



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto de la inhibición farmacológica de RANKL
sobre el fenotipo troncal de la línea celular BT-20**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JOSÉ ADÁN GUTIÉRREZ CRUZ



DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. KARLA ITZEL VÁZQUEZ SANTILLÁN

2016

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Gutiérrez
Cruz
José Adán
56198480
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
308053999

2. Datos del tutor

M. en C.
Vázquez
Santillán
Karla Itzel

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Lizano
Soberón
Marcela

4. Datos del sinodal 2

Dra.
García
López
Patricia

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Pérez
Carreón
Julio Isael

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Juárez
Méndez
Sergio

7. Datos del trabajo escrito.

Efecto de la inhibición farmacológica de RANKL sobre el fenotipo troncal de la línea celular BT-20.
54 P. 2016.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se llevó a cabo bajo la tutoría de la M. en C. Karla Itzel Vázquez Santillán, en el laboratorio de Epigenética del Instituto Nacional de Medicina Genómica. Karla, te agradezco que hayas confiado en mí para la realización de este proyecto. También te agradezco el apoyo, las enseñanzas y motivación que me brindaste para poder concluirlo.

Agradezco a la Dra. Vilma Maldonado Lagunas por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por el apoyo brindado durante mi estancia en su laboratorio.

Agradezco a todos los sinodales que revisaron y que con sus observaciones contribuyeron al enriquecimiento de este trabajo.

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCIÓN.....	2
	Cáncer	2
	Definición.....	2
	Carcinogénesis.....	2
	Factores asociados al desarrollo del cáncer.....	3
	Cáncer de mama	4
	Epidemiología.....	4
	Clasificación molecular del cáncer de mama.....	4
	Células troncales tumorales (CTTs)	6
	Características de las CTTs.....	8
	Vías de señalización que regulan el fenotipo troncal.....	10
	RANK/RANKL/OPG	10
	Componentes de la vía de señalización.....	10
	RANK/RANKL/OPG en cáncer.....	12
	RANK/RANKL/OPG y las CTTs.....	13
	Denosumab.....	14
III.	JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
IV.	HIPÓTESIS.....	17
V.	OBJETIVOS.....	17
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
	Cultivo celular	18
	Tratamientos con denosumab	18
	Extracción de RNA	18
	Tratamiento con DNAsa	18
	Síntesis de cDNA	19
	Ensayos de qPCR (quantitative polymerase chain reaction)	19
	Citometría de Flujo	20
	Análisis estadístico	21
VII.	RESULTADOS.....	22
	Integridad del RNA de la muestras	22

Curvas de disociación de los ensayos de RT-qPCR	22
Nivel de expresión de RANK y RANKL en 4 líneas celulares de cáncer de mama	23
Efecto de denosumab sobre la proporción de CTTs de la línea celular BT-20	25
Efecto de denosumab sobre el nivel de proteína de CD44 y CD24	27
Nivel de expresión de los factores de transcripción <i>NANOG</i> y <i>SOX2</i> en células BT-20 tratadas con denosumab	28
Denosumab y su efecto sobre la formación de mamoesferas	29
VIII. DISCUSIÓN.....	31
IX. CONCLUSION	36
X. PERSPECTIVAS	37
XI. REFERENCIAS.....	38

ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementario	TNF	Factor de Necrosis Tumoral
CTTs	Células Troncales Tumorales	TRAF	Factor Asociado al Receptor de Necrosis Tumoral
DNA	Ácido Desoxirribonucleico		
ER	Receptor de Estrógeno		
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico		
FACS	Separación Celular Activada por Fluorescencia		
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína		
LMA	Leucemia Mieloide Aguda		
mRNA	RNA mensajero		
NF- κ B	Factor Nuclear Kappa B		
NIK	Cinasa Inductora de NF- κ B		
OMS	Organización Mundial de la Salud		
PE	Ficoeritrina		
PR	Receptor de Progesterona		
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa		
RANK	Receptor Activador de NF- κ B		
RANKL	Ligando del Receptor Activador de NF- κ B		
SBF	Suero Bovino Fetal		

I. RESUMEN

Las células troncales tumorales (CTTs) son células con la capacidad de diferenciarse en tipos celulares que componen un tumor maligno, además, poseen la habilidad de autorenovarse (generar copias idénticas de sí mismas) y formar tumores cuando son trasplantadas en ratones inmunodeficientes. En cáncer de mama, la población de CTTs se define por la expresión elevada de CD44 y baja o nula de CD24 (CD44⁺/CD24^{-/low}).

Estudios recientes han demostrado que el Ligando del Receptor Activador del Factor Nuclear κ B (RANKL) y su receptor (RANK), regulan el fenotipo troncal en cáncer de mama. En el año 2010, la Food and Drug Administration (FDA) aprobó el uso de un anticuerpo monoclonal (denosumab) dirigido hacia RANKL para el tratamiento de la osteoporosis, tumores de mama y próstata con metástasis a hueso, sin embargo, el efecto de este fármaco sobre el fenotipo troncal en células tumorales de mama se desconoce. Por tal razón, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inhibición farmacológica de RANKL sobre el fenotipo troncal en dichas células.

Para llevar a cabo este objetivo se analizó la expresión de RANK y RANKL en un panel de 4 líneas celulares de cáncer de mama mediante ensayos de RT-qPCR. Posteriormente se realizaron tratamientos con denosumab para analizar su efecto sobre la proporción de CTTs y la expresión de proteína de CD44 y CD24 mediante citometría de flujo. También se evaluó el efecto de denosumab sobre la expresión de *NANOG* y *SOX2* (factores de transcripción asociados a la pluripotencia celular) por RT-qPCR y la formación de mamoesferas derivadas de células BT-20.

Los resultados mostraron que todas las líneas celulares de cáncer de mama analizadas expresan RANK y baja expresión de RANKL. La línea celular con mayor expresión de RANK fue BT-20 por lo que fue utilizada para los tratamientos con el fármaco.

Denosumab disminuyó la población CD44⁺/CD24^{-/low} e incremento la población CD44⁺/CD24⁺, incremento la expresión de CD24 pero no de CD44, redujo la expresión de los genes *SOX2* y *NANOG* e impidió la formación de mamoesferas de la línea celular BT-20.

En conclusión, los resultados de este trabajo demuestran que denosumab reduce la población de CTTs de la línea celular BT-20 de cáncer de mama, lo que eventualmente podría llevar al uso del fármaco como inhibidor de las CTTs en los tumores en donde esta población celular se encuentra enriquecida, como los tumores triple negativo.

II. INTRODUCCIÓN

Cáncer

Definición

El término «cáncer» hace referencia a un amplio grupo de enfermedades que se caracterizan por la división descontrolada de las células (Hanahan y Weinberg, 2000). En la mayoría de estos padecimientos, las células proliferan hasta formar masas celulares -conocidas como tumores malignos- que comprometen la integridad y función de los órganos adyacentes. Otra característica de las células cancerosas o tumorales, es la capacidad de migrar a otras regiones del cuerpo y formar nuevos tumores. Este proceso es conocido como metástasis y es la principal causa de muerte por cáncer (Weinberg, 2014).

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En el año 2012, la Organización Mundial de la Salud (OMS), registró 8.2 millones de muertes y 14.1 millones de nuevos casos en el mundo. Los tipos de cáncer con mayor incidencia en la población, en ese mismo año, fueron el de pulmón, próstata, mama y colon; mientras que los tipos de cáncer con mayores decesos fueron el de pulmón, hígado, estomago, colon y mama (GLOBOCAN, 2012).

Carcinogénesis

El cáncer es producto de una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que se acumulan de manera gradual en las células. Tales alteraciones ocurren en dos tipos de genes clave para la homeostasis celular: oncogenes y genes supresores de tumores (Weinberg y Hanahan, 2000). Los primeros, son genes cuya ganancia de función permite la progresión hacia una célula tumoral mediante la promoción de la proliferación o la evasión de la muerte celular (Croce, 2008). Los segundos, son genes encargados de resguardar la integridad del genoma, inhibir la proliferación y promover la muerte celular; en cáncer se ha observado que hay una pérdida de su función (Weinberg y Hanahan, 2000).

La alteración de oncogenes y genes supresores de tumores -generada por factores como la inestabilidad genómica, la inflamación y el microambiente tumoral- conducen a la adquisición de una serie de ventajas proliferativas que culminan con la transformación total de una célula normal a una tumoral. Durante la carcinogénesis, las células adquieren la capacidad de dividirse indefinidamente, sintetizar sus propias señales de proliferación, evadir la muerte celular

programada (apoptosis), generar vasos sanguíneos nuevos (angiogénesis) para nutrirse de oxígeno y nutrientes, eludir los ataques del sistema inmune del hospedero, reprogramar su metabolismo de acuerdo a sus necesidades energéticas, e invadir y generar metástasis en otros órganos del cuerpo (Figura 1) (Hanahan y Weinberg, 2000; 2011)



Figura 1. Capacidades o hallmarks del cáncer. Durante el desarrollo de un tumor maligno, las células adquieren una serie de capacidades que les permiten dividirse descontroladamente, hasta el punto de formar masas celulares que comprometen la integridad de los órganos en donde residen (Modificado de Hanahan y Weinberg, 2000; 2011).

