursos humanos en el ámbito científico.
6. Se generará conocimiento científico importante para coadyuvar en la lucha para la prevención y el combate del cáncer de mama.

6a. HIPÓTESIS

Definido como un enunciado comprobable acerca de la relación entre una variable dependiente y una variable independiente.

El consumo de alcohol afectará el metabolismo de la vitamina D favoreciendo la generación acelerada de tumores mamarios cuando existe un núcleo de células malignas.

6b. OBJETIVOS

Aquellos que se esperan obtener puntualmente en el estudio y especificados como objetivo general y objetivos específicos.

- **Objetivo general**

Estudiar el impacto del consumo de alcohol sobre el metabolismo de la vitamina D y sus efectos oncoprotectores en células de cáncer de mama *in vitro* e *in vivo*.

- **Objetivos particulares**

Evaluar el efecto *in vitro* del etanol sobre la expresión génica y proteica de las enzimas CYP27B1 y CYP24A1 en las líneas celulares T-47D y SUM-229PE.

Inducir tumores de cáncer de mama humano en ratones atímicos nu/nu para estudiar la expresión de CYP27B1 y CYP24A1 en la masa tumoral en los diferentes grupos experimentales.

Estudiar el posible efecto adverso del consumo crónico de alcohol sobre la actividad protectora de la VD en el cáncer mamario *in vivo*, mediante la evaluación del desarrollo tumoral en un modelo murino.

Evaluar los niveles séricos de 25OHD y calcitriol en los diferentes grupos experimentales de ratones.

Evaluar la expresión del marcador de proliferación Ki-67 en los tumores de los ratones.

7. METODOLOGÍA: DISEÑO GENERAL

Describir el diseño general del estudio

Se utilizarán dos líneas celulares establecidas de cáncer de mama humano con diferente fenotipo: T-47D (ER+) y SUM-229PE (ER-), de ATCC, Manassas VA y Asterand, San Francisco CA, respectivamente. Nuestro laboratorio cuenta con estas líneas celulares actualmente y los efectos del calcitriol han sido probados *in vitro* en términos de respuesta a la inhibición del crecimiento e inducción de la CYP24A1, demostrando la expresión y funcionalidad del VDR en varios trabajos de nuestro grupo [14,15]. Además, la línea T-47D es tumorigénica por lo que se utilizará para los xenoinjertos en el modelo murino, tal como lo hemos hecho previamente [28]. El calcitriol (1,25-dihidroxitamina D₃) ha sido donado por Hoffmann-La Roche Ltd. (Basel, Suiza), mientras que el colecalciferol se adquirirá de Sigma-Aldrich. El etanol en solución se preparará a partir de vodka comercial.

Cultivo celular: Las células T-47D y SUM-229PE se cultivarán siguiendo las indicaciones de los proveedores. Los procedimientos experimentales se llevarán a cabo en medio DMEM-F12

(Invitrogen; CA, EUA), suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado y tratado con carbón-dextrán.

Inducción tumoral en ratones atímicos y tratamientos

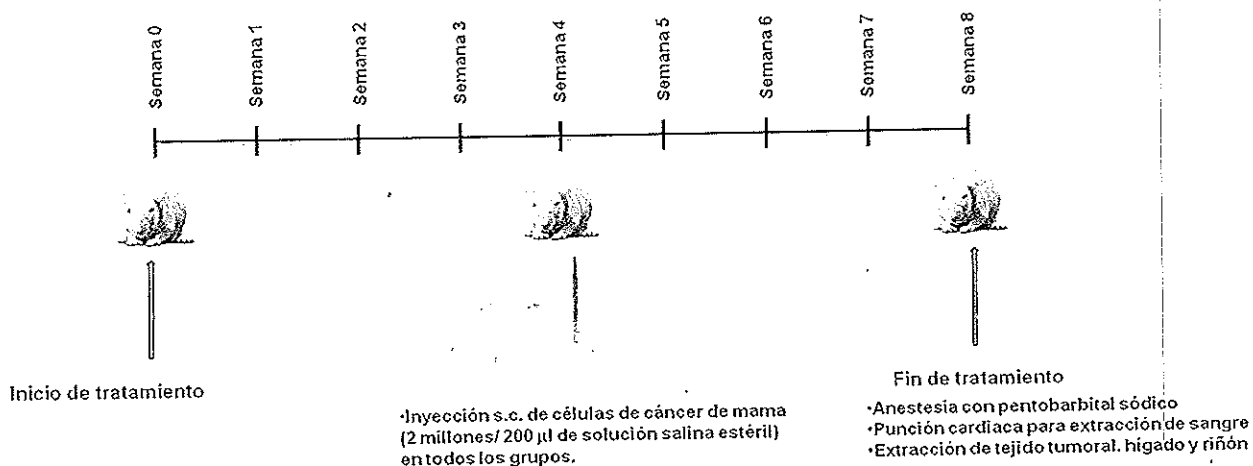
Se utilizarán ratones hembra atímicos (nu/nu) con fondo genético BALB/c de 6-7 semanas de edad. Los ratones se manipularán observando los lineamientos de la ley mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). El protocolo se someterá para su evaluación al comité institucional para la investigación en animales (CINVA). Los ratones se mantendrán en microaisladores ventilados (34 cambios de aire/hora) bajo condiciones de humedad y temperatura constantes ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), ciclos de luz-oscuridad de 12/12 horas y alimento (estándar PMI 5001). La línea celular tumorigénica (2×10^6 células/0.1 ml solución fisiológica estéril) se inoculará por vía subcutánea en el flanco lateral derecho de los ratones atímicos. Cada tercer día se medirán parámetros conductuales y físicos para determinar causales de punto final.

Los grupos experimentales así como el esquema de tratamiento se detallan en el siguiente esquema. Los ratones se dividirán en 5 grupos con 5 individuos por grupo, por experimento. Los experimentos se repetirán al menos en 3 diferentes ocasiones. Las dosis consideradas de etanol y 25OHD corresponden a las previamente reportadas en modelos murinos [29,30].

Se estima que cada ratón bebe de 5-7 mL de agua por día, lo que se tomó en consideración para calcular el volumen de etanol que se adicionará al agua del bebedero. Se utilizó la fórmula:

$$\text{gr de etanol} = V (\text{en dL}) \times \text{graduación de la bebida} \times 0.8$$

Grupo I	Control
Grupo II	Etanol/agua 5% peso/volumen (12.5 g de etanol / día / kg de peso / per os)
Grupo III	25OHD (2000 UI / kg de peso / i.p. / día)
Grupo IV	Vehículo de 25OHD
Grupo V	Etanol + 25OHD



A los ratones de los grupos II, III, IV y V se les administrarán los tratamientos indicados durante cuatro semanas antes de la inyección de las células y se mantendrán por 4 semanas más después de la inyección. El grupo I es el grupo control, por lo que solo se le injertarán las células tumorigénicas. A partir de la inyección de la inoculación se evaluará: 1) el tiempo que tarde en aparecer la masa tumoral, 2) el número de ratones que generen tumor en cada grupo y 3) el volumen tumoral final. Las mediciones de los tumores se realizarán mediante un calibrador vernier cada tercer día y se evaluarán los siguientes parámetros:

- **Volumen tumoral (mm³):** $VT = (a \times b^2) / 2$. Donde a y b corresponden al eje mayor y menor del tumor respectivamente.
- **Volumen relativo del tumor:** $VRT = VT \text{ final} / VT \text{ inicial} \times 100$. Este valor indica el porcentaje de incremento del tumor al final del tratamiento con respecto al volumen tumoral inicial.

Al término del experimento (ocho semanas posteriores al inicio del tratamiento) se sacrificarán los animales mediante anestesia terminal utilizando pentobarbital sódico (40 a 85 mg/Kg de peso). Se colectará la sangre por punción cardíaca y se obtendrá el tejido tumoral, el hígado y un riñón. Estos dos últimos tejidos se usarán para estudiar el efecto del etanol sobre la expresión de las enzimas del metabolismo de VD, a manera de control. El suero se congelará y se utilizará para evaluar posteriormente la concentración de calcitriol, 25OHD y calcio sérico. El tumor se dividirá en dos partes: una se congelará inmediatamente en nitrógeno líquido para la extracción de RNA y la otra se almacenará a -70°C en solución RIPA (fosfato de sodio dibásico 9.1 mM, fosfato de sodio monobásico 1.7 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40, 0.1% SDS, pH 7.4) para extracción de proteínas.

Los cadáveres serán recolectados dentro de una bolsa amarilla que se etiquetará siguiendo las especificaciones requeridas para su almacenamiento en el contenedor dispuesto para este fin junto al bioferio.

Efectos del etanol sobre la expresión génica de CYP27A1, CYP27B1 y CYP24A1

Las células se cultivarán en presencia de diferentes concentraciones de etanol durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, se aspirará el medio y se extraerá el RNA utilizando Trizol®. Para los estudios *in vivo*, el tejido tumoral, el hígado y un riñón de los ratones se homogenizarán en Trizol. Tres µg de RNA se utilizarán para la reacción de retrotranscripción. La reacción de amplificación en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) se llevará a cabo en el instrumento LightCycler® 2.0 de Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) de acuerdo al siguiente protocolo: activación de la Taq DNA polimerasa a 95 °C x 10 minutos, seguido de 45 ciclos de amplificación de 95 °C x 10 segundos, 60 °C x 30 segundos y 72 °C x 1 segundo. La expresión

relativa de los genes de interés se normalizará contra la expresión del gen constitutivo gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en el caso de células humanas (h), y β -Actina para las de ratón (m). Las secuencias de los oligonucleótidos serán las siguientes: para hCYP24A1 (NM_000782.3 / sonda 88): catcatggccatcaaaaaca / gcagctcgactggagtgac; para mCYP24A1 (NM_009996.3 / sonda 78): aactgtacgctgctgtcacg / aatccacatcaagctgtttgc; para hCYP27B1 (NM000785.2/sonda 63): ctgctggactgctcactg / cgcagactacgttgttcagg; para mCYP27B1 (NM_010009.2 / sonda 3): gagttttacaaattggcctagaaa / ggtgcaggaggacttcagc; para mCYP27A1 (NM_024264.4/sonda 66): cctcacctatgggatcttcatc / ttaaggcatccgtgtagagc; m β -Actina (M12481.1 / sonda 56): aaggccaaccgtgaaaagat / gtggtacgaccagaggcatac y para hGAPDH (AF261085.1 / sonda 60): agccacatcgctgagacac / gcccaatagaccaaacc.

