

**THE ROLE OF VITAMIN D IN THE CARCINOGENESIS AND PROGRESSION
OF BREAST CANCER**

**O PAPEL DA VITAMINA D NA CARCINOGENESE E PROGRESSÃO DO
CANCRO DA MAMA**

Summary / Sumário

Nair Susana da Costa Florim Ribeiro Lopes

Porto, 2012

Breast cancer is the leading cause of death by cancer in women. It is a heterogeneous disease, with different molecular subtypes that are associated with diverse biological behaviours, various responses to therapy and clinical outcome. Although some of these molecular subgroups have a targeted therapy, the most aggressive tumours, the triple-negative basal-like carcinomas, still lack a molecular target. This has led to intensive research in order to find the best immunohistochemical criterion to identify triple-negative basal-like carcinomas, as well as potential therapeutic approaches for this particular type of tumours.

In the first part of this thesis, we aimed to establish an immunohistochemical surrogate panel, easily applied on formalin-fixed paraffin-embedded samples, which could identify triple-negative basal-like carcinomas. We demonstrated that P-cadherin, Vimentin and CK14 are useful biomarkers to include in immunohistochemistry panels in order to distinguish triple-negative basal-like carcinomas, due to their consistent values of sensitivity and specificity.

In addition, Vitamin D has been shown to have anti-carcinogenic effects in various cancer models, including breast cancer, by inhibiting proliferation, invasion, angiogenesis and by preventing the formation of metastasis. Furthermore, studies have demonstrated that it is also an inducer of apoptosis and differentiation.

Based on that, we decided to evaluate the expression levels of molecules involved in the signalling and metabolic pathways of Vitamin D. A series of human mammary lesions was studied for the expression of VDR, CYP27B1 and CYP24A1. We observed that, upon malignant transformation and breast cancer progression, there is a decrease in VDR and CYP27B1 expression, whereas the expression of CYP24A1 is augmented. These results suggest that, during carcinogenesis, there is an unbalance in the Vitamin D signalling and metabolic pathways in order to favour tumour progression, since tumour cells lose their ability to synthesise and respond to Vitamin D, while increase their ability to degrade it.

Finally, we decided to explore the ability of Vitamin D as a potential therapy for triple-negative basal-like carcinomas, since VDR was expressed in a significant number of invasive breast

carcinomas that were negative for ER, PgR and HER2 expression. We observed that Vitamin D induces the *de novo* expression of the epithelial and differentiation marker E-cadherin in metastatic and triple-negative basal-like breast cancer cells. We demonstrated that the induction was dependent on the duration of the treatment and on the dose of Vitamin D given to the cells; we have also shown that this effect was mediated by VDR, since its inhibition abrogated this effect. Additionally, we demonstrated that Vitamin D is more potent than the demethylating agent 5-aza-dC in inducing E-cadherin expression and that the treatment with Vitamin D seems to be important for the correct localisation of E-cadherin at the cell membrane. Finally, our results suggest that Vitamin D may function as a demethylating agent in *CDH1* / E-cadherin gene promoter.

O cancro da mama é a principal causa de morte por cancro nas mulheres. É uma doença heterogénea, com diferentes subtipos moleculares que estão associados a comportamentos biológicos diversos, várias respostas à terapia e diferentes evoluções clínicas. Apesar de alguns destes subgrupos moleculares disporem de uma terapia dirigida, os tumores mais agressivos, os carcinomas triplo-negativos do tipo basal, ainda não possuem um alvo molecular. Este facto tem levado a intensiva investigação em potenciais abordagens terapêuticas para este tipo particular de tumores.

Na primeira parte desta tese, quisemos estabelecer um painel imunohistoquímico alternativo que pudesse identificar os carcinomas triplo-negativos do tipo basal e que fosse facilmente aplicável em amostras fixadas em formol e incluídas em parafina. Demonstrámos que a P-caderina, a Vimentina e a CK14 são biomarcadores úteis a incluir em painéis imunohistoquímicos para o reconhecimento dos carcinomas triplo-negativos do tipo basal, devido aos seus valores de sensibilidade e especificidade consistentes.

Adicionalmente, os efeitos anti-carcinogénicos da Vitamina D têm sido demonstrados em vários modelos de cancro, incluindo o cancro da mama. A Vitamina D inibe a proliferação, invasão, angiogénese e previne a formação de metástases. Para além disso, alguns estudos demonstram a sua capacidade de indução de apoptose e diferenciação.

Baseados nestas evidências, decidimos avaliar os níveis de expressão de moléculas envolvidas nas vias metabólica e de sinalização da Vitamina D durante a progressão do cancro da mama. Estudámos a expressão do VDR, CYP27B1 e CYP24A1 numa série de lesões mamárias humanas e observámos que, com a transformação maligna e progressão do cancro da mama, ocorre uma redução da expressão do VDR e CYP27B1, enquanto a expressão do CYP24A1 é aumentada. Estes resultados sugerem que, durante a carcinogénese, ocorre um desequilíbrio nas vias metabólicas e de sinalização da Vitamina D, de modo a favorecer a progressão tumoral, uma vez que as células neoplásicas perdem a capacidade de síntese e de resposta à Vitamina D, ao mesmo tempo que potenciam a sua capacidade de a degradar.

Finalmente, explorámos a capacidade da Vitamina D funcionar como uma potencial terapia para os carcinomas triplo-negativos do tipo basal, uma vez que o VDR é expresso por um número considerável de carcinomas invasores da mama, negativos para a expressão de ER, PgR e HER2. Observámos que a Vitamina D induz a expressão *de novo* do marcador epitelial e de diferenciação E-caderina nas células de cancro da mama metastáticas e triplo-negativas do tipo basal. Demonstrámos que essa indução era dependente do tempo de duração do tratamento e da dose de Vitamina D administrada às células; e mostrámos ainda que esse efeito era mediado pela presença do VDR, já que a sua inibição anulava este efeito. Adicionalmente, observámos que o tratamento com Vitamina D foi mais potente que o tratamento com o agente desmetilante 5-aza-dC na indução da expressão da E-caderina e parece ainda ser importante para a correcta localização da E-caderina na membrana citoplasmática. Finalmente, estes resultados sugerem que a Vitamina D pode funcionar como agente desmetilante no promotor do gene *CDH1* / E-caderina.