Factores asociados al desarrollo del cáncer

La Organización Mundial de la Salud clasifica los factores asociados al desarrollo de cáncer en dos grupos: ambientales y genéticos (OMS, 2015). Los factores ambientales, a su vez, se dividen en 3 tipos: físicos, químicos y biológicos.

En los primeros, se agrupan las radiaciones, como la ionizante o la ultravioleta. Éstas generan mutaciones en la secuencia de DNA que promueven la activación de oncogenes o inactivación de genes supresores de tumores (*American Cancer Society, 2016*).

En los segundos, se incluyen compuestos como: asbestos, benceno, cisplatino y más de 100 sustancias clasificadas como carcinógenos por la International Agency for Research on Cancer (IARC). Estos agentes alteran la secuencia de DNA, generando consecuentemente la alteración de los genes ya mencionados (Wogan et al., 2004).

Dentro de los terceros se incluyen aquellos agentes como: virus, bacterias u otros organismos que, mediante varios mecanismos, favorecen la carcinogénesis. Tal es el caso de los Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo, cuyas proteínas oncogénicas E6 y E7 promueven la degradación de P53 y RB -dos proteínas clave en el resguardo de la integridad del genoma y la correcta progresión del ciclo celular- (Crook y Vousden, 1991).

Los factores genéticos hacen referencia a las alteraciones en el DNA que se originan de manera espontánea o que son heredadas de padres a hijos (Frank, 2004). En este último caso se habla de predisposición genética, ya que los portadores del gen alterado son propensos a desarrollar cáncer en algún momento de su vida (Welch y King, 2001).

Cáncer de mama

Epidemiología

El cáncer de mama es la neoplasia maligna con mayor incidencia y mortalidad en mujeres a nivel mundial. En el año 2012, la OMS, registró alrededor de 1.67 millones de nuevos casos y 522,000 decesos (GLOBOCAN, 2012). En México, el cáncer de mama, representa un importante problema de salud pública ya que es el tumor maligno con mayor incidencia y mortalidad en la población femenina (Chávarri-Guerra et al., 2012).

Clasificación molecular del cáncer de mama

Los tumores de mama se clasifican de acuerdo a su origen en ductales o lobulares y, dentro de estos, pueden agruparse en *in situ* o invasivos (BCSC, 2016). Actualmente, la clasificación más aceptada es la basada en los perfiles de expresión global generados a partir de microarreglos de cDNA (DNA complementario) de muestras de pacientes con dicha enfermedad (Perou et al., 2000;

Sørli et al., 2001). Con base en estos análisis se han propuesto 5 subtipos moleculares de cáncer de mama:

Luminal A

Estos tumores se caracterizan por la expresión elevada del Receptor de Estrógeno (ER), la ausencia de expresión de HER2 (Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico), y la expresión o no del Receptor de Progesterona (Holliday y Speirs, 2011). Las células que componen estos tumores proliferan lentamente, mostrando bajo nivel de expresión de Ki67 (marcador de proliferación) (Eroles et al., 2007).

Luminal B

Se caracterizan por la expresión elevada del Receptor de Estrógeno, además, pueden presentar o no expresión de HER2 y el Receptor de Progesterona (Eroles et al., 2007; Creighton, 2012). Los tumores luminales B no tienen un pronóstico favorable, debido a que las células que los componen proliferan rápidamente (son positivos a Ki67) (Tran y Bedard, 2011).

HER2 positivos

La principal característica de estos tumores es la expresión alta de HER2 (González-Niño et al., 2007). Este gen, que se encuentra amplificado en la mayoría de los casos diagnosticados, codifica para un receptor membranal con actividad cinasa de tirosina que sobreestimula la proliferación de las células (Gutierrez y Schiff, 2011). Los tumores HER2 positivos no expresan el Receptor de Estrógeno y Progesterona, y muestran nivel alto de expresión de Ki67 (Eroles et al., 2007).

Basales

Estos tumores expresan una o más citoqueratinas basales, como la citoqueratina 5, 6 o 17 (Brenton et al., 2005). Muestran expresión o no el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (*EGFR*) y expresión baja o nula del Receptor de Estrógeno y HER2 (Schnitt, 2010). Las células que componen estos tumores muestran una tasa de proliferación alta ya que presentan un alto índice mitótico (Badve et al., 2011).

Bajos en Claudina

Este subtipo molecular de cáncer de mama presenta expresión baja de E-caderina y Claudina 3, además, no expresan HER2 y el Receptor de Estrógeno. Las células que componen estos tumores son altamente invasivas y metastásicas por lo que suelen ser diagnosticados con un mal pronóstico (Sebatier et al., 2014).

Los tumores Basales y Bajos en Claudina suelen agruparse en un solo tipo conocido como Tumores Triple Negativo, TNBC (por sus siglas en inglés *Triple Negative Breast Cancers*). La principal característica de estos es que no expresan ER, PR y HER2. Los tumores TNBC tienen un mal pronóstico ya que muestran una alta reincidencia después del tratamiento con quimio o radioterapia (Chon et al., 2016), además, se componen de un porcentaje alto de células troncales tumorales (CTTs) (Prat et al., 2010).

Células troncales tumorales (CTTs)

Los tumores se componen de poblaciones celulares altamente heterogéneas. En el interior de estos se han identificado poblaciones celulares con diferente morfología, función y alteraciones genéticas (Kandoth et al., 2015). Para explicar esta heterogeneidad se han propuesto dos modelos: el estocástico o de evolución clonal y el de las células troncales tumorales (CTTs) (en inglés *cancer stem cells (CSCs)*).

El primer modelo propone que los tumores se componen de poblaciones celulares homogéneas, que la heterogeneidad observada en las diferentes neoplasias malignas es producto de factores estocásticos (mutaciones, microambiente, sistema inmune del hospedero) que influyen en el comportamiento tumorigénico de las células que las componen. El que una célula tumoral pueda o no formar tumores en modelos *in vivo* depende de alteraciones genéticas o epigenéticas adicionales que potencian su capacidad tumorigénica (Figura 2 a) (Nowell, 1976; Dick, 2008).

El segundo modelo, el de las células troncales tumorales (CTTs), establece que los tumores se originan a partir de una fracción de células con la capacidad de generar diferentes tipos celulares que componen un tumor. Estas células, además, poseen la capacidad de replicarse a sí mismas mediante un proceso conocido como autorenovación (Dick, 2008) (Figura 2 b).

Se ha propuesto que las CTTs se originan a partir de células troncales normales o células progenitoras que por alteraciones genéticas y epigenéticas han adquirido un fenotipo tumoral, sin

embargo, no hay un consenso al respecto. Los dos modelos no son mutuamente excluyentes pero, en años recientes, se ha reportado mayor evidencia que apoya la hipótesis de las CTTs.