Efecto del etanol sobre la expresión del marcador de proliferación Ki-67 en la masa tumoral

Con la finalidad de conocer el impacto de los tratamientos sobre la proliferación celular en los tumores generados, elegimos un marcador que es ampliamente utilizado en la clínica: Ki-67. Para ello se utilizarán los siguientes oligonucleótidos: ggtgtgcagaaaatccaaaga / actgtccctatgacttctgtg (X65550.1/ sonda 73) y se realizará el procedimiento arriba descrito.

Efecto del etanol en la abundancia de las proteínas involucradas en el metabolismo de la VD

Las células se tratarán con diferentes concentraciones de etanol durante 48 h. Al cabo de este tiempo las células se tripsinizarán y centrifugarán para ser lisadas con solución RIPA en presencia de inhibidores de proteasas. Los tejidos provenientes de ratones se homogenizarán también en RIPA a 4°C. Los lisados celulares (50 μ g) se separarán en geles de poliacrilamida (10% SDS-PAGE) bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras. Las proteínas se transferirán a membranas PVDF, que se bloquearán con 10% de leche descremada en PBS. Las membranas se incubarán en presencia de anti-mCYP27A1 (hígados); anti CYP27B1 y anti CYP24A1 (tumores, células de cáncer de mama y riñón). Posteriormente se incubarán con segundo anticuerpo conjugado a la peroxidasa y se visualizarán con el reactivo *ECL+ plus* (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia). Las imágenes serán capturadas y las bandas cuantificadas con el instrumento ChemiDoc (BioRad). Para la normalización, las membranas se colocarán en solución de lavado (2% w/v SDS, 62.5 mM Tris-HCL pH 6.8, 100 mM 2-mercapto-etanol) con agitación durante 10 minutos y posteriormente se incubarán con anti-hGAPDH o anti-m β -Actina.

Determinación del calcio total en suero

Con la finalidad de investigar posibles alteraciones en el metabolismo del calcio como consecuencia de los tratamientos, se determinará el calcio total en el suero de los ratones mediante el método del ion selectivo, que determina la concentración de calcio total por potenciómetro indirecto, utilizando un instrumento Synchrom Clinical System CX5 PRO, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, E.U.A., como se reportó previamente [28].

Determinación de calcitriol y 25OHD en suero

Para la cuantificación de 25OHD y calcitriol en el suero de los ratones se utilizarán estuches comerciales de ELISA (Immunodiagnostic Systems, Scottsdale, AZ; y USCN Life Science & Technology Company, Texas, E.U.A., para 25OHD y calcitriol, respectivamente).

Si es pertinente, especificar los siguientes puntos:

Diseño del estudio: describir si es aleatorio/no aleatorio, controlado, de cohorte, tipo de cegamiento (doble-ciego, simple), tipo de controles (placebo, medicamento activo), periodo de lavado.

El estudio será abierto, controlado, prospectivo y comparativo. Tenemos dos grupos control: Aquél tratado con el vehículo de la 25OHD y el control en ausencia de vehículo.

b) Descripción de la maniobra o intervención

Las células se cultivarán como se mencionó anteriormente.

Los ratones se mantendrán en las condiciones arriba mencionadas, y la inducción tumoral, así como su evaluación se llevarán a cabo como se describió en "*Inducción tumoral en ratones atímicos y tratamientos*".

c) Tamaño de la muestra (# de pacientes a incluir; justificar el cálculo)

Los ratones se dividirán en 5 grupos con 5 individuos por grupo, por experimento. Los experimentos se repetirán al menos en 3 diferentes ocasiones. Las dosis consideradas de etanol y 25OHD corresponden a las previamente reportadas en modelos murinos [29,30].

d) Mecanismos de asignación del tratamiento

Los tratamientos se asignarán de acuerdo al cuadro incluido en "grupos de tratamiento".

e) Grupos de tratamiento

Grupo I	Control
Grupo II	Etanol/agua 5% peso/volumen (12.5 g de etanol / día / kg de peso /per os)
Grupo III	25OHD (2000 UI / kg de peso / i.p. / día)
Grupo IV	Vehículo de 25OHD
Grupo V	Etanol + 25OHD

f) Duración del seguimiento individual

Cada tercer día se pesarán los ratones, se evaluará el tamaño de la masa tumoral y se valorarán los animales para detectar la aparición de los signos determinados como puntos finales. Este esquema se realizará hasta el fin del experimento. La tabla de valoración de los puntos terminales se presenta a continuación (Tabla 1). Esta tabla de referencia se utilizará para calcular un puntaje final para cada individuo experimental, y permitirá definir su estado de manera objetiva en la tabla 2.

TABLA 1

Puntaje	Apariencia
2	Ojos brillantes, Sin ulceraciones ni alteraciones en piel
1	Ojos sin brillo / aparición hematomas en la piel
0	Ojos apagados, úlceras sangrantes, inflamación

en la zona de inyección

Puntaje	Conducta
3	Activo, interactivo con su ambiente
2	Actividad ligeramente decrementada
1	Disminución pronunciada de la actividad, aislamiento
0	Automutilación, inmóvil o hiperactivo

Puntaje	Conducta inducida
3	Rápidamente se desplaza
2	Se mueve lento o exageradamente
1	Se mueve solo después de un tiempo
0	No se mueve, o reacciona exageradamente

Puntaje	Conducta corporal
5	Obeso
4	Sobre peso
3	Normal
2	Delgado
1	Muy Flaco

TABLA 2

Fecha	Grupo	Tratamiento	Apariencia	Conducta	Conducta inducida	Condición corporal	Puntaje final
	I	a					
	I	b					
	I	c					

En el caso en el que la puntuación sea menor de 9, se considerará el sacrificio del animal.

Criterios de punto final humanitario: Se considerará como punto final humanitario cuando hay una falta de proporcionalidad entre el sufrimiento del animal y el beneficio obtenido, cuando el sufrimiento del animal ha excedido los límites humanitarios independientemente del beneficio obtenido y cuando por alguna causa los resultados científicos esperables ya no serán útiles por más que se continúe con el experimento.

8. METODOLOGÍA: CRITERIOS DE SELECCIÓN

a) **Criterios de inclusión (considerar que no participen en otras investigaciones y anticoncepción en caso necesario)**

Ratones hembra atímicos (*nu/nu*) con fondo genético BALB/c de 6-7 semanas de edad.

b) **Criterios de exclusión:**

No aplica.

c) **Criterios de eliminación**

Con la finalidad de respetar los criterios que se establecen en experimentos que involucran animales para la investigación establecidos por el comité de cuidado de los animales canadiense (*Canadian Council on Animal Care*), observaremos los siguientes elementos para la determinación de los puntos finales:

1. El crecimiento de la masa tumoral no deberá rebasar el punto donde el animal se vea afectado significativamente en sus funciones corporales normales (alimentación, desplazamiento, etc).

2. La carga tumoral en animales involucrados en experimentos terapéuticos no deberá exceder del 10% de su peso (17 mm en ratones de 25 g).
3. La masa tumoral no deberá provocar dolor, estrés o dificultad de movimiento debido a su localización en el cuerpo del animal.
4. La pérdida de peso del animal no debe exceder del 20 % (considerando la masa tumoral).
5. Ulceración o infección en el sitio del tumor.
6. Invasión del tejido adyacente a la masa tumoral.
7. Incontinencia o diarrea prolongada.
8. Distensión abdominal significativa o donde la carga de ascitis exceda del 10% del peso corporal básico.
9. Trauma autoinducido persistente.
10. Respiración laboriosa, descargas sanguinolentas o muco-purulentas por cualquier orificio.
11. Moribundo, letárgico o fallo en la respuesta a estímulos suaves.
12. Señales de dolor y angustia tales como: aislamiento, mordeduras, piloerección, lomo arqueado, ojos y abdomen hundidos, deshidratación.
13. Patrones alterados de la alimentación, de las conductas de aseo, automutilación y/o agresión.
14. Hipotermia.

En el caso de que aparezca alguna de estas señales se solicitará la evaluación por parte del veterinario asignado para el cuidado de los animales (MVZ. Octavio Villanueva), y se procederá, según el caso y la severidad del mismo, a la eliminación inmediata de forma humanitaria de los animales en cuestión.

9. METODOLOGÍA: DESENLACES Y VARIABLES

a) Variable/desenlace principal a medir principal

La variable principal a medir será el tiempo que tarde en aparecer la masa tumoral y el tamaño del tumor en los diferentes grupos experimentales. Además, el impacto del tratamiento en los citocromos de la vitamina D.

Se evaluarán los siguientes parámetros para valorar la efectividad del tratamiento preventivo:

- a) Tiempo que tarde en aparecer la masa tumoral.
- b) El número de ratones que generen tumor en cada grupo.
- c) El volumen tumoral final y el volumen relativo. Fórmulas:

Volumen Tumoral (mm^3): $VT = (a \times b^2) / 2$. Donde a y b corresponden al eje mayor y menor del tumor, respectivamente.

