

VITAMINA D Y CÁNCER: ACCIÓN ANTINEOPLÁSICA DE LA $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -VITAMINA D_3

VERÓNICA GONZÁLEZ PARDO, RICARDO BOLAND, ANA RUSSO DE BOLAND

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Resumen La forma hormonalmente activa de la vitamina D, $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamina D_3 ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), además de desempeñar un rol crucial en el mantenimiento de la homeostasis de calcio en el cuerpo, también regula el crecimiento y la diferenciación de diferentes tipos celulares, incluyendo células cancerosas. Actualmente hay numerosos estudios que investigan los efectos de la hormona en estas células, debido al interés en el uso terapéutico del $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y de análogos con menor actividad calcémica para el tratamiento o prevención del cáncer. En este trabajo de revisión se describe el sistema endocrino de la vitamina D, su mecanismo de acción, su acción antineoplásica y se provee información sobre los últimos avances en el estudio de nuevos análogos de la hormona con menos actividad calcémica para el tratamiento del cáncer.

Palabras clave: vitamina D, cáncer, mecanismo antineoplásico

Abstract *Vitamin D and cancer: antineoplastic effects of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 .* The hormonal form of vitamin D, $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), in addition of playing a central role in the control of calcium homeostasis in the body, regulates the growth and differentiation of different cell types, including cancer cells. At present several epidemiologic and clinical studies investigate the effect of the hormone in these cells due to the interest in the therapeutic use of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and analogues with less calcemic activity for prevention or treatment of cancer. This review describes vitamin D endocrine system, its mechanism of action, its antineoplastic activity and provides information about the latest advances in the study of new hormone analogues with less calcemic activity for cancer treatment.

Key words: Vitamin D, cancer, antineoplastic mechanism

Sistema endocrino de la vitamina D

La vitamina D es una pro-hormona que puede ser obtenida de la dieta o ser generada en la piel a partir de 7-dehidrocolesterol por acción de la luz ultravioleta¹. La vitamina D_3 es transportada vía sanguínea al hígado donde es hidroxilada en posición 25 por la 25-hidroxilasa. El $25(\text{OH})\text{D}_3$ es llevado por la sangre al riñón donde vuelve a hidroxilarse en posición 1 por la 1α -hidroxilasa, convirtiéndose en $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (calcitriol), la forma hormonalmente activa de la vitamina D². Luego la hormona es transportada a sus órganos blanco, principalmente intestino, riñón y hueso, por vía sistémica unida a la 1α -globulina (DBP)³. El sistema endocrino de la vitamina D es regulado a nivel de la 1α -hidroxilasa por el mismo $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, la hormona paratiroidea, FGF-23⁴ concentración sérica

de calcio y fosfato. El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ desempeña un rol central en la mineralización del hueso, estimulando la absorción intestinal de calcio y fosfato, el metabolismo de calcio y fosfato en hueso así como su reabsorción renal,

Acrónimos

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$: $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamina D_3
 CDK: quinasa dependiente de ciclina
 DBP: 1α -globulina
 FGF-23: factor de crecimiento fibroblástico 23
 G1: intervalo 1, primera fase del ciclo celular
 IGF: factor de crecimiento de tipo insulina
 IGFBP-3: proteína 3 de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina
 MAP quinasa: proteína quinasa activada por mitógenos
 NF κ B: factor nuclear kappa B
 PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa
 PKC: proteína quinasa C
 RXR: receptor del ácido retinoico
 S: fase de síntesis del ciclo celular
 TGF β : factor de crecimiento transformante beta 1
 TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa
 TX 522: 19-nor-14-epi-23-yne-1,25(OH) $_2\text{D}_3$
 TX 527: 19-nor-14,20-bisepi-23-yne-1,25(OH) $_2\text{D}_3$
 VDR: receptor de vitamina D
 VDRmem: receptor de vitamina D membrana
 VDRnuc: receptor de vitamina D nuclear
 β -catenina/TCF: complejo factor de transcripción asociado a beta catenina

Recibido: 17-VI-2011

Aceptado: 7-X-2011

Dirección postal: Dra. Ana Russo de Boland, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, San Juan 670, 8000 Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina
 Fax: (54-291) 4595130 e-mail: aboland@criba.edu.ar

a través de sus efectos en osteoblastos, condrocitos y el epitelio renal e intestinal⁵. La mayoría de los tejidos expresan el receptor de vitamina D (VDR) cuyo ligando es el $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$; tanto los tejidos blanco clásicos (hueso, riñón e intestino), como los no-clásicos en el sistema inmune (células T y B, macrófagos y monocitos), en el sistema reproductivo (útero, testículos, ovario, próstata, placenta y glándulas mamarias), en el sistema endocrino (páncreas, pituitaria, tiroides y corteza adrenal), en músculos (esquelético, liso y cardíaco) y en cerebro, hígado y piel. Los túbulos renales, piel, hueso, mama, cerebro, colon y próstata; también contienen la 1α -hidroxilasa requerida para convertir el metabolito circulante de la vitamina D, $25(\text{OH})\text{D}_3$ a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ⁶. A pesar de la amplia distribución del VDR y la 1α -hidroxilasa, lo que ha ampliado los alcances del sistema endocrino de la vitamina D más allá de la homeostasis del hueso³, los efectos del $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre la secreción hormonal, función inmune, proliferación y diferenciación celular dependen de la especificidad del tejido.