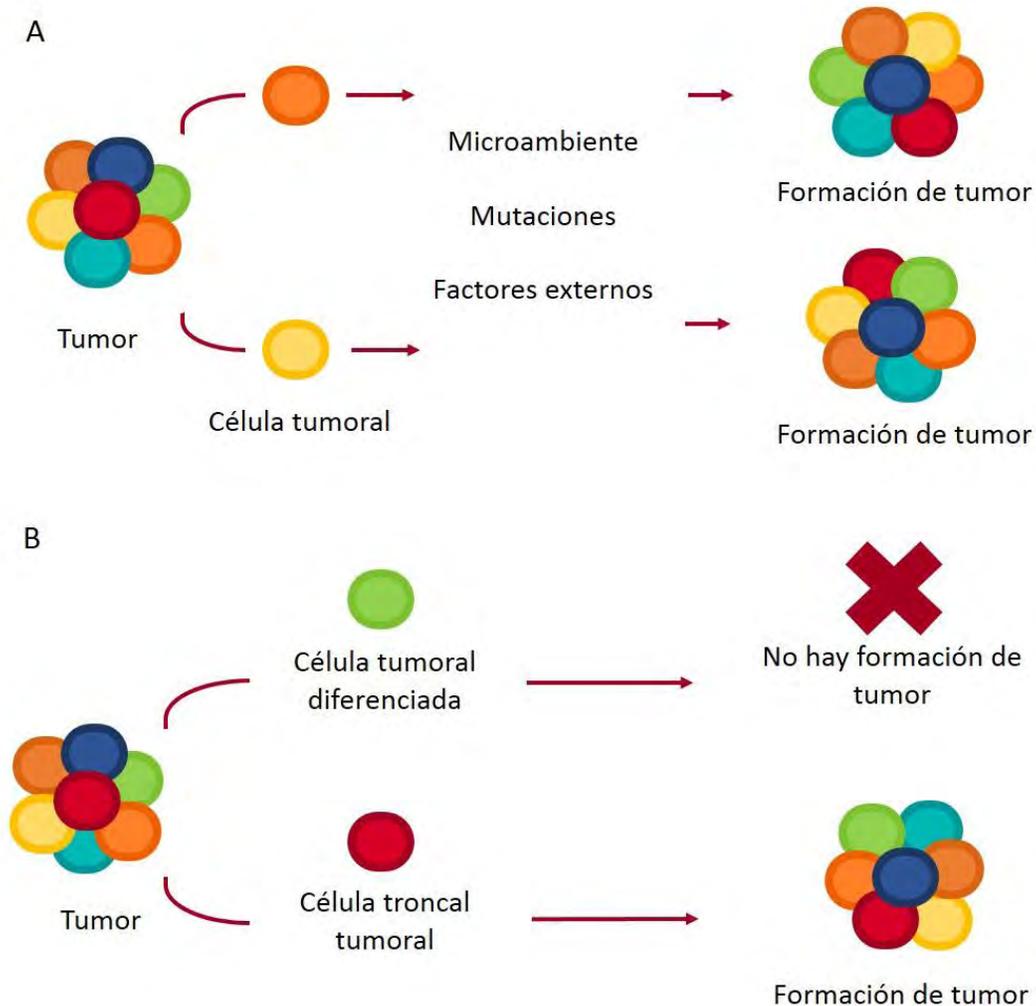


Figura 2. Modelos del origen de la heterogeneidad celular de los tumores malignos. a) Modelo estocástico o de evolución clonal. En este modelo, la heterogeneidad tumoral es generada por factores estocásticos que influyen en la capacidad tumorigénica de las células. Hipotéticamente, todas las células tumorales son capaces de formar tumores cuando son trapiantadas en ratones inmunodeficientes. b) Modelo de las células troncales tumorales (CTTs). En este modelo, los tumores se originan a partir de una población de células indiferenciadas con la capacidad de formar los diferentes linajes celulares que los componen. Nótese que las células diferenciadas no poseen la misma capacidad de formación de tumores que las CTTs.

La primera evidencia funcional de la existencia de las CTTs proviene de los estudios de John Dick en células troncales hematopoyéticas de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda (LMA). Su grupo de trabajo aisló las poblaciones celulares positivas a CD34, las negativas a CD34 y las combinaciones

CD38⁺/CD34⁺ y CD34⁺/CD38⁻, de personas con dicho padecimiento y las trasplantó en ratones inmunodeficientes de manera independiente. De las poblaciones celulares trasplantadas, la única capaz de proliferar y mimetizar la formación del tumor fue la población CD34⁺/CD38⁻ (Lapidot et al., 1994; Bonnet y Dick, 1997). Estas células fueron nombradas células troncales tumorales (CTTs) o células iniciadoras de tumores (CITs) debido a que asemejaban a su contraparte normal.

Los hallazgos de John Dick y su grupo de trabajo dieron pie a que en años posteriores se identificarán CTTs en tumores sólidos como los de mama (Al-Hajj et al., 2003), cerebro (Singh et al., 2004), próstata (Collins et al., 2005) y pulmón (Eramo et al., 2008).

Características de las CTTs

Las células troncales tumorales poseen una serie de características que permiten su identificación mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Las CTTs tienen una alta capacidad clonogénica y proliferativa (Beaver et al., 2014), son altamente invasivas y metastásicas (Shiozawa et al., 2013), y resistentes a la mayoría de los tratamientos con fármacos convencionales como cisplatino y paclitaxel (Abdullah y Chow, 2013). Sin embargo, la característica más importante para identificar a las CTTs, es su capacidad de mimetizar la formación de un tumor cuando son trasplantadas en ratones inmunodeficientes (Bonnet y Dick, 1997). Otras de las características de las CTTs se describen a continuación:

Formación de esferas en suspensión

Las esferas son estructuras formadas por células que crecen en condiciones de baja adherencia (Pastrana et al., 2011). Estas estructuras muestran un enriquecimiento de células troncales (tanto en modelos de células troncales normales como tumorales (Wang et al., 2013)). Con estos ensayos no solo se enriquece la población de CTTs sino que, además, se determina la capacidad clonogénica de estas células (Wang et al., 2014).

Expresión de genes asociados a la pluripotencia

Los genes *SOX2*, *OCT4* y *NANOG* codifican para factores de transcripción que mantienen en estado de pluripotencia y autorenovación a las células troncales normales y tumorales (Saunders et al., 2013; Pan y Thompson, 2007). Algunos de los genes regulados por estas proteínas son: β -catenina, telomerasa y c-Myc, que también se han asociado a la carcinogénesis en varios tumores. La

expresión de *SOX2*, *NANOG* y *OCT4* es específica de las CTTs, por lo que suelen utilizarse como marcadores para identificar estas células (Rizzino, 2013).

Expresión de marcadores de superficie celular

Una de las características que ha permitido aislar CTTs de varios tumores es la presencia (+) o ausencia (-) de proteínas de superficie. Estas se expresan de manera específica en las CTTs, por lo que pueden ser identificadas por anticuerpos acoplados a fluoróforos que reconocen algún epítipo presente en ellas. Las proteínas de superficie utilizadas para identificar CTTs varían de acuerdo al tipo de tumor; por ejemplo, en LMA, la población troncal se define por la combinación CD34⁺/CD38⁻ (Bonnet y Dick, 1997); en cáncer de pulmón y cerebro por CD133⁺ (Singh et al, 2004; Eramo et al; 2008); y en cáncer de mama por la combinación CD44⁺/CD24^{-/low} (Al-Hajj et al., 2003).

Las proteínas de superficie CD44 y CD24 fueron los primeros marcadores utilizados para identificar y aislar células troncales tumorales de cáncer de mama (Hajj et al., 2003). La población celular CD44⁺/CD24^{-/low} muestra expresión alta de los genes asociados a la pluripotencia, posee una capacidad clonogénica alta y es capaz de formar tumores cuando un pequeño número de ellas es trasplantada en ratones inmunodeficientes.

CD44

Es una glicoproteína de membrana que actúa como receptor del ácido hialurónico y otras proteínas de la matriz extracelular como: colágeno, fibronectina y laminina (Yan et al., 2015). CD44 es el principal marcador de las CTTs en tumores de mama, colon (Ju et al, 2013), ovario (Sacks y Barbolina, 2015) y próstata (Medema, 2013). La señalización río abajo de CD44 converge con vías de señalización como NF-κB o Wnt, que ya han demostrado regular la pluripotencia y la autorenovación en las células troncales normales (Schmitt et al., 2014; Hiraga et al., 2013).

CD24

Este gen codifica para una glicoproteína de alrededor de 27 aminoácidos que se encuentra anclada a la membrana celular mediante una molécula de glucosilfosfatidilinositol (GPI) (Lim, 2005). CD24 tiene diferentes funciones y éstas dependen del contexto celular (Fang et al., 2010). Sin embargo, se sabe que su alteración conduce a la adquisición de varios *hallmarks* asociados a la carcinogénesis, como la evasión de la muerte celular e invasión y metástasis (Kristiansen et al., 2003).

La población celular CD44⁺/CD24^{-/low} representa una población de células troncales tumorales de mama mesenquimales (caracterizada por la expresión alta de Vimentina y baja de E-caderina) cuya presencia se ha asociado a los tumores triple negativo (Al-Hajj et al., 2003). Las células con una alta expresión y actividad de las enzimas aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1A1) (Genestier et al., 2007) y aldehído deshidrogenasa 3 (ALDH1A3) (Marcato et al., 2011) también representan a la población de CTTs en cáncer de mama, sin embargo, su expresión se asocia con una población de CTTs epiteliales (Yang et al., 2016).

Vías de señalización que regulan el fenotipo troncal

El fenotipo troncal es regulado por las vías de señalización Wnt, Notch, Hedgehog y TGF- β (Karamboulas y Ailles, 2013). Estas vías regulan la pluripotencia y autorenovación en las células troncales normales, sin embargo, en las CTTs su actividad es producto de la alteración de sus componentes. Recientemente se ha descrito que la vía de señalización RANK/RANKL/OPG regula también el fenotipo troncal en las CTTs, especialmente, en tumores de mama y próstata (Pellegrini et al., 2013; Chu et al., 2014).

RANK/RANKL/OPG

Componentes de la vía de señalización

La vía de señalización RANK/RANKL/OPG es un sistema de comunicación celular que controla procesos de proliferación (Kondegowda et al., 2015), muerte y diferenciación celular en varios tejidos (Schramek et al., 2010). Este sistema se compone del Receptor Activador del Factor Nuclear Kappa B (RANK), su ligando RANKL y la Osteoprotegerina (OPG). Estas proteínas pertenecen a la superfamilia de Receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR).