Volumen Relativo del Tumor: $VRT = VT \text{ al día } (n) / VT \text{ al día } 0 \times 100$. Este valor indica el porcentaje de incremento en los días indicados.

b) Variables/desenlaces secundarias a medir

Las variables secundarias serán el calcitriol, la 25OHD y el calcio iónico en suero, así como la expresión del marcador de proliferación Ki-67.

c) Frecuencia de las mediciones

Cada tercer día se pesarán los ratones y se evaluará el tamaño de la masa tumoral. Las determinaciones en sangre y el análisis de expresión génica se llevarán a cabo una vez terminado el experimento, en una sola ocasión.

d) Criterios de éxito y falla en caso necesario

Para determinar el éxito o falla de los tratamientos se considerarán los siguientes criterios: El retraso en la aparición de la masa tumoral así como menor VRT en el grupo tratado con 25OHD serán considerados criterios de éxito.

Criterio de falla sería si el tratamiento no refleja diferencias en los criterios arriba mencionados.

e) Estrategia de análisis estadístico.

Cuando corresponda deben especificarse y fundamentarse las técnicas, aparatos y/o instrumentos (esto incluye equipos mecánicos/electrónicos/cibernéticos especiales, formatos de evaluación, cuestionarios, tablas de cotejo, etc.) que se utilizarán en la medición, señalando los criterios de validez, reproducibilidad y controles de calidad que se tengan de los mismos.

La metodología para medir cada variable ha sido especificada en la sección de "metodología y diseño general del estudio". Las comparaciones (ya sea de las variables principales o secundarias) entre los diferentes grupos se llevarán a cabo aplicando la prueba de ANOVA. En el caso de un solo grupo vs. otro, aplicaremos T de Student. Todas las mediciones se registrarán en una libreta designada para ello, en donde se consignará el número de cada ratón y su grupo, el peso en gramos, el tamaño del tumor y las observaciones generales haciendo énfasis en la aparición de los puntos finales, si es el caso.

10. RIESGOS Y BENEFICIOS DEL ESTUDIO

a) Molestias generadas por el estudio (en caso de tomas de sangre, anotar el número total de punciones, la cantidad de sangre por punción y/o total y la frecuencia de las punciones.)

Las molestias generadas por el estudio consistirán en la administración del etanol y de la 25OHD.

b) Riesgos potenciales (presencia de complicaciones o efectos adversos, considerar interacciones medicamentosas, considerar efectos psicológicos de los métodos de evaluación, v.gr.:encuestas sobre temas sensibles)

Los riesgos potenciales quedarán limitados por la observación de los puntos finales.

c) Métodos de detección de los riesgos anticipados

No aplica

d) Medidas de seguridad para el diagnóstico oportuno y prevención de dichos eventos

Se observarán los puntos finales, mismos que han sido descritos en los criterios de eliminación en la sección de metodología.

e) Procedimientos a seguir para resolverlos en caso de que se presenten

En el caso de que aparezca alguna de las señales especificadas en los puntos finales del estudio, se solicitará la evaluación por parte del veterinario asignado para el cuidado de

los animales (MVZ. Octavio Villanueva), y se procederá, según el caso y la severidad del mismo, a proporcionar analgésicos o a la eliminación inmediata de forma humanitaria de los animales en cuestión. Para la identificación y tratamiento del dolor se considerarán los puntos especificados en las tablas 1 y 2, así como los descritos previamente (*Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, National Research Council*). Cuando de esta forma se presuma que los animales sufren dolor leve se administrará aspirina (120-300 mg/Kg de peso, vía oral).

f) Beneficios directos esperados

No aplica

g) Beneficios indirectos esperados

No aplica

h) Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto.

No aplica

11. COSTOS

a) Especificar costos (directos/indirectos, monetarios, en tiempo de participación, visitas/traslados) que la investigación genere para los sujetos del estudio (Especificar si las consultas, exámenes de laboratorio/gabinete y tratamientos médicos/quirúrgicos, generados con motivo del estudio serán o no cubiertos por el paciente/sujeto de investigación)

11. Costos

COSTOS TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN	
Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00
Animales	\$ 0.00
Equipos	\$ 20,000.00
Estudios	\$ 0.00
Materiales	\$ 0.00
Personal	\$ 426,196.00
Publicaciones	\$ 0.00
Suscripciones	\$ 0.00
Varios	\$ 0.00
Viaticos	\$ 0.00

No aplica

b) Especificar las compensaciones que se ofrecerán (reposición de gastos incurridos por la participación en el estudio; v.gr.: pago de transporte, alimentación, estancia, etc).

No aplica

c) Especificar los incentivos que se ofrecerán en caso que corresponda (se entiende incentivo como un ofrecimiento o influencia que compete a realizar una acción sin que implique una desviación importante con nuestro plan general de vida; v.gr.: dar un libro por haber participado)

No aplica

Nota: Una compensación/incentivo fuera de proporción se considera una actitud coercitiva.

12. CITAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Howell A (2010) The emerging breast cancer epidemic: early diagnosis and treatment. *Breast Cancer Res* 12 Suppl 4: S10.
2. Scoccianti C, Lauby-Secretan B, Bello PY, Chajes V, Romieu I (2014) Female breast cancer and alcohol consumption: a review of the literature. *Am J Prev Med* 46: S16-25.
3. Howe G, Rohan T, Decarli A, Iscovich J, Kaldor J, et al. (1991) The association between alcohol and breast cancer risk: evidence from the combined analysis of six dietary case-control studies. *Int J Cancer* 47: 707-710.
4. Boffetta P, Tubiana M, Hill C, Boniol M, Aurenco A, et al. (2009) The causes of cancer in France. *Ann Oncol* 20: 550-555.
5. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS (2007) Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 7: 684-700.
6. Shao T, Klein P, Grossbard ML (2012) Vitamin D and breast cancer. *Oncologist* 17: 36-45.
7. Krishnan AV, Trump DL, Johnson CS, Feldman D (2010) The role of vitamin D in cancer prevention and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am* 39: 401-418, table of contents.
8. Alvisa-Negrin J, Gonzalez-Reimers E, Santolaria-Fernandez F, Garcia-Valdecasas-Campelo E, Valls MR, et al. (2009) Osteopenia in alcoholics: effect of alcohol abstinence. *Alcohol Alcohol* 44: 468-475.
9. Shankar K, Liu X, Singhal R, Chen JR, Nagarajan S, et al. (2008) Chronic ethanol consumption leads to disruption of vitamin D3 homeostasis associated with induction of renal 1,25 dihydroxyvitamin D3-24-hydroxylase (CYP24A1). *Endocrinology* 149: 1748-1756.

10. Laitinen K, Valimaki M, Lamberg-Allardt C, Kivisaari L, Lalla M, et al. (1990) Deranged vitamin D metabolism but normal bone mineral density in Finnish noncirrhotic male alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 14: 551-556.
11. Wacker M, Holick MF (2013) Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. *Dermatoendocrinol* 5: 51-108.
12. Welsh J (2011) Vitamin D metabolism in mammary gland and breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 347: 55-60.
13. Lowe L, Hansen CM, Senaratne S, Colston KW (2003) Mechanisms implicated in the growth regulatory effects of vitamin D compounds in breast cancer cells. *Recent Results Cancer Res* 164: 99-110.
14. Garcia-Becerra R, Diaz L, Camacho J, Barrera D, Ordaz-Rosado D, et al. (2010) Calcitriol inhibits Ether-a go-go potassium channel expression and cell proliferation in human breast cancer cells. *Exp Cell Res* 316: 433-442.
15. Garcia-Quiroz J, Garcia-Becerra R, Barrera D, Santos N, Avila E, et al. (2012) Astemizole Synergizes Calcitriol Antiproliferative Activity by Inhibiting CYP24A1 and Upregulating VDR: A Novel Approach for Breast Cancer Therapy. *PLoS One* 7: e45063.
16. Chen P, Hu P, Xie D, Qin Y, Wang F, et al. (2010) Meta-analysis of vitamin D, calcium and the prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 121: 469-477.
17. Gilbert R, Martin RM, Fraser WD, Lewis S, Donovan J, et al. (2012) Predictors of 25-hydroxyvitamin D and its association with risk factors for prostate cancer: evidence from the prostate testing for cancer and treatment study. *Cancer Causes Control* 23: 575-588.
18. Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Grant WB, Giovannucci EL, et al. (2007) Vitamin D and prevention of breast cancer: pooled analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103: 708-711.
19. Hatse S, Lambrechts D, Verstuyl A, Smeets A, Brouwers B, et al. (2012) Vitamin D status at breast cancer diagnosis: correlation with tumor characteristics, disease outcome, and genetic determinants of vitamin D insufficiency. *Carcinogenesis* 33: 1319-1326.
20. Boyle P, Boffetta P (2009) Alcohol consumption and breast cancer risk. *Breast Cancer Res* 11 Suppl 3: S3.
21. Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Calle EE, et al. (2002) Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer* 87: 1234-1245.
22. Chen WY, Rosner B, Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC (2011) Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. *JAMA* 306: 1884-1890.
23. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Hennekens CH, et al. (1987) Moderate alcohol consumption and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 316: 1174-1180.
24. Das SK, Vasudevan DM (2007) Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci* 81: 177-187.
25. Coronado GD, Beasley J, Livaudais J (2011) Alcohol consumption and the risk of breast cancer. *Salud Publica Mex* 53: 440-447.