Mecanismo genómico y no genómico de acción

El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ actúa a través de dos mecanismos (Fig.1): el primero es típico de hormonas esteroideas, uniéndose a su receptor intracelular (VDR), un miembro de la familia de receptores nucleares que actúa como factor de transcripción. El complejo hormona-VDR regula la transcripción de una gran variedad de genes⁷, a través de la formación de heterodímeros con las tres isoformas del receptor del ácido retinoico (RXR) y la unión a elementos de respuesta

en la región promotora de los genes blanco⁸. Mediante su mecanismo genómico, y en intervalos de horas o días, la hormona modula la síntesis de nuevas proteínas (Tabla 1), siendo los productos génicos más estudiados y mejor caracterizados las calbindinas (9 y 28 K), las que facilitan el transporte transcelular de Ca^{2+} . El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ también puede reprimir la transcripción de otros genes, tales como el de la 1α -hidroxilasa y el de PTH^{9,10}.

El otro mecanismo de acción del $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ es muy rápido e involucra la activación de vías de transducción de señales, siendo similar al mecanismo de acción de las hormonas peptídicas. Las respuestas rápidas del $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ incluyen la generación de flujos de calcio¹¹, la inducción de segundos mensajeros¹² y la activación de quinasas citosólicas¹³. La hormona promueve el influjo rápido de Ca^{2+} del espacio extracelular a través de canales independientes de voltaje en células de osteosarcoma¹⁴, y a través de canales dependientes de voltaje en células musculares e intestinales^{15,16}, liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares en osteoblastos¹⁷ y otros tipos celulares¹⁸⁻²⁰, y activa un amplio repertorio de proteínas quinasas^{17,21-23}. Estos efectos ocurren en segundos-minutos y son independientes de la transcripción génica y síntesis proteica¹¹. La participación del VDR en las respuestas no-genómicas del $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ es controversial, ya que se han observado respuestas rápidas de la hormona en células que carecen de VDR²⁴. Sin embargo, en varios tipos celulares se han observado respuestas rápidas del $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vía VDR extranuclear y asociado con las caveolas de la membrana plasmática^{25,26}.

Se ha demostrado la interacción de vías de transducción de señales activadas por el $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a través

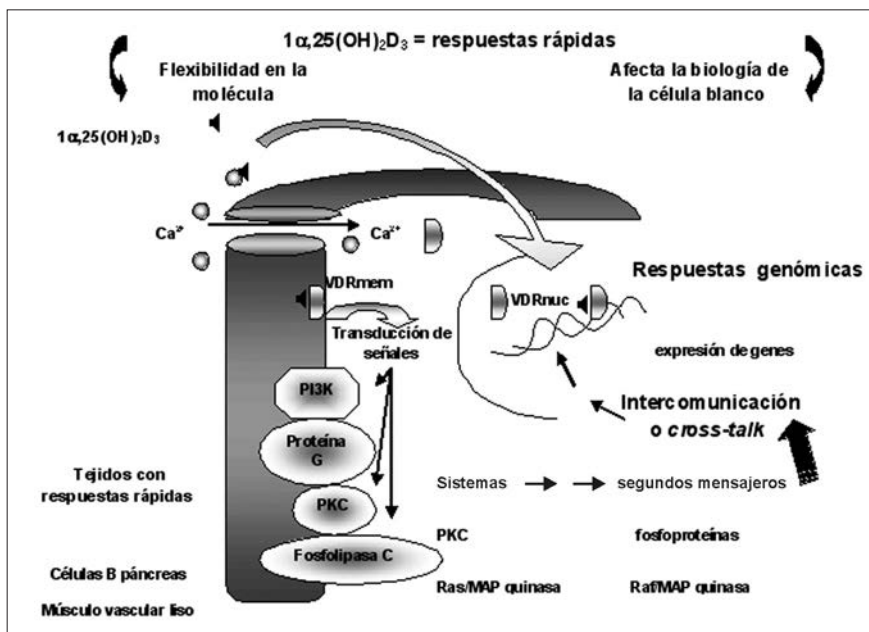


Fig. 1.- Modelo esquemático de acciones genómicas y no genómicas del $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

TABLA 1.— Principales proteínas inducidas por $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Proteína	Tejido/células
Osteocalcina	Osteoblasto
Osteopontina	Osteoblasto
Fosfatasa alcalina	Osteoblasto
Calbindina 9k	Intestino
Calbindina 28k	Riñón
	Intestino
	Riñón
	Páncreas
	Próstata
	Glándula mamaria
Ca ²⁺ -ATPasa	Intestino
	Riñón
Intercambiador Na ⁺ -Ca ²⁺	Intestino
	Riñón
Canales de Ca ²⁺ epiteliales (ECaC1/TRPV5) (ECaC2/TRPV6)	Intestino
Involucrina	Queratinocitos
Anhidrasa carbónica	Macrófagos
PTH	Paratiroides

del mecanismo no-genómico con la transcripción génica regulada por su receptor nuclear. La rápida activación de proteínas quinasas por la hormona resulta en la fosforilación de co-activadores claves en la modulación de la transcripción génica dependiente del VDR²⁷. Esta interacción originada en la membrana plasmática y transmitida al núcleo puede influenciar las respuestas biológicas específicas del $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la célula involucrando diversos procesos fisiológicos y patofisiológicos^{3, 28}.