RANK

El gen *RANK*, también conocido como *TNFRSF11A*, codifica para un receptor membranal tipo I sin actividad enzimática. La unión de RANK a su ligando genera sitios de acoplamiento en su dominio intracelular que son reconocidos por proteínas adaptadoras conocidas como TRAFs (*Tumor Necrosis Receptor-Associated Factors*) (Xie, 2013). Estas proteínas reclutan complejos proteicos en el citoplasma que modulan la actividad de las vías de señalización de MAP cinasas, PI3K-AKT y NF- κ B (Walsh y Choi, 2014).

RANKL

RANKL, conocido también por el nombre de *TNFSF11*, codifica para una proteína membranal tipo II que actúa como ligando del receptor RANK. RANKL existe en dos formas en la célula: soluble o adherido a la membrana celular. La forma soluble se genera a partir de un corte proteolítico en el dominio transmembranal de la forma membranal. Este corte es realizado por las metaloproteasas ADAM-10, MMP-7 y MMP-14 (Lacey et al., 2012). A la fecha, RANKL es el único ligando conocido del receptor RANK (Renema et al., 2016).

OPG

El gen *OPG* codifica para una proteína soluble que antagoniza a RANKL. OPG se une a esta proteína e impide su interacción con RANK. La interacción OPG-RANKL evita la activación de las vías de señalización río abajo de RANK. OPG tiene funciones independientes de la vía de señalización RANK/RANKL/OPG por lo que no es específica de este sistema de comunicación celular (Holen y Shipman, 2006).

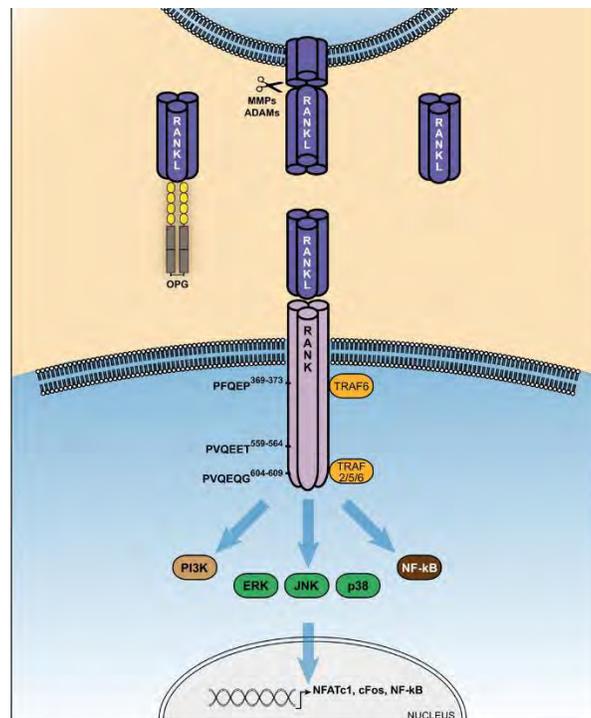


Figura 3. Vía de señalización RANK/RANKL/OPG. La unión de RANKL a RANK genera sitios de acoplamiento en el dominio intracelular de RANK que son reconocidos por las proteínas adaptadoras TRAFs. Éstas proteínas

interactúan con otras proteínas en el citoplasma que activan vías de señalización como las MAP cinasas, PI3K y NF- κ B. Por el contrario, la unión de OPG a RANKL evita su interacción con RANK, lo que ocasiona que las vías de señalización río abajo del receptor no puedan ser activadas (Modificado de González-Suarez y Sanz-Moreno, 2016).

RANK/RANKL/OPG en cáncer

La vía de señalización RANK/RANKL/OPG se ha asociado con la adquisición de varios *hallmarks* característicos del cáncer, como la evasión de la muerte celular, la proliferación celular, la angiogénesis y la invasión y metástasis, en varios tejidos (Terpos et al., 2003; González-Suarez y Sanz-Moreno, 2016). En modelos *in vivo* de cáncer de próstata, el silenciamiento de RANK previene la formación de tumores y disminuye la capacidad de las células tumorales para generar metástasis al hueso (Chu et al., 2014). En ratones inmunodeficientes, la sobreexpresión de RANKL Induce la formación de vasos sanguíneos a partir de células endoteliales HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) (Min et al., 2006). Cabe mencionar que todas las vías de señalización río abajo de RANK (MAP cinasas, PI3K y NF- κ B) se encuentran alteradas en muchos tipos de cáncer, como los de mama (Liu et al., 2012), próstata (Rodríguez-Berriguete et al., 2012) y colon (Danielsen et al., 2015), por mencionar algunos ejemplos.

El sistema RANK/RANKL/OPG es de especial importancia en cáncer de mama puesto que, en años recientes, varios reportes han demostrado que la vía de señalización juega un papel muy importante durante la iniciación y progresión de dichos tumores (Garraway y Geffen, 2013; Gonzalez-Suarez et al., 2010). La expresión elevada de RANK en adenocarcinomas de mama es asociada con parámetros de importancia clínica, como una baja tasa de supervivencia libre de enfermedad y un mal pronóstico (Santini et al., 2011). La presencia de RANK también se ha reportado en tumores de alto grado (poco diferenciados) y con una tasa proliferativa alta (Pfitzner et al., 2014).

La expresión de RANKL es baja en muestras de pacientes con cáncer de mama, sin embargo, ha sido descrita con expresión alta en algunos casos de carcinomas ductales invasivos (Gonzalez-Suarez., 2010; Tan et al., 2011).

La actividad oncogénica de la vía de señalización también se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. La sobreexpresión de RANK y RANKL en epitelio de mama de ratón incrementa la proliferación de las células y la aparición de lesiones preneoplásicas, lo que eventualmente conduce al desarrollo de adenocarcinomas (Gonzalez-Suarez., 2010). Por otro lado, en líneas celulares de

cáncer de mama, la sobreexpresión de RANKL incrementa la expresión de *N-caderina*, *Vimentina* y *Fibronectina*, genes que se han asociado a una mayor movilidad de la células y, por tanto, a una mayor capacidad de éstas para migrar a otros órganos (Tang et al., 2011; Chu et al., 2014) La sobreexpresión de RANKL en células MDA-MB-231 incrementa la capacidad de migración de las células tumorales, principalmente, al hueso (Zhang et al., 2012; Blake et al., 2013).

La vía de señalización RANK/RANKL/OPG es la principal reguladora de la remodelación del tejido óseo en humanos. El balance entre la absorción y formación de este tejido se encuentra fuertemente alterado en tumores de próstata y mama (Blake et al., 2013). El metabolismo óseo es regulado por los osteoblastos, células derivadas del linaje linfoide; y los osteoclastos, células multinucleadas derivadas de precursores hematopoyéticos que secretan enzimas ácidas que degradan el hueso. Las células tumorales secretan una serie de moléculas que estimulan a los osteoblastos y células del microambiente a producir RANKL. Esta proteína se une a RANK en la superficie de los osteoclastos inmaduros permitiendo su maduración. Ya maduros, los osteoclastos degradan el hueso, promoviendo de esta forma el establecimiento de las células tumorales en dicho sitio (Zhang et al., 2001).

RANK/RANKL/OPG y las CTTs

La vía de señalización RANK/RANKL/OPG regula el fenotipo en las células troncales normales y tumorales. En el año 2013, Pellegrini y colaboradores demostraron que la sobreexpresión de RANK en tejido de mama de ratón impide la diferenciación de las células troncales de mama, además, observaron un incremento de la población de células progenitoras (destinadas a diferenciarse en células luminales). El incremento de estas poblaciones celulares eventualmente condujo a la formación tumores en los ratones que sobreexpresaron RANK. Otro estudio, en ese mismo año, reportó que la expresión de RANKL es esencial para el proceso de diferenciación de las células troncales epiteliales a células progenitoras de los ductos de la mama de ratones (Lee et al., 2013).

En el año 2016, Yoldi y colaboradores generaron un modelo de formación de adenocarcinomas en el epitelio de mama de ratón. Los tumores formados en estos ensayos mostraron expresión alta de RANK y RANKL. Al inhibir la actividad de ambas proteínas observaron un decremento de la población de las células troncales tumorales. Esta disminución fue acompañada del incremento en la respuesta al tratamiento con docetaxel y la disminución de la capacidad de estas células para generar metástasis a pulmón.

Por otro lado, la sobreexpresión de RANK en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-436, HCC1937 y UACC3192 incrementa la proporción de células CD44⁺CD24^{-/low} y con ello la capacidad de estas células para generar nuevos tumores en ratones inmunodeficientes (Palafox et al., 2012). Asimismo, se ha demostrado una correlación positiva entre la expresión de RANK y CD44 en tejido de pacientes diagnosticados con carcinoma oral de células escamosas (Grimm et al., 2015), lo que sugiere que RANK pudiera estar modulando el fenotipo troncal en ese tipo de cáncer. Finalmente, la inhibición de RANKL en células de cáncer de próstata disminuye la proporción de células troncales tumorales y la expresión de los factores de transcripción asociados a la pluripotencia (Chu et al., 2014).