26. Seitz HK, Pelucchi C, Bagnardi V, La Vecchia C (2012) Epidemiology and pathophysiology of alcohol and breast cancer: Update 2012. *Alcohol Alcohol* 47: 204-212.
27. Crawford BA, Labio ED, Strasser SI, McCaughan GW (2006) Vitamin D replacement for cirrhosis-related bone disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3: 689-699.
28. Garcia-Quiroz J, Rivas-Suarez M, Garcia-Becerra R, Barrera D, Martinez-Reza I, et al. (2014) Calcitriol reduces thrombospondin-1 and increases vascular endothelial growth factor in breast cancer cells: Implications for tumor angiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*.
29. Mercer KE, Wynne RA, Lazarenko OP, Lumpkin CK, Hogue WR, et al. (2012) Vitamin D supplementation protects against bone loss associated with chronic alcohol administration in female mice. *J Pharmacol Exp Ther* 343: 401-412.
30. Vorderstrasse BA, Wang T, Myers AK, Wyrick KL, Meadows GG (2012) Alcohol consumption suppresses mammary tumor metastasis in a syngeneic tumor transplantation model. *Breast Cancer Res Treat* 136: 729-737.



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición

Salvador Zubirán

INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

SALVADOR ZUBIRAN

Dirección de Investigación

FORMA ÚNICA PARA REGISTRO DE
PROYECTOS

FECHA DE RECEPCIÓN: 27/05/2014

CLAVE: BRE-1291-14/15-1

TÍTULO: Influencia del consumo de alcohol sobre el metabolismo de la vitamina D y su impacto en el desarrollo del cáncer de mama

INVESTIGADOR RESPONSABLE: DIAZ NIETO LORENZA

DEPARTAMENTO O SERVICIO: DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

TIPO DE INVESTIGACIÓN: INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

PATROCINADORES:

Patrocinador	Cantidad
CONACYT	\$ 446,196.00

VIGENCIA DEL PROYECTO: Del 01/06/2014 al 31/05/2015

Trimestre 1

Trimestre 2

Trimestre 3

Trimestre 4

COSTO TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN		INSTITUCIONES PARTICIPANTES	
Personal	\$ 426,196.00		
(sueldos y sobresueldos al personal)			
Equipos	\$ 20,000.00		
(de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)			
Materiales	\$ 0.00		
(reactivos, consumibles, desechables, etc.)			
Animales	\$ 0.00		
(adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)			
Estudios	\$ 0.00		
(de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)			
Viáticos	\$ 0.00		
(reuniones científicas y trabajo de campo)			
Publicaciones	\$ 0.00		
		FIRMAS	
		Investigador responsable	Jefe de Departamento
		Comité de Investigación en Humanos	Comité de Investigación en Animales
		Director de Investigación	Director General
		Fecha de resolución	
		30-JUN-2014	



Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán

FORMATO DE EVALUACIÓN DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
COMITÉ INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN HUMANOS
FORMATO DE EVALUACIÓN DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

No. de registro CIIBH: BRE-1291-14/17-1

Influencia del consumo de alcohol sobre el metabolismo de la vitamina D y su impacto en el desarrollo del cáncer de mama

INVESTIGADORES

2a. IDENTIFICACIÓN DE INVESTIGADORES

Nombre, firma y adscripción de cada uno de los investigadores participantes. El investigador principal deberá ser un profesional adscrito a la Institución.

INVESTIGADOR	ADSCRIPCIÓN	POSICIÓN EN EL PROYECTO	FIRMA
Lorenza Díaz Nieto	INCMNSZ	Responsable	
Janice García Quiroz	INCMNSZ	Investigador	
Rocío García Becerra	INCMNSZ	Investigador	
Octavio Villanueva Sánchez	INCMNSZ	Veterinario	

2b. PERTINENCIA DEL GRUPO DE INVESTIGADORES. CON RESPECTO DEL PROYECTO

Brevemente describa las calificaciones del grupo investigador con respecto del proceso de investigación científica en general y con respecto del proyecto presentado (v.gr.: grado académico, experiencia laboral, miembro del sistema de investigadores de los INS, del SNI, etc).

- La Dra. Lorenza Díaz cuenta con amplia experiencia en el campo de los efectos biológicos del calcitriol en procesos de salud y enfermedad, manejo de cultivos y técnicas de biología molecular. Ha asesorado tesis de pre y posgrado. Es SNI nivel II. Cuenta con 42 artículos publicados.
- La Dra. Janice García Quiroz tiene gran experiencia en el manejo de animales, biología molecular, técnicas generales de laboratorio y cultivo celular. Es Dra. en Ciencias con especialidad en Farmacología. Cuenta con 4 publicaciones y actualmente está en evaluación en el SNI.
- La Dra. García Becerra cuenta con amplia experiencia en el estudio de compuestos esteroideos utilizados en la anticoncepción y terapia endocrina. Es SNI nivel II.

Cuenta con 34 artículos publicados, ha graduado dos alumnos de pregrado y uno de posgrado.

- El Dr. Octavio Villanueva es integrante del Comité de Investigación en Animales del INCMNSZ. Posee amplia experiencia en la producción y mantenimiento de ratones Balb/c y transgénicos. Perteneció a la Asociación Mexicana de Cirugía Experimental.

➤ INSTITUCIONES PARTICIPANTES

Nombre y dirección de la o las instituciones participantes. Para estudios multicéntricos añadir los datos del centro

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 14000
México, D.F., México.
Tel. (525) 555 73 11 60; Fax: (525) 556 55 98 59

PATROCINIO

4b. ORGANISMOS PATROCINADORES

Nombre, dirección y teléfono de la o las organizaciones, instituciones o laboratorios que aportarán recursos.

El proyecto ha sido sometido a la convocatoria del CONACYT denominada "Apoyos complementarios para la Consolidación Institucional de Grupos de Investigación Retenciones 2014"

4b. ESPECIFICAR SI LOS INVESTIGADORES RECIBEN PAGO (MONETARIO O EN ESPECIE) POR SU PARTICIPACIÓN ESPECÍFICA EN LA INVESTIGACIÓN

No

5. MARCO TEÓRICO

Explicar detalladamente los fundamentos disponibles a la fecha en los que se basa el estudio que se propone (sentido biológico, datos de experimentos en animales o en humanos):

a) Antecedentes:

En el mundo, la tasa de mortalidad por carcinoma mamario ha mostrado una tendencia creciente, ocupando el primer lugar en incidencia. En México, el cáncer de mama representa un desafío en materia de salud pública ya que constituye la primera causa de

defunción por enfermedad neoplásica en la mujer en edad reproductiva. Además, se ha estimado que para el 2020 la mortalidad asociada a dicho cáncer se incrementará en 100% en países en desarrollo [1], por lo que resulta evidente la necesidad de fortalecer en nuestro país la investigación orientada a comprender los procesos implicados en la génesis de dicha patología, con la finalidad de desarrollar nuevas estrategias de tratamiento y prevención.

Se han descrito diversos factores de riesgo implicados en el desarrollo del cáncer de mama; tales como la edad y factores genéticos, nutricios y hormonales, entre otros. Sin embargo, el consumo de bebidas alcohólicas es probablemente el factor de riesgo prevenible y evitable con mayor importancia y repercusión [2]. Se ha determinado que el consumo crónico de alcohol puede derivar en cáncer; y en particular, la posibilidad de padecer cáncer de mama se incrementa de acuerdo al nivel de consumo. En mujeres que consumieron 40 g de alcohol o más por día, se observó un riesgo significativamente alto de desarrollar cáncer de mama comparado con no bebedores: 1.69 (95% CI, 1.19 a 2.40) [3]. De hecho, 9.4% de todos los tumores mamarios se atribuyen al consumo de alcohol [4]. A pesar de que se ha establecido una relación causal entre el consumo de alcohol y el riesgo de desarrollar cáncer de mama, los mecanismos involucrados no han sido aún del todo descritos.

Otro factor de riesgo implicado en el carcinoma mamario es la deficiencia de vitamina D (VD). La asociación entre la deficiencia de VD y el desarrollo de diversos tipos de cáncer ha sido ampliamente descrita [5]. El metabolito de la VD responsable de ejercer sus efectos biológicos es el calcitriol, el cual es un secoesteroide con potente actividad antiproliferativa y prodiferenciante. El calcitriol se produce en diversos tejidos incluida la glándula mamaria, en donde modula proteínas clave implicadas en la proliferación y diferenciación celular. El papel protector de la VD en la mama se sustenta en parte por la presencia de los componentes del sistema de señalización de la VD en dicho tejido; es decir, las enzimas involucradas en su metabolismo y el receptor para la VD (VDR), que es el factor de transcripción que media sus efectos [6,7].

Por otro lado, se sabe que el alcohol interfiere con el metabolismo de la VD, y en consecuencia, los bebedores crónicos pueden presentar bajos niveles de calcitriol y de su precursor [8-10]. Sin embargo, se desconoce el efecto que tiene el etanol sobre la expresión de las enzimas responsables de la síntesis y degradación del calcitriol en la glándula mamaria.

Considerando lo anterior, en el presente trabajo se estudiará el impacto del etanol sobre el metabolismo de la vitamina D en células de cáncer de mama in vitro e in vivo, con la finalidad de determinar si el consumo crónico de alcohol resulta en la inhibición de la producción local de calcitriol y consecuentemente incrementa el riesgo de desarrollar tumores mamarios.