Acción antineoplásica del $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Muchos estudios epidemiológicos han asociado el estatus de vitamina D con el riesgo y grado de mortalidad de varios tipos de cánceres²⁹⁻³¹ y se ha demostrado una asociación entre bajos niveles de $25(\text{OH})\text{D}_3$ sérico y un aumento en el riesgo de cáncer de colon³², mama³³ y próstata³⁴. Estudios epidemiológicos y clínicos han evidenciado que el $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ desempeña un importante rol en muchos mecanismos celulares involucrados en la transformación tumoral de las células³⁵⁻³⁷.

Se ha informado que la expresión del VDR disminuye gradualmente con el avance de la enfermedad tumoral³⁸ y se ha asociado la existencia de polimorfismos del VDR con el riesgo de cáncer³⁹. En muchos tipos de tumores se altera la expresión y función de proteínas cruciales para la síntesis y catabolismo de la hormona⁴⁰. Es más, en ratones donde se suprimió la expresión del VDR, se demostró que la señalización del receptor es importante

para suprimir la cancerinogénesis^{41, 42}. Recientemente, se ha demostrado que la suplementación de vitamina D reduce el riesgo de cáncer en mujeres postmenopáusicas⁴³.

El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ unido al VDR regula la expresión de más de 60 genes que ejercen efectos pro-diferenciativos, antiproliferativos y antimetastásicos en las células.

Regulación de la proliferación y diferenciación celular

En ensayos preclínicos se han demostrado los efectos antiproliferativos del $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en varios tipos de tumores. La hormona regula la proliferación celular a través de múltiples mecanismos, especialmente ejerciendo efectos en el ciclo celular, apoptosis y diferenciación. En algunos casos la hormona influencia indirectamente el ciclo celular, apoptosis y o diferenciación celular interactuando con otros reguladores de la transcripción o vías de señalización. Se han comprobado importantes efectos del $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre el crecimiento en células normales y en situaciones patológicas caracterizadas por hiperplasia benigna, y en numerosos cánceres y líneas celulares cancerígenas.

Los efectos de la hormona sobre el crecimiento y diferenciación varían con el tipo de tejido. Por ejemplo, inhibe la diferenciación de los linfocitos B⁴⁴ y la promueve en queratinocitos⁴⁵; tiene efectos antiproliferativos en algunas células neoplásicas y en otras favorece el crecimiento⁴⁶.

Se han identificado diversos blancos de las acciones genómicas y no-genómicas de la hormona, incluyendo a receptores acoplados a proteínas G, genes involucrados en vías de transducción de señales, reguladores del ciclo celular, componentes de la matriz extracelular y moléculas de adhesión celular⁴⁷. A través de estas interconexiones el $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ no solo regula la mineralización del hueso sino también el crecimiento y la diferenciación⁴⁸. Esta diversidad de efectos biológicos puede lograrse, en parte, a través de la intercomunicación del mecanismo genómico y no-genómico, redes moleculares o transcriptomas implicados en la especialización del linaje o efectos en genes blanco con funciones específicas.

Varios mecanismos importantes serían responsables de los efectos antiproliferativos del $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, destacándose la regulación de la progresión del ciclo celular debido a la inhibición del pasaje de G1 a la fase S del ciclo. En varios tipos celulares se han observado múltiples efectos de la hormona en este pasaje del ciclo celular que involucran diversas acciones sobre la transcripción génica y la estabilidad proteica, incluyendo entre otros a ciclina D₁ y los inhibidores de ciclinas p21^{waf1}, p27^{kip1}. La hormona también induce la muerte celular programada o apoptosis en numerosos tipos celulares, afectando el nivel de caspasas, proteínas regulatorias y sistemas de señalización celular. También estimula la diferenciación en varios tipos celulares induciendo un grupo de genes y estimulando vías de señalización. Los efectos anti-proliferativos del $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se

asocian frecuentemente, pero no siempre, a la inducción de la diferenciación celular. La hormona y su receptor VDR interactúan con otros reguladores transcripcionales y sistemas de señalización celular, entre otros, los receptores de andrógenos y estrógenos, IGF, TGF β , b-catenina para controlar el crecimiento celular y la diferenciación.