Denosumab

En el año 2010, la Food and Drug Administration (FDA) aprobó el uso de un anticuerpo monoclonal dirigido contra RANKL para el tratamiento de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas. Este anticuerpo, del tipo IgG2, conocido comúnmente como denosumab y comercialmente como Prolia (Amgen), mimetiza el efecto de OPG, ya que se une directamente a RANKL e impide su interacción con RANK en la superficie de los osteoclastos inmaduros. Esto previene su maduración y con ello su capacidad para degradar el hueso (Figura 4). A nivel fisiológico, el tratamiento con el fármaco reduce el riesgo de desarrollar fracturas, desgaste de los huesos u otros eventos asociados con la degradación del tejido óseo (Dahiya et al., 2014). Denosumab también ha sido aprobado para el tratamiento de tumores sólidos (cáncer de mama y próstata) con metástasis a hueso, bajo el nombre de Xgeva (Amgen). El objetivo de este tratamiento es disminuir el riesgo de generar fracturas u otro tipo de lesiones óseas provocadas por la metástasis de las células tumorales a dicho tejido (Lipton y Jacobs., 2011; Gnant et al., 2015). En el año 2013, denosumab, fue aprobado por primera vez para el tratamiento de un tumor maligno, el de células gigantes del tejido óseo. Actualmente se encuentran corriendo una serie de intentos clínicos con la finalidad de aprobar el uso del fármaco para el tratamiento de diferentes neoplasias malignas, como mielomas o cánceres de próstata y mama. Denosumab representa una importante alternativa de tratamiento en éstos últimos. Se ha reportado que los tumores con mutaciones en el gen BRCA1 y positivos a RANK muestran un fenotipo similar al subtipo molecular basal, el cual se encuentra enriquecido por CTTs (Nolan et al, 2016). Este tipo de cáncer de mama no tiene un tratamiento específico por lo que denosumab podría resultar una opción de tratamiento adyuvante.

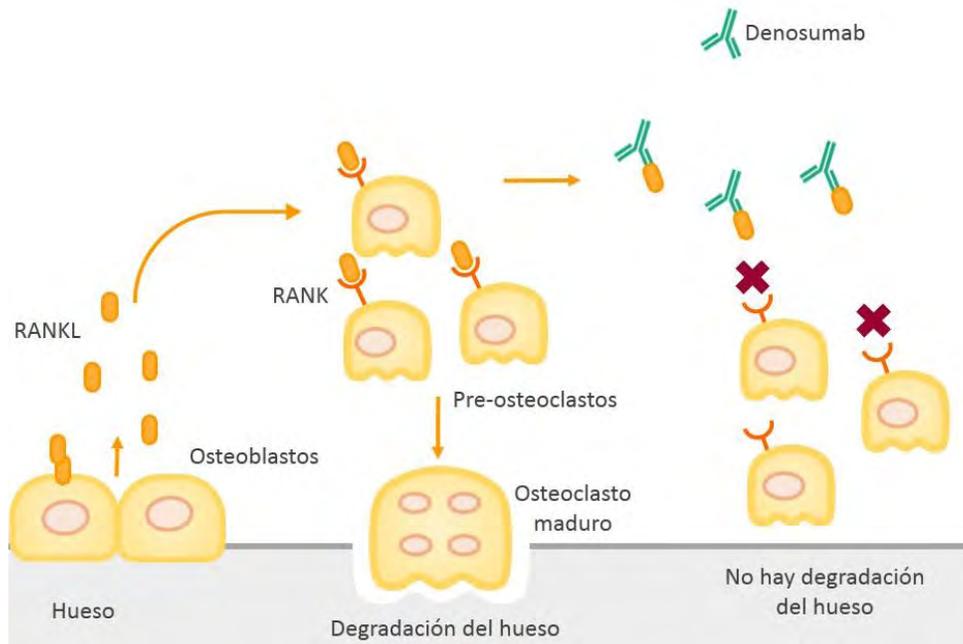


Figura 4. Regulación del metabolismo óseo por la vía de señalización RANK/RANKL/OPG. Los osteoblastos secretan RANKL que se une a RANK en la superficie de los pre-osteoclastos. Esto permite su maduración a osteoclastos maduros, los cuales llevan a cabo la degradación del hueso. Denosumab evita la unión de RANKL a RANK, generando que los pre-osteoclastos no lleguen a una etapa madura y por lo tanto no lleven a cabo su función.

III. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente existen tratamientos dirigidos contra moléculas que modulan la proliferación celular en los principales subtipos moleculares de cáncer de mama, sin embargo, los tumores triple negativo (subtipos moleculares Basales y Bajos en Claudina), carecen de un tratamiento específico. Estos tumores se componen de un porcentaje alto de células troncales tumorales, las cuales son resistentes a la mayoría de los fármacos convencionales. La eliminación de las CTTs representa un importante blanco de terapia por lo que resulta de suma importancia identificar inhibidores de dicha población celular.

La sobreexpresión de RANK en líneas celulares de cáncer de mama incrementa la población de CTTs y la capacidad de estas células para generar metástasis a otras partes del cuerpo. En cáncer de próstata la inhibición de RANK y RANKL genera un decremento de la población troncal y de los marcadores asociados a dicho fenotipo. Denosumab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra RANKL para el tratamiento de la osteoporosis, tumores de próstata y mama con metástasis a hueso, sin embargo, su efecto sobre el fenotipo troncal en cáncer de mama permanece desconocido. Por tal razón, resulta de interés determinar si la inhibición farmacológica de RANKL tiene algún efecto sobre las características que definen dicho fenotipo en células tumorales de mama.

IV. HIPÓTESIS

RANKL regula el fenotipo troncal en células de cáncer de mama por lo que su inhibición reducirá la población de CTTs y las características que definen este fenotipo.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto de la inhibición farmacológica RANKL sobre las características que definen el fenotipo troncal en células de cáncer de mama.

Objetivos particulares

- Determinar el nivel de expresión de RANK y RANKL en las líneas celulares MDA-MB-468, BT-20, T-47D y SK-BR-3 de cáncer de mama.
- Determinar el efecto de denosumab sobre la proporción de CTTs en una línea celular de cáncer de mama.
- Evaluar el efecto de denosumab sobre la expresión de los marcadores de troncalidad en una línea celular de cáncer de mama.
- Determinar el efecto del fármaco sobre la formación de mamoesferas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Para este estudio se utilizaron 4 líneas celulares de cáncer de mama: T47-D, MDA-MB-468, BT-20 y SK-BR-3. Todas las líneas celulares fueron obtenidas del ATCC (American Type Culture Collection, Manassas VA, USA). Las células MDA-MB-468 y SK-BR-3 se cultivaron en medio de cultivo DMEM suplementado con 5 % de suero bovino fetal (SBF) y las líneas celulares BT20 y T47-D en medio RPMI-1640 adicionado con 5 % de SBF. Todos los cultivos celulares se incubaron a una temperatura de 37 °C con 5% de CO₂ y 95% de humedad.

Tratamientos con denosumab

Se sembraron 400,000 células BT-20 con medio RPMI-SBF en cajas de 12 pozos y se incubaron en condiciones de cultivo estándar durante 24 horas. Al día siguiente se retiró el medio RPMI-SBF y se sustituyó por medio RPMI-sin SBF. 24 horas después se retiró el medio RPMI-sin SBF y se sustituyó por uno nuevo; además, se agregó denosumab (Xgeva[®], Amgen) en las siguientes concentraciones: 500 ug/mL, 1000 ug/mL, 2000 ug/mL y 3000 ug/mL. Estos tratamientos se incubaron durante 24 horas a 37 °C con 5% de CO₂ y 95% de humedad.

Extracción de RNA

El RNA total de los tratamientos se extrajo mediante el protocolo de *QIAzol Lysis Reagent* de QIAGEN. El RNA obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop ND100 (*Thermo Scientific*), tomando como referencia los índices 260/280 para verificar la calidad de la extracción. La integridad del RNA extraído fue determinada mediante la electroforesis de las muestras en un gel de agarosa al 1.5%.

Tratamiento con DNAsa

El RNA fue tratado con el kit RNase-Free DNase (Promega) para eliminar rastros de DNA. Se mezcló 3 µL de la solución RQ1 RNase-Free DNase 10x Reaction Mix, 3 unidades de enzima RNA-Free DNase, 3 ug de RNA y agua libre de RNAsas para ajustar a un volumen final de 10 µL en un tubo de 0.5 mL. Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Después de esta incubación, se agregó 3 µL de la solución RQ1 DNase Stop Solution y se incubó a 65 °C durante 10 minutos.