Metabolismo y efectos antineoplásicos de la vitamina D

El metabolismo de la VD comienza en la piel, donde el 7-dehidrocolesterol al exponerse a la radiación ultravioleta se transforma en colecalciferol. El colecalciferol, que también puede obtenerse en menor medida de la dieta, es hidroxilado en el hígado por la enzima VD-25-hidroxilasa (CYP27A1) para convertirse en 25-hidroxivitamina D (25OHD), indicador del estado nutricional de la VD. Este metabolito, si bien es el más abundante, no es la forma activa. En el riñón la 25OHD es hidroxilada por la 25OHD-1 α hidroxilasa (CYP27B1) con lo que se obtiene el calcitriol, forma hormonal y activa de la VD. La enzima 25OHD-24-hidroxilasa (CYP24A1) es responsable del catabolismo del calcitriol [11]. Tanto la CYP27B1 como la CYP24A1 y el VDR se expresan en la glándula mamaria [12].

Los efectos antitumorales del calcitriol se producen a través de diversos mecanismos como la inducción de la apoptosis, citodiferenciación y arresto del ciclo celular. En un tejido dado, los efectos del calcitriol no solo dependen de la presencia y funcionalidad del VDR, sino también de la expresión local de los genes CYP27B1 y CYP24A1, que como ya se mencionó, codifican para las enzimas encargadas de la síntesis y degradación del calcitriol, respectivamente. La CYP24A1 se encuentra sobre-expresada en algunas neoplasias, sugiriendo su participación en la tumorigénesis. Algunos de los marcadores clínicamente relevantes que son modulados por el calcitriol en la mama son el gen que codifica para el inhibidor de cinasas dependiente de ciclinas p21, el gen supresor de tumores p53, el factor de transcripción c-Myc y la ciclina D1 [13]. Nuestro grupo de investigación ha contribuido en el conocimiento de los mecanismos implicados en los efectos antiproliferativos del calcitriol, ya que demostramos que el calcitriol es un potente inhibidor de la expresión del oncogen KCNH1 en células derivadas de tumores mamarios con diferente fenotipo, resultando en la inhibición significativa de la proliferación celular [14, 15].

Deficiencia de vitamina D y cáncer de mama

Múltiples trabajos epidemiológicos, preclínicos y clínicos han mostrado los beneficios de la VD en la prevención del cáncer de mama, observándose una relación inversa entre los

niveles séricos de 25OHD y el desarrollo de esta neoplasia, de su recurrencia y de la tasa de mortalidad [6,16]. Concentraciones de 25OHD < 20 ng/ml, 20–30 ng/ml y de 30–80 ng/ml indican deficiencia, insuficiencia y suficiencia, respectivamente [17]. En particular, mujeres con niveles séricos de 25OHD de 52 ng/mL tuvieron 50% menos incidencia de cáncer de mama en comparación con aquellas con concentraciones de 25OHD <13 ng/ml [18]. Por otro lado, concentraciones elevadas de 25OHD en el suero al momento de diagnosticar la neoplasia correlacionaron con menor tamaño tumoral y mejor pronóstico [19]. Estas investigaciones sugieren fuertemente que mantener niveles adecuados de VD es beneficioso para prevenir la aparición y la recurrencia de tumores de mama. Sin embargo, a pesar de estas prometedoras observaciones, la suplementación con VD y el análisis rutinario de los niveles séricos de 25OHD no se han implementado como medidas para la prevención del cáncer de mama en mujeres con riesgo de desarrollarlo, así como tampoco se han estudiado los factores potencialmente modificables que puedan afectar el metabolismo de la VD.

Metabolismo del alcohol y su relación con el cáncer de mama

En general, las neoplasias más frecuentes relacionadas con el consumo de alcohol son el cáncer hepático, de faringe, cavidad oral, esófago, colon y glándula mamaria [2]. En particular, la relación causal entre el alcohol y el cáncer de mama se sustenta en diversas investigaciones in vitro e in vivo, así como estudios epidemiológicos y meta-análisis [20]. Se calcula que por cada bebida alcohólica adicional consumida por día, el riesgo de desarrollar cáncer de mama se incrementa del 2% (riesgo relativo [RR]=1.02, 95% CI=1.01, 1.03) hasta el 12% (RR=1.12, 95% CI=1.09, 1.14) [2]. De acuerdo a algunos estudios observacionales, a mayor consumo de alcohol aumenta de forma lineal el riesgo de presentar cáncer de mama, y un estudio menciona que el riesgo relativo se incrementa en 7.1% por cada 10 g de alcohol consumido por día [21]. La exposición al alcohol se puede medir por ingesta de etanol en número de bebidas por día o por semana, considerando que cada bebida contiene en promedio 10-12 g de etanol puro. Recientemente, Chen y colaboradores demostraron que incluso el consumo moderado (tres a seis copas de vino a la semana, equivalente a 5 - 9.9 g/día) también aumentó la probabilidad de desarrollar cáncer de mama (RR, 1.15; 95% CI, 1.06-1.24), y que este riesgo se sumaba a cualquier otro que la mujer ya tenía, por ejemplo, antecedentes familiares [22]. En mujeres menores de 55 años de edad sin factores de riesgo, el riesgo relativo asociado con el consumo ≥ 15 g de alcohol / día fue de 2.5 (95% CI, 1.5 a 4.2) [23].

Los mecanismos implicados en la acción carcinogénica del alcohol en la glándula mamaria no han sido del todo dilucidados; sin embargo, se sabe que el metabolismo del alcohol produce especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno, causando estrés oxidativo, lo que puede causar mutaciones y daño al DNA [24]. Por otro lado, el consumo de alcohol se asocia con el desarrollo de tumores que expresan al receptor de estrógenos y progesterona (ER, PR), así como con el incremento de estrógenos circulantes [25].

El metabolismo del etanol se lleva a cabo primordialmente en el hígado, donde es oxidado a acetaldehído por acción de la alcohol deshidrogenasa (ADH) y del citocromo P450 2E1. El acetaldehído, metabolito más tóxico del alcohol y carcinogénico per se, es a su vez oxidado a acetato mediante la enzima acetaldehído deshidrogenasa (ALDH). Sin embargo, una proporción del etanol presente en la circulación sanguínea puede alcanzar la glándula mamaria, donde es convertido a acetaldehído por la ADH que se expresa en ese sitio. El acetaldehído es capaz de inducir deleciones en las cadenas de DNA, aberraciones cromosómicas y generar aductos con proteínas y DNA. La formación de aductos con proteínas puede inhibir su funcionalidad, mientras que los aductos de DNA pueden ser el inicio de un proceso cancerígeno [26]. Tanto el etanol como el acetaldehído incrementan la expresión de receptores a hormonas, tales como el ER y el PR. Por otro lado, el etanol estimula la proliferación celular y la actividad transcripcional del ER unido a su ligando, lo cual en conjunto, aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de mama [25]. Sin embargo, la señalización estrogénica no explica del todo la asociación positiva observada entre el consumo de alcohol y el desarrollo de cáncer, por lo que los mecanismos implicados en este proceso necesitan ser clarificados.

b) Definición del problema:

Impacto del consumo de alcohol en las funciones de la vitamina D

Desde hace algunas décadas se sabe que el consumo crónico de alcohol se asocia con alteraciones en la homeostasis del calcio, tales como la hipocalcemia, reducción de la densidad mineral ósea, bajo recambio óseo y aumento del riesgo de fracturas. Lo anterior puede explicarse, al menos en parte, por trastornos en el metabolismo de la VD. En apoyo a lo anterior, en un modelo murino el consumo crónico de etanol disminuyó la expresión de CYP27B1 mientras que aumentó la expresión de CYP24A1 en el riñón [9]. Probablemente como consecuencia de esto último, el alcoholismo se relaciona con concentraciones plasmáticas reducidas de calcitriol y de 25OHD, lo que se agrava en

casos de cirrosis, donde se ha reportado que el 66 % de los pacientes con esta patología cursan con niveles reducidos de VD [27]. Por todo lo anterior, nos enfocamos en el estudio del efecto del etanol sobre el metabolismo de la VD en células de cáncer de mama in vitro e in vivo, particularmente en la expresión de las enzimas clave involucradas en la síntesis y degradación del calcitriol.

c) Justificación:

En el mundo, el cáncer de mama representa un desafío en materia de salud pública ya que constituye la primera causa de defunción por enfermedad neoplásica en la mujer en edad reproductiva. La tasa de mortalidad por carcinoma mamario ha ido en aumento, ocupando el primer lugar en incidencia. Se estima que para el 2020 la mortalidad asociada a dicho cáncer se incrementará en 100%. Por ello, es fundamental fortalecer la investigación que permita comprender los procesos implicados en la génesis de dicha patología, con la finalidad de desarrollar nuevas estrategias de tratamiento y prevención.

Se han descrito diversos factores de riesgo implicados en el desarrollo del cáncer de mama; sin embargo, el consumo de bebidas alcohólicas es probablemente el factor de riesgo prevenible y evitable con mayor importancia y repercusión. De hecho, 9.4% de todos los tumores mamarios se atribuyen al consumo de alcohol. A pesar de que se ha establecido una relación causal entre el consumo de alcohol y el riesgo de desarrollar cáncer de mama, los mecanismos involucrados no han sido aún del todo descritos. Otro factor de riesgo implicado con el carcinoma mamario es la deficiencia de vitamina D (VD). La asociación entre la deficiencia de VD y el desarrollo de cáncer es bien conocida. El metabolito de la VD responsable de ejercer sus efectos biológicos es el calcitriol, el cual es un secoesteroide con potente actividad antiproliferativa y prodiferenciante. Por otro lado, se sabe que el alcohol interfiere con el metabolismo de la VD, y en consecuencia, los bebedores crónicos pueden presentar bajos niveles de calcitriol y de su precursor. Sin embargo, se desconoce el efecto que tiene el etanol sobre la expresión de las enzimas responsables de la síntesis y degradación del calcitriol en las células de la mama y su repercusión en procesos carcinogénicos.