En varios tipos celulares, la hormona disminuye la proliferación y además induce un fenotipo más diferenciado, aunque estos eventos no siempre ocurren juntos: en algunos casos la hormona disminuye el crecimiento sin estimular la diferenciación, mientras que en otros induce diferenciación sin alterar el crecimiento. Por ser el $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ una sustancia fisiológica que ocurre naturalmente aventaja, en cuanto a las reacciones adversas, a otros xenobióticos cuando se administran a pacientes. Sin embargo, la administración de la hormona en concentraciones que exceden el rango fisiológico provoca hipercalcemia, lo que ha limitado su aplicación clínica^{49, 50}. Este problema se ha reducido notablemente con el desarrollo de análogos del $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con menor actividad calcémica⁵¹⁻⁵⁴ y también combinándolos con otros compuestos (ácido carnósico, ácido todo trans-retinoico, dexametasona) para potenciar la diferenciación celular inducida por la hormona o sus análogos⁵⁵⁻⁵⁷. En años recientes se ha progresado en el entendimiento de los mecanismos por los cuales el $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce diferenciación. El principal objetivo de la terapia de diferenciación de enfermedades neoplásicas consiste en frenar la proliferación de esas células mediante arresto del ciclo celular asociado con la diferenciación⁵⁸⁻⁶¹ y en algunos casos con la inducción de apoptosis o muerte celular programada. Por ejemplo, la diferenciación monocítica de células leucémicas mieloides inducida por el $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ resulta en el bloqueo de la fase G1 del ciclo celular con arresto de la proliferación⁶¹, mientras que el tratamiento de células cancerosas de próstata o mama con la hormona puede inducir diferenciación así como muerte de las células por apoptosis⁶¹⁻⁶⁴. La diferenciación inducida por el $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ depende del tipo y contexto celular. Así, contrariamente a las células de cáncer de mama y próstata inducidas a morir por apoptosis, en células mieloides leucémicas, la diferenciación inducida por la hormona es acompañada por supervivencia^{65, 66}. Las vías de señalización utilizadas por el $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ para inducir diferenciación y los efectos asociados con el ciclo celular y supervivencia pueden diferir o solaparse en los distintos tipos celulares y además pueden complicarse por el tipo de mutaciones responsables del bloqueo de la diferenciación que resulta en la proliferación descontrolada de las células neoplásicas.

Vitamina D y sus análogos

La principal toxicidad del $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ como droga anticancerosa es la hipercalcemia. Varias líneas de evidencia

han sugerido efectos preventivos y terapéuticos de análogos de la hormona con menor actividad calcémica, ya que han inhibido el crecimiento de tumores y metástasis en modelos preclínicos de cáncer de mama^{35, 40}. Estos efectos se deben a acciones directas de los análogos sobre las células cancerosas, tales como arresto del ciclo celular, apoptosis o diferenciación^{35, 55} aunque también acciones anti angiogénicas han sido reportadas⁶⁷. Análogos sintéticos clásicos de la vitamina D han sido ensayados en diferentes modelos animales para determinar su eficacia *in vivo*. Por ejemplo, el análogo 1α -hydroxyvitamin D_5 reduce la incidencia y multiplicidad de tumores mamarios en ratas Sprague-Dawley^{68, 69}. El tratamiento con el análogo Ro26-9114 también disminuyó la carga tumoral en el tracto gastrointestinal de ratón⁷⁰. En modelos xenográficos, el tratamiento con otro análogo, el 1,25-dihydroxy-16-ene-23-yne vitamina D_3 (donde yne representa una triple ligadura) atenuó el crecimiento de tumores de retinoblastoma mediante aumento de la apoptosis⁷¹. Es más, en ratones "atímicos" o inmunosuprimidos, la administración del análogo EB1089 combinada con radiación fue mucho más efectiva en inhibir el crecimiento tumoral y promover la apoptosis que cada tratamiento individual⁷². Los análogos de la vitamina D denominados "Gemini", por presentar dos cadenas laterales ligadas al carbono 20 de la molécula, tienen menor toxicidad que el $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en animales^{73, 74} y alguno de ellos, en células de cáncer de mama MCF10, mostraron mayor efecto inhibitorio de la proliferación celular que la hormona⁷⁵. En ratones BALB/c implantados con células de cáncer colorrectal, la administración de estos análogos redujo significativamente el crecimiento del tumor⁷³ y su propagación a músculos vecinos⁷³, a una concentración 10 veces menor que la del $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y sin provocar hipercalcemia. Se demostró que los análogos Gemini activan la señalización de la proteína morfogenética de hueso (BMP)/Smad vía Ras/PKC γ , en células epiteliales de cáncer de mama MCF10^{74, 77}. Estudios mecanísticos demostraron que la acción inhibitoria de los análogos Gemini sobre los tumores mamarios en animales estaba asociada con la inducción de IGFBP-3 y el inhibidor de CDK, p21⁷⁸. Entre otros, dos 14-epi-análogos de la hormona, el TX522 (19-nor-14-epi-23-yne- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) y el TX527 (19-nor-14,20-bisepi-23-yne- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), mostraron acciones antiproliferativas de magnitud 10 veces superior al $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y suprimieron el crecimiento de tumores con efectos mínimos en hueso y en el metabolismo de calcio⁷⁹. También se observó que el análogo TX527 tiene efectos antiproliferativos en células endoteliales transformadas por el receptor viral del Herpes virus 8 acoplado a proteínas G asociado al desarrollo del Sarcoma de Kaposi, efectos que están mediados en parte por el VDR y se observaron tanto *in vivo* como *in vitro*⁸⁰. TX 527 administrado a pacientes con la enfermedad de Crohn's (caracterizada por la activación del sistema inmu-