Síntesis de cDNA

Se sintetizó cDNA a partir de 2 µg de RNA tratado con DNAsa mediante el kit Maxima First Strand cDNA Syntesis Kit for RT-qPCR de Thermo Scientific. Se agregó los componentes del kit y el RNA en un tubo para PCR de acuerdo a lo enlistado en la tabla 1.

Tabla 1. Componentes de la reacción de retrotranscripción (RT)

5x Reaction Mix	4 µL
Maxima Enzyme Mix	2 µL
RNA	2µg
Agua libre de nucleasas	variable
Volumen final	20 µL

Las muestras fueron incubadas en un termociclador GeneAMP 9700 (Applied Biosystems) de la siguiente manera: 10 minutos a 25 °C, seguido de 30 minutos a 50 °C y finalmente 5 minutos a 85 °C.

Ensayos de qPCR (quantitative polymerase chain reaction)

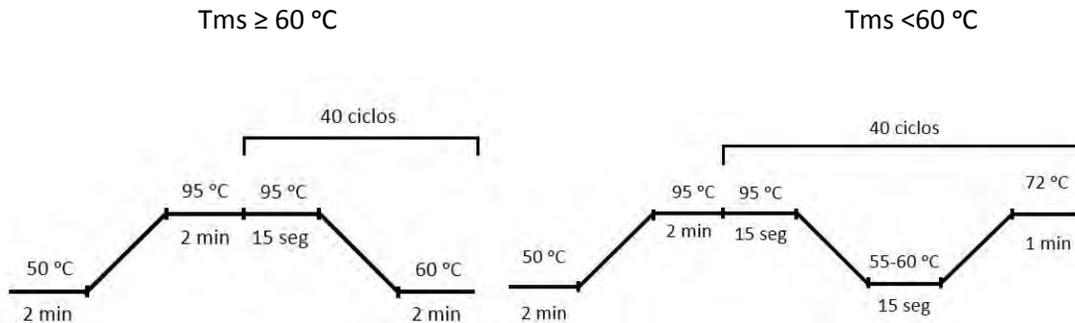
Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) usando el kit SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems) y 50 ng del cDNA obtenido. Los oligonucleótidos para los ensayos de qPCR se enlistan en la tabla 2.

Tabla. 2. Oligonucleótidos utilizados para los ensayos de qPCR.

RANKL	Secuencia	Tm
Forward	5'-TATGCCAACATTTGCTTTTCG-3'	56 °C
Reverse	3'-GGTGCTTCCTTCCTTTTCATCA-5'	
RANK		
Forward	5'-ATCTGGGACGGTGCTGTAA-3'	60 °C
Reverse	3'-CCACAGGGCAGACATACACT-5'	
TBP		
Forward	5'-GCTCTCATGTACCCTTGCCTCCC-3'	60 °C
Reverse	3'-TGCCACACCTCGCAACTCAACA-5'	
NANOG		

Forward	5'-AGGCAAACAACCCACTTCTG-3'	57 °C
Reverse	3'-TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT-5'	
SOX2		
Forward	5'-CCACAGTTACGCGCACATGA-3'	56 °C
Reverse	3'-AGCCGTTTCATGTAGGTCTGC-5'	

De acuerdo a la Temperatura de fusión (T_m) de los oligonucleótidos utilizados, los programas para qPCR fueron los siguientes:



Al finalizar cada programa, el equipo de qPCR realizó una curva de disociación con el siguiente programa: 15 segundos a 95° C, seguido de 1 minuto a 60° C y 15 segundos a 95° C.

La expresión de genes fue normalizada respecto el gen *TPB* (*TATA Binding Protein*) y las diferencias de expresión fueron calculadas por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Citometría de Flujo

Las células se marcaron con los anticuerpos CD44-FITC (BD Pharmingen) y CD24-PE (BD Pharmigen) de acuerdo a las siguientes concentraciones: 0.6 μL de CD44-FITC y 1.2 μl de CD24-PE por cada 200,000 células. Para los controles de isotipo los anticuerpos utilizados fueron: Mouse IgG1-FITC (MACS Myltenyi Biotec) y Mouse IgG1-PE (MACS Myltenyi Biotec). La concentración utilizada de estos anticuerpos fue la misma que para las muestras problema. Las lecturas se llevaron a cabo en un citómetro FACSaria I (BD Biosciences) y los datos generados fueron analizados en el programa FlowJo™ v10.1.

Ensayos de formación de mamoesferas

Para los ensayos de formación de mamoesferas se utilizó medio MammoCult™ Basal Medium (Human) (Stem Cell Technologies) suplementado con 4 µg/mL de Heparina (*Stem Cell Technologies*), 0.48 µL de Hidrocortisona (*Stem Cell Technologies*) y suplemento MammoCult™ Proliferation (Stem Cell Technologies). Se sembraron 5000 células BT-20 en cajas de crecimiento de baja adherencia, se agregó 1000 ng/mL de denosumab, y se incubó durante una semana en condiciones de cultivo estándar. Al término de la semana se cambió de medio y se agregó nuevamente fármaco con la concentración ya mencionada; se incubó una semana más. Al término de este tiempo, se contaron las mamoesferas formadas, en un microscopio estereoscópico. Para conocer el volumen de las mamoesferas se tomó una serie de fotografías que posteriormente fueron analizadas en el programa ImageJ™ versión 1.46. En este programa se midió el radio de las mamoesferas para después calcular su volumen mediante la fórmula $\frac{4}{3}\pi r^3$.

Análisis estadístico

Los resultados fueron graficados como el promedio de 3 réplicas independientes con su respectivo error estándar. Para determinar la significancia estadística se realizó una prueba de t de student en el programa GraphPad Prism versión 5.01. Los resultados estadísticamente significativos, con una $p < 0.05$ o 0.01 , son marcados con un *.

VII. RESULTADOS

Integridad del RNA de la muestras

La integridad del RNA de las muestras utilizadas en el presente trabajo fue analizada mediante su electroforesis en un gel de agarosa. La Figura 5 muestra el patrón de bandeo generado por la migración del RNA; las bandas que se observan corresponden a las subunidades 28s, 18s y 5s de los ribosomas. La banda de la subunidad 28s es dos, e incluso tres veces mayor, que la de la subunidad 18s.

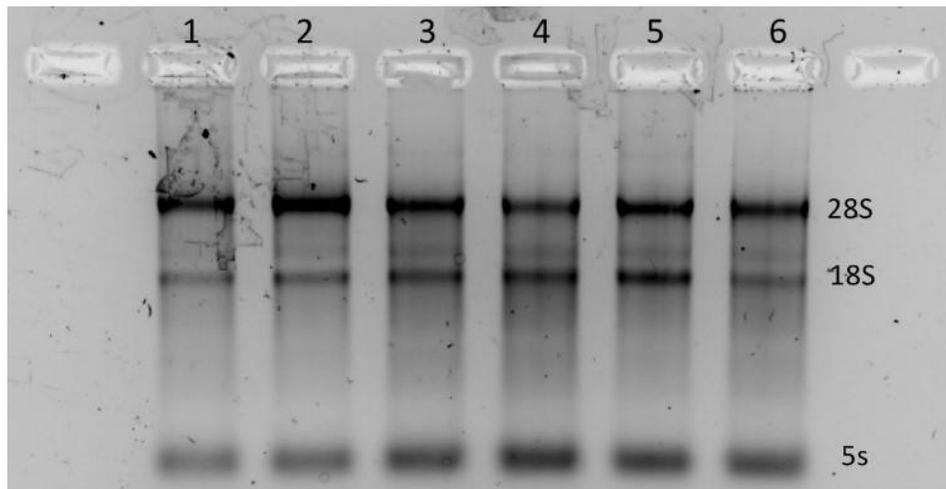


Figura 5. Gel de integridad del RNA total extraído de las muestras. En esta figura se observa la subunidad 28s, 18s y 5s de los ribosomas de las siguientes muestras 1) MDA-MB-468, 2) BT-20, 3) SK-BR-3, 4) T-47D, 5) BT-20 sin tratamiento con denosumab y 6) BT-20 tratadas con denosumab.

Curvas de disociación de los ensayos de RT-qPCR

Para determinar que la unión de los oligonucleótidos utilizados fuera específica a sus blancos se llevaron a cabo curvas de disociación después de los ensayos de RT-qPCR. La Figura 6 muestra las curvas generadas de los amplicones de los genes *TBP*, *RANK*, *RANKL*, *SOX2* y *NANOG*. En todos los casos puede observarse que solo se generó una curva de amplificación, lo que indica que los oligonucleótidos son específicos para detectar un segmento específico de cada gen.