Considerando lo anterior, el presente trabajo se justifica por las siguientes razones:

1. Se estudiará el impacto del etanol sobre el metabolismo de la vitamina D en células de cáncer de mama *in vitro* e *in vivo*, con la finalidad de determinar si el consumo crónico de alcohol resulta en la inhibición de la producción local de calcitriol y consecuentemente incrementa el riesgo de desarrollar tumores mamarios.

2. Se creará conciencia de la necesidad de implementar programas de prevención y tratamiento que contemplen la suplementación con VD o sus metabolitos.

3. Se fortalecerá el grupo de Investigación del cual uno de sus objetivos es prioridad en el ámbito de salud pública: la prevención y el tratamiento del cáncer de mama.

4. Se proporcionará la posibilidad a un joven investigador de alto desempeño y brillante trayectoria científica, de consolidar su proyección.

5. Se formarán recursos humanos en el ámbito científico.

6. Se generará conocimiento científico importante para coadyuvar en la lucha para la prevención y el combate del cáncer de mama.

6a. HIPÓTESIS

Definido como un enunciado comprobable acerca de la relación entre una variable dependiente y una variable independiente.

El consumo de alcohol afectará el metabolismo de la vitamina D favoreciendo la generación acelerada de tumores mamarios cuando existe un núcleo de células malignas.

6b. OBJETIVOS

Aquellos que se esperan obtener puntualmente en el estudio y especificados como objetivo general y objetivos específicos.

- **Objetivo general**

Estudiar el impacto del consumo de alcohol sobre el metabolismo de la vitamina D y sus efectos oncoprotectores en células de cáncer de mama *in vitro* e *in vivo*.

- **Objetivos particulares**

Evaluar el efecto *in vitro* del etanol sobre la expresión génica y proteica de las enzimas CYP27B1 y CYP24A1 en las líneas celulares T-47D y SUM-229PE.

Inducir tumores de cáncer de mama humano en ratones atímicos nu/nu para estudiar la expresión de CYP27B1 y CYP24A1 en la masa tumoral en los diferentes grupos experimentales.

Estudiar el posible efecto adverso del consumo crónico de alcohol sobre la actividad protectora de la VD en el cáncer mamario *in vivo*, mediante la evaluación del desarrollo tumoral en un modelo murino.

Evaluar los niveles séricos de 25OHD y calcitriol en los diferentes grupos experimentales de ratones.

Evaluar la expresión del marcador de proliferación Ki-67 en los tumores de los ratones.

7. METODOLOGÍA: DISEÑO GENERAL

Describir el diseño general del estudio

Se utilizarán dos líneas celulares establecidas de cáncer de mama humano con diferente fenotipo: T-47D (ER+) y SUM-229PE (ER-), de ATCC, Manassas VA y Asterand, San Francisco CA, respectivamente. Nuestro laboratorio cuenta con estas líneas celulares actualmente y los efectos del calcitriol han sido probados *in vitro* en términos de respuesta a la inhibición del crecimiento e inducción de la CYP24A1, demostrando la expresión y funcionalidad del VDR en varios trabajos de nuestro grupo [14,15]. Además, la línea T-47D es tumorigénica por lo que se utilizará para los xenoinjertos en el modelo murino, tal como lo hemos hecho previamente [28]. El calcitriol (1,25-dihidroxivitamina D₃) ha sido donado por Hoffmann-La Roche Ltd. (Basel, Suiza), mientras que el colecalciferol se adquirirá de Sigma-Aldrich. El etanol en solución se preparará a partir de vodka comercial.

Cultivo celular: Las células T-47D y SUM-229PE se cultivarán siguiendo las indicaciones de los proveedores. Los procedimientos experimentales se llevarán a cabo en medio DMEM-F12 (Invitrogen; CA, EUA), suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado y tratado con carbón-dextrán.

Inducción tumoral en ratones atímicos y tratamientos

Se utilizarán ratones hembra atímicos (nu/nu) con fondo genético BALB/c de 6-7 semanas de edad. Los ratones se manipularán observando los lineamientos de la ley mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). El protocolo se someterá para su evaluación al comité institucional para la investigación en animales (CINVA). Los ratones se mantendrán en

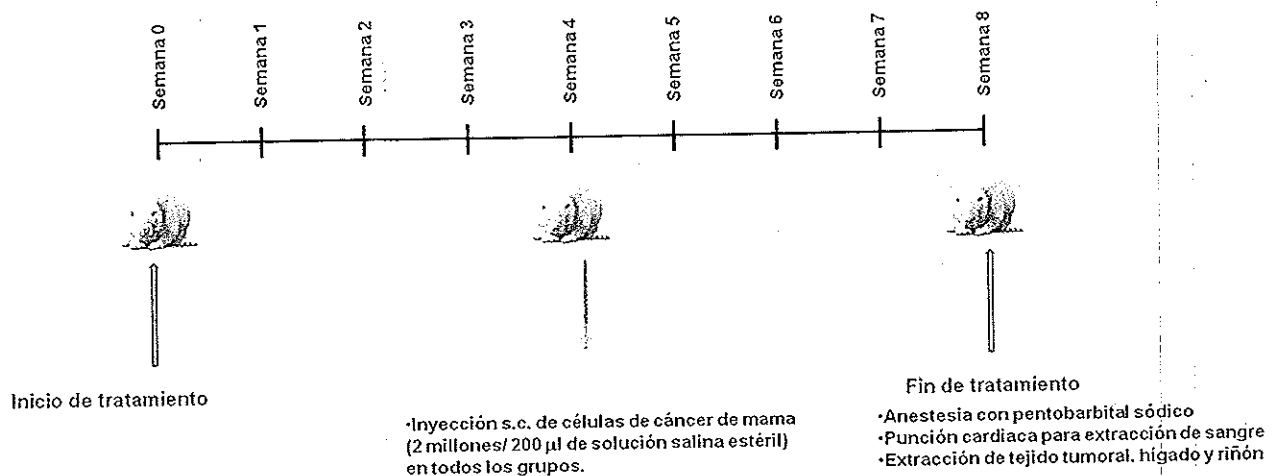
microaisladores ventilados (34 cambios de aire/hora) bajo condiciones de humedad y temperatura constantes ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), ciclos de luz-oscuridad de 12/12 horas y alimento (estándar PMI 5001). La línea celular tumorigénica (2×10^6 células/0.1 ml solución fisiológica estéril) se inoculará por vía subcutánea en el flanco lateral derecho de los ratones atímicos. Cada tercer día se medirán parámetros conductuales y físicos para determinar causales de punto final.

Los grupos experimentales así como el esquema de tratamiento se detallan en el siguiente esquema. Los ratones se dividirán en 5 grupos con 5 individuos por grupo, por experimento. Los experimentos se repetirán al menos en 3 diferentes ocasiones. Las dosis consideradas de etanol y 25OHD corresponden a las previamente reportadas en modelos murinos [29,30].

Se estima que cada ratón bebe de 5-7 mL de agua por día, lo que se tomó en consideración para calcular el volumen de etanol que se adicionará al agua del bebedero. Se utilizó la fórmula:

$$\text{gr de etanol} = V \text{ (en dL)} \times \text{graduación de la bebida} \times 0.8$$

Grupo I	Control
Grupo II	Etanol/agua 5% peso/volumen (12.5 g de etanol / día / kg de peso / per os)
Grupo III	25OHD (2000 UI / kg de peso / i.p. / día)
Grupo IV	Vehículo de 25OHD
Grupo V	Etanol + 25OHD



A los ratones de los grupos II, III, IV y V se les administrarán los tratamientos indicados durante cuatro semanas antes de la inyección de las células y se mantendrán por 4 semanas más después de la inyección. El grupo I es el grupo control, por lo que solo se le injertarán las células tumorigénicas. A partir de la inyección de la inoculación se evaluará: 1) el tiempo que tarde en

aparecer la masa tumoral, 2) el número de ratones que generen tumor en cada grupo y 3) el volumen tumoral final. Las mediciones de los tumores se realizarán mediante un calibrador vernier cada tercer día y se evaluarán los siguientes parámetros:

- **Volumen tumoral (mm³):** $VT = (a \times b^2) / 2$. Donde *a* y *b* corresponden al eje mayor y menor del tumor respectivamente.
- **Volumen relativo del tumor:** $VRT = VT \text{ final} / VT \text{ inicial} \times 100$. Este valor indica el porcentaje de incremento del tumor al final del tratamiento con respecto al volumen tumoral inicial.

Al término del experimento (ocho semanas posteriores al inicio del tratamiento) se sacrificarán los animales mediante anestesia terminal utilizando pentobarbital sódico. Se colectará la sangre por punción cardíaca y se obtendrá el tejido tumoral, el hígado y un riñón. Estos dos últimos tejidos se usarán para estudiar el efecto del etanol sobre la expresión de las enzimas del metabolismo de VD, a manera de control. El suero se congelará y se utilizará para evaluar posteriormente la concentración de calcitriol, 25OHD y calcio sérico. El tumor se dividirá en dos partes: una se congelará inmediatamente en nitrógeno líquido para la extracción de RNA y la otra se almacenará a -70°C en solución RIPA (fosfato de sodio dibásico 9.1 mM, fosfato de sodio monobásico 1.7 mM, NaCl 150 Mm, Nonidet P-40, 0.1% SDS, pH 7.4) para extracción de proteínas.