ne en el intestino) y vía el VDR, disminuye la proliferación de células mononucleares de sangre periférica y ejerce efectos inmunosupresores en la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- γ) mediante el bloqueo de la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF κ B)⁸¹. Recientemente se han desarrollado análogos no-esteroidales del $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, que presentan cambios drásticos en la hormona de modo que pierde su estructura esteroidea. Entre otros, los análogos no esteroideos CD578, WU515 y WY1113, desencadenan una marcada diferenciación de células de cáncer de colon humano mediante la inhibición de la señalización de α -catenina/TCF y una potente inducción de la interacción VDR-coactivadores. Estos análogos son fluorados, lo que los protege de la degradación metabólica y además contribuye a aumentar la estabilidad del complejo análogo fluorado- receptor⁸².

Generalmente los análogos más potentes son más activos en todos los tipos de cánceres evaluados, y algunos de ellos son más efectivos a concentraciones 10 o más veces menor que la del $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ para un tipo específico de cáncer.

Se ha demostrado que la hormona así como sus análogos regulan negativamente el receptor de estrógenos en varias líneas celulares de cáncer de mama, afectando su acción sobre la transcripción génica^{83,84}. También se ha observado inhibición del crecimiento por secosteroides de la vitamina D en líneas celulares de cáncer de mama independientes de estrógenos⁴⁸.

La mayoría de los análogos tienen baja o extremadamente baja afinidad por la DBP⁸⁵, lo que acarrea importantes consecuencias farmacocinéticas: Luego de la administración del análogo se producen picos tempranos y elevados comparados con el aumento progresivo y la caída de la hormona natural. En consecuencia, las células a mayores niveles de análogos y duración de la exposición intracelular van a depender de los contactos con el VDR y las enzimas metabólicas que pueden diferir de célula a célula. Es más, el ciclo de vida en las células blanco puede ser muy diferente: la célula intestinal tiene una vida media funcional muy corta, mientras que las células óseas (osteoblastos) y las paratiroides permanecen activamente funcionales por más largo tiempo.

Los análogos de vitamina D que regulan el crecimiento y la diferenciación celular, pero que previenen la toxicidad por tener menos efectos sobre el metabolismo del calcio, representan una promesa como tratamientos noveles para el cáncer y otras enfermedades relacionadas con la desregulación del crecimiento celular.

Perspectivas futuras

La información epidemiológica indica que la deficiencia en vitamina D está asociada con un mayor riesgo de varios tipos de cáncer. El $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tiene efectos antiproliferativos, anti-angiogénicos y pro-diferenciativos en un amplio rango de cánceres. Estos efectos están mediados por la perturbación de importantes vías de señalización a través de mecanismos genómicos y no-genómicos. La hormona potencia los efectos anti-tumorales de varios compuestos terapéuticos. Los datos preclínicos y resultados en modelos animales como en células aisladas confirman un rol potencial de los diferentes análogos de la vitamina D como posibles herramientas terapéuticas contra el cáncer. Sin embargo, la relación entre la actividad calcémica y antiproliferativa observada con los análogos en los modelos de ratón, no necesariamente se corresponden con la relación en humanos. Son necesarios nuevos estudios clínicos que determinen la efectividad de los análogos del $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ para que puedan ser usados como drogas seguras en el tratamiento anti tumoral.

Agradecimientos: Agradecemos a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Universidad Nacional del Sur, Argentina, por los subsidios recibidos.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Bibliografía

1. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1689S-96S.
2. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 2008; 29: 726-6.
3. Norman AW. Vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinol* 2006; 147: 5542-8.
4. Bikle D. Vitamin D: newly discovered actions require reconsideration of physiologic requirements. *Trends Endocr Metab* 2010; 6: 375-84
5. Haussler MR, Haussler CA, Jurutka PW, Thompson PD, Hsieh JC, Remus LS. The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *J Endocrinol* 1997; 154: S57-S73.
6. Anderson PH, Hendrix I, Sawyer RK, Zarrinkalam R, Manavis J, Sarvestani GT. Co-expression of CYP27B1 enzyme with the 1.5kb CYP27B1 promoter-luciferase transgene in the mouse. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 285: 1-9.
7. White JH. Profiling 1,25-dihydroxyvitamin D₃-regulated gene expression by microarray analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89-90: 239-44.
8. Carlberg C. Mechanisms of nuclear signalling by vitamin D₃: Interplay with retinoid and thyroid hormone signalling. *Eur J Biochem* 1995; 231: 517-27.
9. Townsend K, Evans KN, Campbell MJ, Colston KW, Adams JS, Hewison M. Biological actions of extra-renal 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase and implications for chemoprevention and treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97: 103-9.
10. Demay MB, Kiernan MS, DeLuca HF, Kronenberg HM. Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 8097-101.
11. Cancela L, Nemere I, Norman AW. 1 $\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin

- D₃: a steroid hormone capable of producing pleiotropic receptor-mediated biological responses by both genomic and nongenomic mechanisms. *J Steroid Biochem* 1988; 30: 33-9.
12. Farach-Carson MC, Ridall AL. Dual 1,25-dihydroxyvitamin D₃ signal response pathways in osteoblasts: cross-talk between genomic and membrane-initiated pathways. *Am J Kidney Dis* 1998; 31: 729-42.
 13. Boyan BD, Schwartz Z. Rapid vitamin D-dependent PKC signaling shares features with estrogen dependent PKC signaling in cartilage and bone. *Steroids* 2004; 69: 591-7.
 14. Caffrey JM, Farach-Carson MC. Vitamin D₃ metabolites modulate dihydropyridine-sensitive calcium currents in clonal rat osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 20265-74.
 15. Vazquez G, Boland AR de. Stimulation of dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ influx in cultured myoblasts by 1,25(OH)₂-Vitamin D₃. *Biochem Mol Biol Int* 1993; 31: 677-84.
 16. Boland AR de, Norman AW. Influx of extracellular calcium mediate 1,25(OH)₂-vitamin D₃-dependent rapid stimulation of duodenal Ca²⁺ transport. *Endocrinol* 1990; 127: 2475-80.
 17. Le Mellay V, Grosse B, Lieberherr M. Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol. *J Biol Chem* 1997; 272: 11902-7.
 18. Vazquez G, Boland AR de, Boland R. Stimulation of calcium released-activated calcium channels as a potential mechanism involved in non-genomic 1,25(OH)₂-vitamin D₃-induced Ca²⁺ entry in skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239: 562-5.
 19. Lajdova I, Chorvat D Jr, Chorvatova A. Rapid effects of 1alpha,25(OH)₂D₃ in resting human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Pharmacol* 2008; 586: 14-23.
 20. Morelli S, de Boland AR, Boland RL. Generation of inositol phosphates, diacylglycerol and calcium fluxes in myoblasts treated with 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem J* 1993; 289: 675-9.
 21. Norman AW, Okamura WH, Bishop JE, Henry HL. Update on biological actions of 1alpha,25(OH)₂-vitamin D₃ (rapid effects) and 24R,25(OH)₂-vitamin D₃. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 197: 1-13.
 22. Vazquez G, Boland AR de, Boland R. 1a,25-dihydroxyvitamin D₃-induced store-operated Ca²⁺ influx in skeletal muscle cells: Modulation by phospholipase C, PKC and tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1998; 273: 33954-60.
 23. Boland R, Buitrago C, Russo de Boland A. Modulation of tyrosine phosphorylation signaling pathways by the secosteroid hormone 1a,25(OH)₂-Vitamin D₃. *Trends Endocrinol Metabol* 2005; 16: 280-7.
 24. Wali RK, Kong J, Sitrin MD, Bissonnette M, Li YC. Vitamin D receptor is not required for the rapid actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ to increase intracellular calcium and activate protein kinase C in mouse osteoblasts. *J Cell Biochem* 2003; 88: 794-801.
 25. Huhtakangas JA, Olivera CJ, Bishop JE, Zanella LP, Norman AW. The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 alpha 25(OH)₂-vitamin D₃ in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 2660-71.
 26. Capiati D, Benassati S, Boland RL. 1,25(OH)₂-vitamin D₃ induces translocation of the vitamin D receptor (VDR) to the plasma membrane in skeletal muscle membranes in skeletal muscle cells. *J Cell Biochem* 2002; 86: 128-35.
 27. Barletta F, Freedman LP, Christakos S. Enhancement of VDR-mediated transcription by phosphorylation: correlation with increased interaction between the VDR and DRIP205, a subunit of the VDR-interacting protein coactivator complex. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 301-14.
 28. Baran DT, Sorensen AM, Shalhoub V, Owen T, Stein G, Lian J. The rapid nongenomic actions of 1 alpha 25-dihydroxyvitamin D₃ modulate the hormone-induced increments in osteocalcin gene transcription in osteoblast-like cells. *J Cell Biochem* 1992; 50: 124-9.
 29. Giovannucci E, Liu Y, Rimm EB, et al. Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 451-9.
 30. Cui Y, Rohan TE. Vitamin D, calcium, and breastcancer risk: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 1427-37.
 31. Schwartz GG, Skinner HG. Vitamin D status and cancer: new insights. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 10: 6-11.
 32. Garland CF, Comstock GW, Garland FC, Helsing KJ, Shaw EK, Gorham ED. Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: eight-year prospective study. *Lancet* 1989; 2: 1176-8.
 33. Bertone-Johnson ER, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1, 25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1991-7.
 34. Ahonen MH, Tenkanen L, Teppo L, Hakama M, Tuohimaa P. Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (Finland). *Cancer Causes Control* 2000; 11: 847-52.
 35. Welsh J. Vitamin D and prevention of breast cancer. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28: 1373-82.
 36. Hendrickson WK, Flavin R, Kasperzyk JL, et al. Vitamin D receptor protein expression in tumor tissue and prostate cancer progression. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2378-85.
 37. Giovannucci E. Vitamin D and Cancer Incidence in the Harvard Cohorts. *Ann Epidemiol* 2009; 19: 84-8.
 38. Buras RR, Schumaker LM, Davoodi F, et al. Vitamin D receptors in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 31: 191-202.
 39. Kostner K, Denzer N, Muller CS, et al. The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer. *Anticancer Res* 2009; 29: 3511-36.
 40. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D, signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 684-700.
 41. Zinser GM, Suckow M, Welsh J. Vitamin D receptor (VDR) ablation alters carcinogen-induced tumorigenesis in mammary gland, epidermis and lymphoid tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97: 153-64.
 42. Matthews D, LaPorta E, Zinser GM, et al. Genomic vitamin D signaling in breast cancer: insights from animal models and human cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121: 362-7.
 43. Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heaney RP. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 1586-91.
 44. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human B cell differentiation. *J Immunol* 2007; 179: 1634-47.
 45. Bikle DD, Pillai S. Vitamin D, calcium, and epidermal differentiation. *Endocr Rev* 1993; 14: 3-19.
 46. Banerjee P, Chatterjee M. Antiproliferative role of vitamin D and its analogs, a brief overview. *Mol Cell Biochem* 2003; 253: 247-54.
 47. Wood RJ, Tchack L, Angelo G, Pratt RE, Sonna LA. DNA microarray analysis of vitamin D-induced gene expression in a human colon carcinoma cell line. *Physiol Genomics* 2004; 17:122-9.
 48. Colston KW, Hansen CM. Mechanisms implicated in the growth regulatory effects of vitamin D in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2002; 9: 45-59.
 49. Jung SJ, Lee YY, Pakkala S, et al. 1,25(OH)₂-16ene-vitamin D₃ is a potent antileukemic agent with low potential to cause hypercalcemia. *Leuk Res* 1994; 18: 453-63.
 50. Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: S582-S586.
 51. Bouillon R, Okamura WH, Norman AW. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 1995; 16: 200-57.
 52. Ji Y, Wang X, Donnelly RJ, Uskokovic MR, Studzinski GP. Signaling of monocytic differentiation by a non-hypercalcemic analog of vitamin D₃, 1,25(OH)₂-5,6 trans-16-ene-