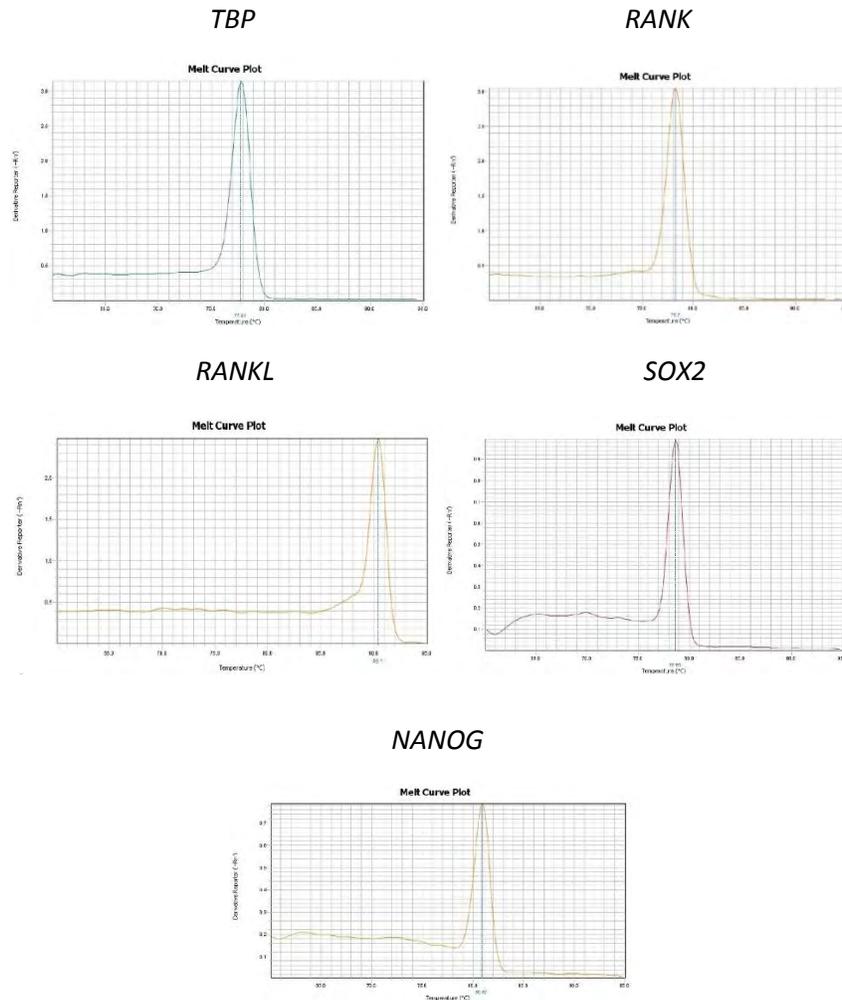


Figura 6. Curvas de disociación de los amplicones generados de los ensayos de RT-qPCR. Las gráficas muestran la amplificación de un segmento de los genes *TBP*, *RANK*, *RANKL*, *SOX2* y *NANOG*.

Nivel de expresión de *RANK* y *RANKL* en 4 líneas celulares de cáncer de mama

La expresión de *RANK* y *RANKL* fue evaluada mediante ensayos de RT-qPCR en 4 líneas celulares de cáncer de mama. La línea celular BT-20, del subtipo molecular basal, mostró el mayor nivel de expresión de *RANK*, mientras que la línea celular T-47D (luminal A) mostró el nivel más bajo de expresión. La línea celular SK-BR-3 (HER2 positiva) y MDA-MB-468 (Basal) mostraron nivel de expresión similar (Figura 7).

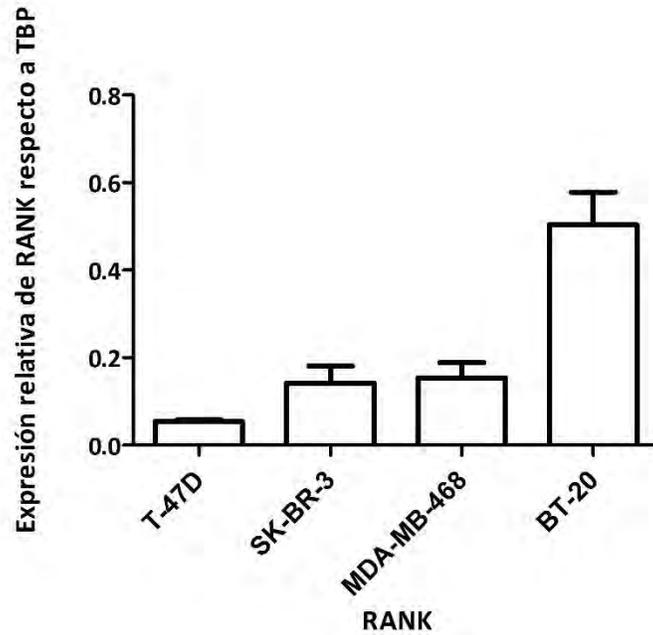


Fig. 7. Expresión de RANK en 4 líneas celulares de cáncer de mama. La expresión de *RANK* fue normalizada respecto a *TBP*. Las barras representan el promedio de 3 réplicas independientes.

Al evaluar el nivel de expresión de *RANKL* en las 4 líneas celulares de cáncer de mama, se encontró que todas muestran bajo nivel del transcrito. En la Figura 8 se observa que este comienza a amplificar a partir del ciclo 34.

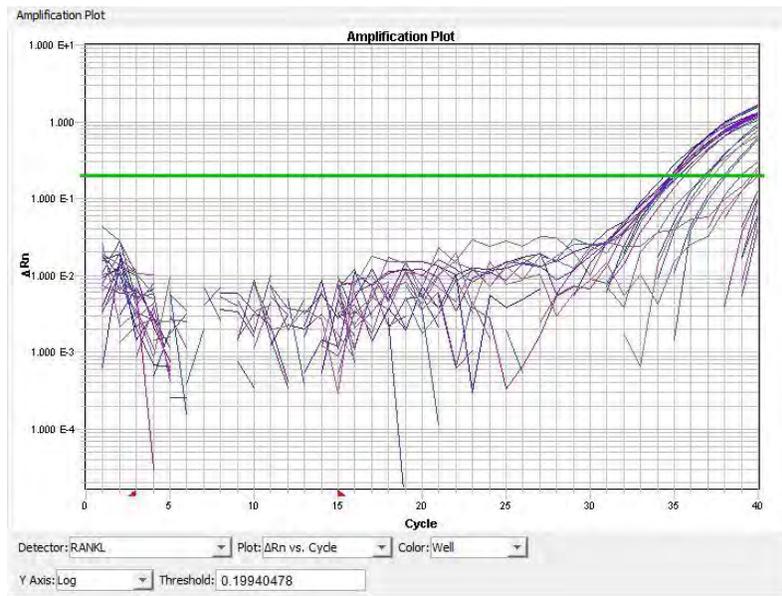


Figura 8. Amplificación del transcrito de *RANKL* en 4 líneas celulares de cáncer de mama. El mRNA de *RANKL* fue detectado a bajo nivel en todas las líneas celulares analizadas.

Efecto de denosumab sobre la proporción de CTTs de la línea celular BT-20

El efecto de denosumab sobre la proporción de células troncales tumorales de mama fue analizado mediante citometría de flujo. Las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales acoplados a los fluoróforos FITC y PE que reconocen un epítipo presente en las proteínas CD44 y CD24.

Para los ensayos de la inhibición farmacológica de RANKL se utilizó la línea celular BT-20, ya que ésta presenta el mayor nivel de expresión de RANK. En la Figura 9 a se observa la población de células BT-20 graficadas de acuerdo a su granularidad (eje x) y el tamaño (eje y). De esta población se seleccionó las células más cercanas al núcleo de la nube, ya que células muy alejadas pudieran ser restos celulares. Posteriormente se realizó una sub-selección de las células individuales y se excluyó los agregados celulares (Figura 9 b).

Con la finalidad de determinar la especificidad de los anticuerpos dirigidos hacia CD44 y CD24 se usó un control de isotipo. Para este se utilizaron dos anticuerpos IgG1, cada uno acoplado a FITC y PE. Las células del control de isotipo fueron tratadas con las mismas concentraciones, procedimiento de marcaje y lavados que las muestras problema. La figura 9 c muestra que las células no fueron marcadas con los anticuerpos IgG1-FITC e IgG1-PE, lo que indica que el marcaje de las células problema se realizó de forma correcta.

Se realizó una curva de tratamientos con denosumab en un rango de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en un lapso de 24 horas. El mayor efecto del fármaco fue determinado a una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Concentraciones por debajo de esta no tuvieron ningún efecto sobre la proporción de CTTs y concentraciones por arriba mostraron el mismo efecto. Por lo tanto, las réplicas biológicas se realizaron con la concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Denosumab generó un decremento de la población troncal ($\text{CD44}^+/\text{CD24}^{-/\text{low}}$) en aproximadamente un 33 % comparado con las células sin tratamiento. Denosumab, también incremento la población $\text{CD44}^+/\text{CD24}^+$ (Figuras 9 d y 9 e). Las poblaciones $\text{CD44}^-/\text{CD24}^-$ y $\text{CD44}^-/\text{CD24}^+$ no se vieron afectadas por el fármaco. Los cambios en la población troncal fueron estadísticamente significativos, como se muestra en la gráfica de barras de la Figura 9 f.