Efectos del etanol sobre la expresión génica de CYP27A1, CYP27B1 y CYP24A1

Las células se cultivarán en presencia de diferentes concentraciones de etanol durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, se aspirará el medio y se extraerá el RNA utilizando Trizol®. Para los estudios *in vivo*, el tejido tumoral, el hígado y un riñón de los ratones se homogenizarán en Trizol. Tres µg de RNA se utilizarán para la reacción de retrotranscripción. La reacción de amplificación en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) se llevará a cabo en el instrumento LightCycler® 2.0 de Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) de acuerdo al siguiente protocolo: activación de la Taq DNA polimerasa a 95 °C x 10 minutos, seguido de 45 ciclos de amplificación de 95 °C x 10 segundos, 60 °C x 30 segundos y 72 °C x 1 segundo. La expresión relativa de los genes de interés se normalizará contra la expresión del gen constitutivo gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en el caso de células humanas (h), y β-Actina para las de ratón (m). Las secuencias de los oligonucleótidos serán las siguientes: para hCYP24A1 (NM_000782.3 / sonda 88): catcatggccatcaaaaca / gcagctcgactggagtgac; para mCYP24A1 (NM_009996.3 / sonda 78): aactgtacgctgctgtcacc / aatccacatcaagctgtttgc; para hCYP27B1 (NM000785.2/sonda 63): ctgctggactgctcactg / cgcagactacgtgttcagg; para mCYP27B1 (NM_010009.2 / sonda 3): gagttttacaaattggcctagaaa / gtgtcaggaggacttcagc; para mCYP27A1 (NM_024264.4/sonda 66): cctcacctatgggatcttcac / ttaaggcatccgtgtagagc; mβ-Actina (M12481.1 /

sonda 56): aaggccaaccgtgaaaagat / gtgttacgaccagaggcatcac y para hGAPDH (AF261085.1 / sonda 60): agccacatcgctgagacac / gcccaatcagaccaaacc.

Efecto del etanol sobre la expresión del marcador de proliferación Ki-67 en la masa tumoral

Con la finalidad de conocer el impacto de los tratamientos sobre la proliferación celular en los tumores generados, elegimos un marcador que es ampliamente utilizado en la clínica: Ki-67. Para ello se utilizarán los siguientes oligonucleótidos: ggtgtgcagaaaatccaaaga / actgtccctatgacttctggt (X65550.1/ sonda 73) y se realizará el procedimiento arriba descrito.

Efecto del etanol en la abundancia de las proteínas involucradas en el metabolismo de la VD

Las células se tratarán con diferentes concentraciones de etanol durante 48 h. Al cabo de este tiempo las células se tripsinizarán y centrifugarán para ser lisadas con solución RIPA en presencia de inhibidores de proteasas. Los tejidos provenientes de ratones se homogenizarán también en RIPA a 4°C. Los lisados celulares (50 µg) se separarán en geles de poliacrilamida (10% SDS-PAGE) bajo condiciones desnaturizantes y reductoras. Las proteínas se transferirán a membranas PVDF, que se bloquearán con 10% de leche descremada en PBS. Las membranas se incubarán en presencia de anti-mCYP27A1 (hígados); anti CYP27B1 y anti CYP24A1 (tumores, células de cáncer de mama y riñón). Posteriormente se incubarán con segundo anticuerpo conjugado a la peroxidasa y se visualizarán con el reactivo ECL+ plus (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia). Las imágenes serán capturadas y las bandas cuantificadas con el instrumento ChemiDoc (BioRad). Para la normalización, las membranas se colocarán en solución de lavado (2% w/v SDS, 62.5 mM Tris-HCL pH 6.8, 100 mM 2-mercapto-etanol) con agitación durante 10 minutos y posteriormente se incubarán con anti-hGAPDH o anti- β -Actina.

Determinación del calcio total en suero

Con la finalidad de investigar posibles alteraciones en el metabolismo del calcio como consecuencia de los tratamientos, se determinará el calcio total en el suero de los ratones mediante el método del ion selectivo, que determina la concentración de calcio total por potenciómetro indirecto, utilizando un instrumento Synchrom Clinical System CX5 PRO, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, E.U.A., como se reportó previamente [28].

Determinación de calcitriol y 25OHD en suero

Para la cuantificación de 25OHD y calcitriol en el suero de los ratones se utilizarán estuches comerciales de ELISA (Immunodiagnostic Systems, Scottsdale, AZ; y USCN Life Science & Technology Company, Texas, E.U.A., para 25OHD y calcitriol, respectivamente).

Si es pertinente, especificar los siguientes puntos:

Diseño del estudio: describir si es aleatorio/no aleatorio, controlado, de cohorte, tipo de cegamiento (doble-ciego, simple), tipo de controles (placebo, medicamento activo), periodo de lavado.

El estudio será abierto, controlado, prospectivo y comparativo. Tenemos dos grupos control: Aquél tratado con el vehículo de la 25OHD y el control en ausencia de vehículo.

b) Descripción de la maniobra o intervención

Las células se cultivarán como se mencionó anteriormente.

Los ratones se mantendrán en las condiciones arriba mencionadas, y la inducción tumoral, así como su evaluación se llevarán a cabo como se describió en *"Inducción tumoral en ratones atímicos y tratamientos"*.

c) Tamaño de la muestra (# de pacientes a incluir; justificar el cálculo)

Los ratones se dividirán en 5 grupos con 5 individuos por grupo, por experimento. Los experimentos se repetirán al menos en 3 diferentes ocasiones. Las dosis consideradas de etanol y 25OHD corresponden a las previamente reportadas en modelos murinos [29,30].

d) Mecanismos de asignación del tratamiento

Los tratamientos se asignarán de acuerdo al cuadro incluido en "grupos de tratamiento".

e) Grupos de tratamiento

Grupo I	Control
Grupo II	Etanol/agua 5% peso/volumen (12.5 g de etanol / día / kg de peso /per os)
Grupo III	25OHD (2000 UI / kg de peso / i.p. / día)
Grupo IV	Vehículo de 25OHD
Grupo V	Etanol + 25OHD

f) Duración del seguimiento individual

Cada tercer día se pesarán los ratones, se evaluará el tamaño de la masa tumoral y se valorarán los animales para detectar la aparición de los signos determinados como puntos finales. Este esquema se realizará hasta el fin del experimento. La tabla de valoración de los puntos terminales se presenta a continuación (Tabla 1). Esta tabla de referencia se utilizará para calcular un puntaje final para cada individuo experimental, y permitirá definir su estado de manera objetiva en la tabla 2.

TABLA 1

Puntaje	Apariencia
2	Ojos brillantes, Sin ulceraciones ni alteraciones en piel
1	Ojos sin brillo / aparición hematomas en la piel
0	Ojos apagados, úlceras sangrantes, inflamación en la zona de inyección

Puntaje	Conducta
3	Activo, interactivo con su ambiente
2	Actividad ligeramente decrementada
1	Disminución pronunciada de la actividad, aislamiento
0	Automutilación, inmóvil o hiperactivo

Puntaje	Conducta inducida
3	Rápidamente se desplaza
2	Se mueve lento o exageradamente
1	Se mueve solo después de un tiempo
0	No se mueve, o reacciona exageradamente

Puntaje	Conducta corporal
5	Obeso
4	Sobre peso
3	Normal
2	Delgado
1	Muy Flaco

TABLA 2

Fecha	Grupo	Tratamiento	Apariencia	Conducta	Conducta inducida	Condición corporal	Puntaje final
	I	a					
	I	b					
	I	c					

En el caso en el que la puntuación sea menor de 9, se considerará el sacrificio del animal.

8. METODOLOGÍA: CRITERIOS DE SELECCIÓN

a) Criterios de inclusión (considerar que no participen en otras investigaciones y anticoncepción en caso necesario)

Ratones hembra atímicos (*nu/nu*) con fondo genético BALB/c de 6-7 semanas de edad.

b) Criterios de exclusión:

No aplica.

c) Criterios de eliminación

Con la finalidad de respetar los criterios que se establecen en experimentos que involucran animales para la investigación establecidos por el comité de cuidado de los animales canadiense (*Canadian Council on Animal Care*), observaremos los siguientes elementos para la determinación de los puntos finales:

1. El crecimiento de la masa tumoral no deberá rebasar el punto donde el animal se vea afectado significativamente en sus funciones corporales normales (alimentación, desplazamiento, etc).
2. La carga tumoral en animales involucrados en experimentos terapéuticos no deberá exceder del 10% de su peso (17 mm en ratones de 25 g).
3. La masa tumoral no deberá provocar dolor, estrés o dificultad de movimiento debido a su localización en el cuerpo del animal.
4. La pérdida de peso del animal no debe exceder del 20 % (considerando la masa tumoral).
5. Ulceración o infección en el sitio del tumor.
6. Invasión del tejido adyacente a la masa tumoral.
7. Incontinencia o diarrea prolongada.
8. Distensión abdominal significativa o donde la carga de ascitis exceda del 10% del peso corporal básico.
9. Trauma autoinducido persistente.
10. Respiración laboriosa, descargas sanguinolentas o muco-purulentas por cualquier orificio.
11. Moribundo, letárgico o fallo en la respuesta a estímulos suaves.

12. Señales de dolor y angustia tales como: aislamiento, mordeduras, piloerección, lomo arqueado, ojos y abdomen hundidos, deshidratación.

13. Patrones alterados de la alimentación, de las conductas de aseo, automutilación y/o agresión.

14. Hipotermia.

En el caso de que aparezca alguna de estas señales se solicitará la evaluación por parte del veterinario asignado para el cuidado de los animales (MVZ. Octavio Villanueva), y se procederá, según el caso y la severidad del mismo, a la eliminación inmediata de forma humanitaria de los animales en cuestión.

9. METODOLOGÍA: DESENLACES Y VARIABLES

a) Variable/desenlace principal a medir principal

La variable principal a medir será el tiempo que tarde en aparecer la masa tumoral y el tamaño del tumor en los diferentes grupos experimentales. Además, el impacto del tratamiento en los citocromos de la vitamina D.