- vitamin D₃ involves nuclear vitamin D receptor (nVDR) and non-nVDR-mediated pathways. *J Cell Physiol* 2002; 191: 198-207.
53. Collins ED, Bishop JE, Bula CM, Acevedo A, Okamura WH, Norman AW. Effect of 25-hydroxylgroup orientation on biological activity and binding to the 1alpha,25-dihydroxy vitamin D₃ receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 94: 279-88.
 54. Aparna R, Subhashini J, Roy KR, et al. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) by 1alpha,25-dihydroxy-16-ene-23-yne-vitamin D₃, a less calcemic vitamin D analog. *J Cell Biochem* 2008; 104: 1832-42.
 55. Danilenko M, Wang X, Studzinski GP. Carnosic acid and promotion of monocytic differentiation of HL60-G cells initiated by other agents. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1224-33.
 56. Danilenko M, Wang Q, Wang X, Levy J, Sharoni Y, Studzinski GP. Carnosic acid potentiates the antioxidant and prodifferentiation effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ in leukemia cells but does not promote elevation of basal levels of intracellular calcium. *Cancer Res* 2003; 63: 1325-32.
 57. Danilenko M, Studzinski GP. Enhancement by other compounds of the anti-cancer activity of vitamin D₃ and its analogs. *Exp Cell Res* 2004; 298: 339-58.
 58. Coffman FD, Studzinski GP. Differentiation-related mechanisms which suppress DNA replication. *Exp Cell Res* 1999; 248: 58-73.
 59. Harrison LE, Wang QM, Studzinski GP. Butyrate-induced G2/M block in CaCo-2 colon cancer cells is associated with decreased p34cdc2 activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222: 150-6.
 60. Harrison LE, Wang QM, Studzinski GP. 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced retardation of the G(2)/M traverse is associated with decreased levels of p34(cdc2) in HL60 cells. *J Cell Biochem* 1999; 75: 226-34.
 61. Wang QM, Studzinski GP, Chen F, Coffman FD, Harrison LE. p53/56(lyn) antisense shifts the 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced G1/S block in HL60 cells to S phase. *J Cell Physiol* 2000; 183: 238-46.
 62. Welsh J, Simboli-Campbell M, Narvaez CJ, Tenniswood M. Role of apoptosis in the growth inhibitory effects of vitamin D in MCF-7 cells. *Adv Exp Med Biol* 1995; 375: 45-52.
 63. Li F, Ling X, Huang H, et al. Differential regulation of survivin expression and apoptosis by vitamin D₃ compounds in two isogenic MCF-7 breast cancer cell sublines. *Oncogene* 2005; 24: 1385-95.
 64. Myrthue A, Rademacher BL, Pittsenbarger J, et al. The iroquois homeobox gene 5 is regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human prostate cancer and regulates apoptosis and the cell cycle in LNCaP prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 3562-70.
 65. Wang X, Studzinski GP. Antiapoptotic action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is associated with increased mitochondrial MCL-1 and RAF-1 proteins and reduced release of cytochrome c. *Exp Cell Res* 1997; 235: 210-7.
 66. Wang X, Patel R, Studzinski GP. hKSR-2, a vitamin D-regulated gene, inhibits apoptosis in arabinocytosine-treated HL60 leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 2798-806.
 67. Bernardi RJ, Johnson CS, Modzelewski RA, Trump DL. Antiproliferative effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ and vitamin D analogs on tumor-derived endothelial cells. *Endocrinol* 2002; 143: 2508-14.
 68. Mehta R, Hawthorne M, Uselding L, et al. Prevention of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis in rats by 1alpha-hydroxyvitamin D(5). *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1836-40.
 69. Mehta RG, Hussain EA, Mehta RR, Das Gupta TK. Chemoprevention of mammary carcinogenesis by 1alpha-hydroxyvitamin D₅, a synthetic analog of Vitamin D. *Mutat Res* 2003; 523-524: 253-64.
 70. Huerta S, Irwin RW, Heber D, et al. 1alpha,25-(OH)(2)-D(3) and its synthetic analogue decrease tumor load in the Apc(min) mouse. *Cancer Res* 2002; 62: 741-6.
 71. Audo I, Darjatmoko SR, Schlamp CL, et al. Vitamin D analogues increase p53, p21, and apoptosis in a xenograft model of human retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 4192-9.
 72. Sundaram S, Sea A, Feldman S, et al. The combination of a potent vitamin D₃ analog, EB 1089, with ionizing radiation reduces tumor growth and induces apoptosis of MCF-7 breast tumor xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2350-6.
 73. Spina C, Tangpricha V, Yao M, et al. Colon cancer and solar ultraviolet B radiation and prevention and treatment of colon cancer in mice with vitamin D and its Gemini analogs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97: 111-20.
 74. Spina CS, Ton L, Yao M, et al. Selective vitamin D receptor modulators and their effects on colorectal tumor growth. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103: 757-62.
 75. Lee HJ, Liu H, Goodman C, et al. Gene expression profiling changes induced by a novel Gemini Vitamin D derivative during the progression of breast cancer. *Biochem pharm* 2006; 72: 332-43.
 76. Maehr H, Uskokovic M, Adorini L, et al. Calcitriol derivatives with two different side chains at C-20 III. An epimeric pair of the gemini family with unprecedented antiproliferative effects on tumor cells and renin mRNA expression inhibition. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103: 277-81.
 77. Lee HJ, Wislocki A, Goodman C, et al. A novel vitamin D derivative activates bone morphogenetic protein signaling in MCF10 breast epithelial cells. *Mol Pharm* 2006; 69: 1840-8.
 78. Lee HJ, Ji Y, Paul S, Maehr H, Uskokovic M, Suh N. Activation of bone morphogenetic protein signaling by a Gemini vitamin D₃ analogue is mediated by Ras/protein kinase C alpha. *Cancer Res* 2007; 67: 11840-7.
 79. Verlinden L, Verstuyf A, Van Camp M, et al. Two novel 14-Epi-analogues of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibit the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2000; 60: 2673-9.
 80. Gonzalez-Pardo V, Martin D, Gutkind SJ, et al. 1a,25(OH)₂-Vitamin D₃ and its TX527 analog inhibit the growth of endothelial cells transformed by Kaposi sarcoma-associated herpes virus G protein coupled receptor. *Endocrinol* 2010; 151: 23-31.
 81. Stio M, Martinesi M, Bruni S, et al. The Vitamin D analogue TX 527 blocks NF-kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells of patients with Crohn's disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103: 51-60.
 82. Eelen G, Verlinden L, Bouillon R, et al. CD-ring modified vitamin D₃ analogs and their superagonistic action. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121: 417-9.
 83. Swami S, Krishnan AV, Feldman D. 1a,25-dihydroxyvitamin D₃ down-regulates estrogen receptor abundance and suppresses estrogen action in MCF-7 human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3371-9.
 84. Demirpence E, Balaguer P, Trousse R, et al. Antiestrogenic effects of all-trans retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in breast cancer cells occur at the estrogen response element level but through different mechanisms. *Cancer Res* 1994; 54: 1458-64.
 85. Bouillon R, Verstuyf A, Zhao J, Tan BK, Van Baelen H. Nonhypercalcemic vitamin D analogs: interactions with the vitamin D-binding protein. *Horm Res* 1996; 45: 117-21.