Se evaluarán los siguientes parámetros para valorar la efectividad del tratamiento preventivo:

- a) Tiempo que tarde en aparecer la masa tumoral.
- b) El número de ratones que generen tumor en cada grupo.
- c) El volumen tumoral final y el volumen relativo. Fórmulas:

Volumen Tumoral (mm^3): $VT = (a \times b^2) / 2$. Donde a y b corresponden al eje mayor y menor del tumor, respectivamente.

Volumen Relativo del Tumor: $VRT = VT \text{ al día } (n) / VT \text{ al día } 0 \times 100$. Este valor indica el porcentaje de incremento en los días indicados.

b) Variables/desenlaces secundarias a medir

Las variables secundarias serán el calcitriol, la 25OHD y el calcio iónico en suero, así como la expresión del marcador de proliferación Ki-67.

c) Frecuencia de las mediciones

Cada tercer día se pesarán los ratones y se evaluará el tamaño de la masa tumoral. Las determinaciones en sangre y el análisis de expresión génica se llevarán a cabo una vez terminado el experimento, en una sola ocasión.

d) Criterios de éxito y falla en caso necesario

Para determinar el éxito o falla de los tratamientos se considerarán los siguientes criterios: El retraso en la aparición de la masa tumoral así como menor VRT en el grupo tratado con 25OHD serán considerados criterios de éxito.

Criterio de falla sería si el tratamiento no refleja diferencias en los criterios arriba mencionados.

e) Estrategia de análisis estadístico.

Cuando corresponda deben especificarse y fundamentarse las técnicas, aparatos y/o instrumentos (esto incluye equipos mecánicos/electrónicos/cibernéticos especiales, formatos de evaluación, cuestionarios, tablas de cotejo, etc.) que se utilizarán en la medición, señalando los criterios de validez, reproducibilidad y controles de calidad que se tengan de los mismos.

La metodología para medir cada variable ha sido especificada en la sección de "metodología y diseño general del estudio". Las comparaciones (ya sea de las variables principales o secundarias) entre los diferentes grupos se llevarán a cabo aplicando la prueba de ANOVA. En el caso de un solo grupo vs. otro, aplicaremos T de Student. Todas las mediciones se registrarán en una libreta designada para ello, en donde se consignará el número de cada ratón y su grupo, el peso en gramos, el tamaño del tumor y las observaciones generales haciendo énfasis en la aparición de los puntos finales, si es el caso.

10. RIESGOS Y BENEFICIOS DEL ESTUDIO

a) Molestias generadas por el estudio (en caso de tomas de sangre, anotar el número total de punciones, la cantidad de sangre por punción y/o total y la frecuencia de las punciones.)

Las molestias generadas por el estudio consistirán en la administración del etanol y de la 25OHD.

b) Riesgos potenciales (presencia de complicaciones o efectos adversos, considerar interacciones medicamentosas, considerar efectos psicológicos de los métodos de evaluación, v.gr.:encuestas sobre temas sensibles)

Los riesgos potenciales quedarán limitados por la observación de los puntos finales.

c) Métodos de detección de los riesgos anticipados

No aplica

d) Medidas de seguridad para el diagnóstico oportuno y prevención de dichos eventos

Se observarán los puntos finales, mismos que han sido descritos en los criterios de eliminación en la sección de metodología.

e) Procedimientos a seguir para resolverlos en caso de que se presenten

En el caso de que aparezca alguna de las señales especificadas en los puntos finales del estudio, se solicitará la evaluación por parte del veterinario asignado para el cuidado de los animales (MVZ. Octavio Villanueva), y se procederá, según el caso y la severidad del mismo, a proporcionar analgésicos o a la eliminación inmediata de forma humanitaria de los animales en cuestión. Para la identificación y tratamiento del dolor se considerarán los puntos especificados en las tablas 1 y 2, así como los descritos previamente (*Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, National Research Council*). Cuando de esta forma se presuma que los animales sufren dolor leve se administrará aspirina (120-300 mg/Kg de peso, vía oral).

f) Beneficios directos esperados

No aplica

g) Beneficios indirectos esperados

No aplica

h) Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto.

No aplica

2. Scoccianti C, Lauby-Secretan B, Bello PY, Chajes V, Romieu I (2014) Female breast cancer and alcohol consumption: a review of the literature. *Am J Prev Med* 46: S16-25.
3. Howe G, Rohan T, Decarli A, Iscovich J, Kaldor J, et al. (1991) The association between alcohol and breast cancer risk: evidence from the combined analysis of six dietary case-control studies. *Int J Cancer* 47: 707-710.
4. Boffetta P, Tubiana M, Hill C, Boniol M, Aurengo A, et al. (2009) The causes of cancer in France. *Ann Oncol* 20: 550-555.
5. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS (2007) Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 7: 684-700.
6. Shao T, Klein P, Grossbard ML (2012) Vitamin D and breast cancer. *Oncologist* 17: 36-45.
7. Krishnan AV, Trump DL, Johnson CS, Feldman D (2010) The role of vitamin D in cancer prevention and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am* 39: 401-418, table of contents.
8. Alvisa-Negrin J, Gonzalez-Reimers E, Santolaria-Fernandez F, Garcia-Valdecasas-Campelo E, Valls MR, et al. (2009) Osteopenia in alcoholics: effect of alcohol abstinence. *Alcohol Alcohol* 44: 468-475.
9. Shankar K, Liu X, Singhal R, Chen JR, Nagarajan S, et al. (2008) Chronic ethanol consumption leads to disruption of vitamin D3 homeostasis associated with induction of renal 1,25 dihydroxyvitamin D3-24-hydroxylase (CYP24A1). *Endocrinology* 149: 1748-1756.
10. Laitinen K, Valimaki M, Lamberg-Allardt C, Kivisaari L, Lalla M, et al. (1990) Deranged vitamin D metabolism but normal bone mineral density in Finnish noncirrhotic male alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 14: 551-556.
11. Wacker M, Holick MF (2013) Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. *Dermatoendocrinol* 5: 51-108.
12. Welsh J (2011) Vitamin D metabolism in mammary gland and breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 347: 55-60.
13. Lowe L, Hansen CM, Senaratne S, Colston KW (2003) Mechanisms implicated in the growth regulatory effects of vitamin D compounds in breast cancer cells. *Recent Results Cancer Res* 164: 99-110.
14. Garcia-Becerra R, Diaz L, Camacho J, Barrera D, Ordaz-Rosado D, et al. (2010) Calcitriol inhibits Ether-a go-go potassium channel expression and cell proliferation in human breast cancer cells. *Exp Cell Res* 316: 433-442.
15. Garcia-Quiroz J, Garcia-Becerra R, Barrera D, Santos N, Avila E, et al. (2012) Astemizole Synergizes Calcitriol Antiproliferative Activity by Inhibiting CYP24A1 and Upregulating VDR: A Novel Approach for Breast Cancer Therapy. *PLoS One* 7: e45063.
16. Chen P, Hu P, Xie D, Qin Y, Wang F, et al. (2010) Meta-analysis of vitamin D, calcium and the prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 121: 469-477.

17. Gilbert R, Martin RM, Fraser WD, Lewis S, Donovan J, et al. (2012) Predictors of 25-hydroxyvitamin D and its association with risk factors for prostate cancer: evidence from the prostate testing for cancer and treatment study. *Cancer Causes Control* 23: 575-588.
18. Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Grant WB, Giovannucci EL, et al. (2007) Vitamin D and prevention of breast cancer: pooled analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103: 708-711.
19. Hatse S, Lambrechts D, Verstuyf A, Smeets A, Brouwers B, et al. (2012) Vitamin D status at breast cancer diagnosis: correlation with tumor characteristics, disease outcome, and genetic determinants of vitamin D insufficiency. *Carcinogenesis* 33: 1319-1326.
20. Boyle P, Boffetta P (2009) Alcohol consumption and breast cancer risk. *Breast Cancer Res* 11 Suppl 3: S3.
21. Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Calle EE, et al. (2002) Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer* 87: 1234-1245.
22. Chen WY, Rosner B, Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC (2011) Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. *JAMA* 306: 1884-1890.
23. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Hennekens CH, et al. (1987) Moderate alcohol consumption and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 316: 1174-1180.
24. Das SK, Vasudevan DM (2007) Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci* 81: 177-187.
25. Coronado GD, Beasley J, Livaudais J (2011) Alcohol consumption and the risk of breast cancer. *Salud Publica Mex* 53: 440-447.
26. Seitz HK, Pelucchi C, Bagnardi V, La Vecchia C (2012) Epidemiology and pathophysiology of alcohol and breast cancer: Update 2012. *Alcohol Alcohol* 47: 204-212.
27. Crawford BA, Labio ED, Strasser SI, McCaughan GW (2006) Vitamin D replacement for cirrhosis-related bone disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3: 689-699.
28. Garcia-Quiroz J, Rivas-Suarez M, Garcia-Becerra R, Barrera D, Martinez-Reza I, et al. (2014) Calcitriol reduces thrombospondin-1 and increases vascular endothelial growth factor in breast cancer cells: Implications for tumor angiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*.
29. Mercer KE, Wynne RA, Lazarenko OP, Lumpkin CK, Hogue WR, et al. (2012) Vitamin D supplementation protects against bone loss associated with chronic alcohol administration in female mice. *J Pharmacol Exp Ther* 343: 401-412.
30. Vorderstrasse BA, Wang T, Myers AK, Wyrick KL, Meadows GG (2012) Alcohol consumption suppresses mammary tumor metastasis in a syngeneic tumor transplantation model. *Breast Cancer Res Treat* 136: 729-737.