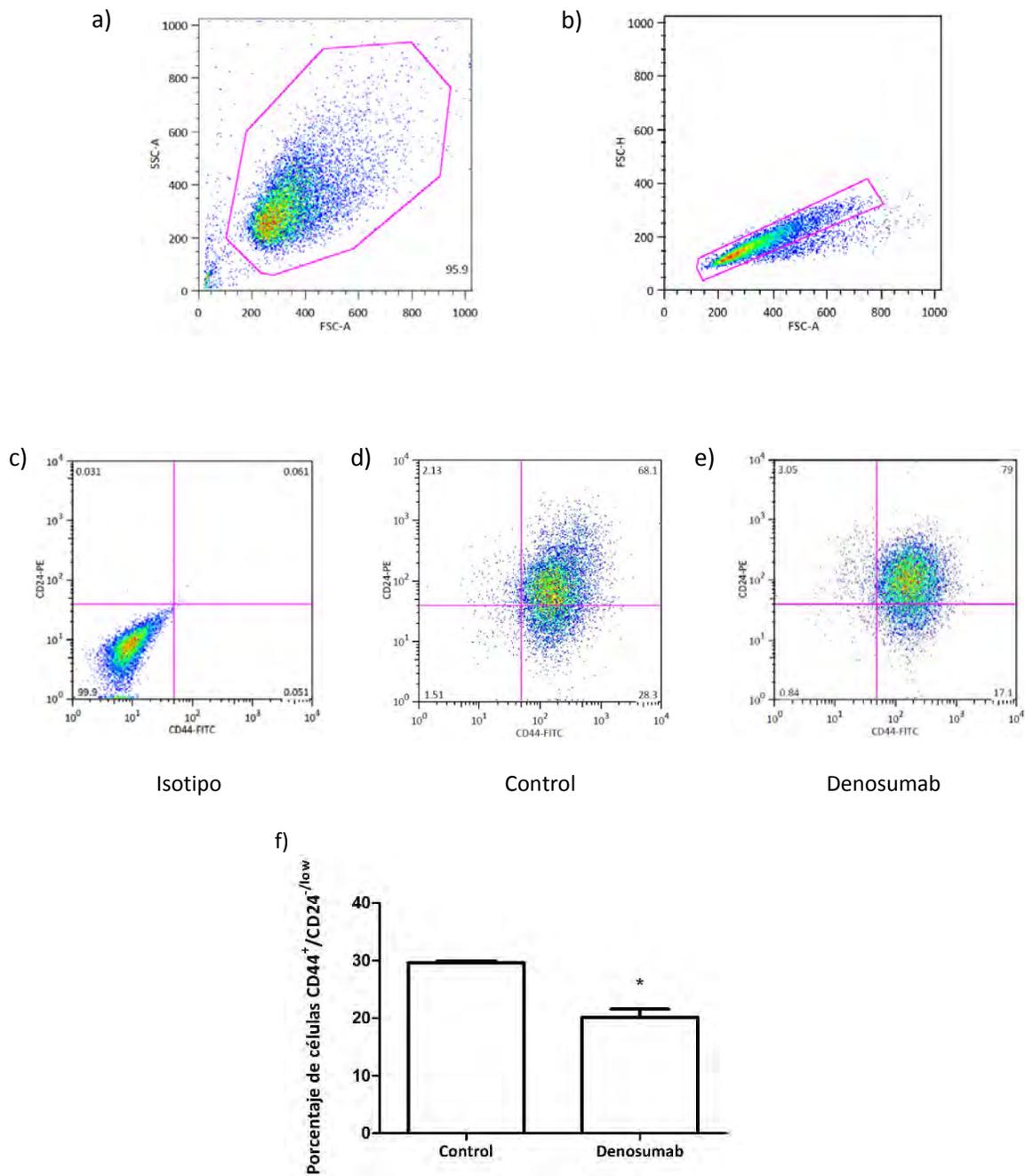


Figura 9. Efecto de denosumab sobre la proporción de CTTs de la línea celular BT20. a) Gráfica que muestra el tamaño y la granularidad de la población de células BT-20. b) Selección de las células BT-20 individuales, sin agregados celulares (marcado con un recuadro rosa). c) Control de isotipo d) Células BT-20 sin tratamiento. d) Células BT-20 tratadas con 1000 µg de denosumab. Las barras representan el promedio de 3 réplicas independientes. Las diferencias significativas son marcadas con un asterisco (P<0.01).

Efecto de denosumab sobre el nivel de proteína de CD44 y CD24

El nivel de proteína de CD44 y CD24 después del tratamiento con denosumab fue analizado por citómetro de flujo. La exposición de las células BT-20 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ de denosumab generó un incremento en las células positivas a CD24 que fue estadísticamente significativo (Figura 10 c). En la figura 8 a se observa el desplazamiento del histograma representativo de la fluorescencia emitida por las células tratadas con el fármaco con respecto a la fluorescencia emitida por las células sin tratamiento.

Por otro lado, el porcentaje de células positivas a CD44 no se vio afectado por el fármaco. Los histogramas representativos de la fluorescencia emitida por las células del tratamiento con denosumab y el control se sobrelapan, lo que indica que no hay cambios significativos (Figura 10 b y d).

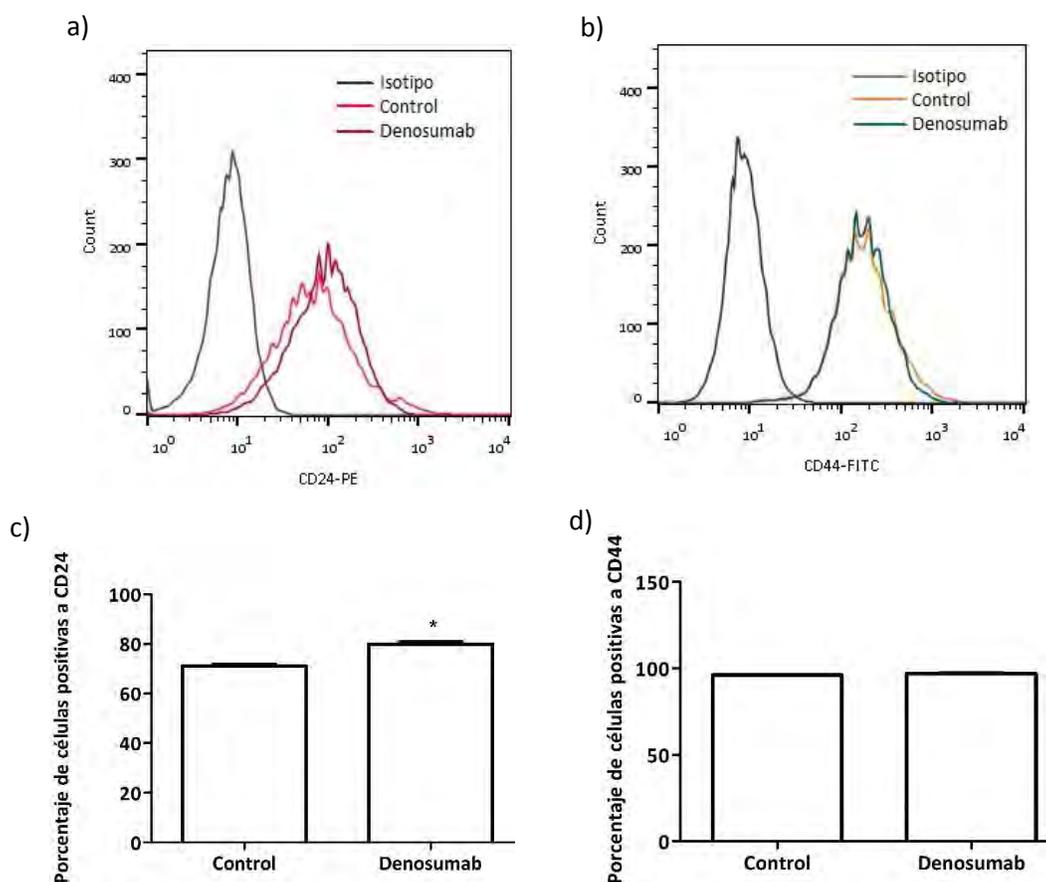


Figura 10. Efecto de denosumab sobre el nivel de proteína de CD44 y CD24 en células BT-20. a) y b) Histogramas representativos del efecto del fármaco sobre los niveles de proteína de CD44 y CD24, respectivamente. c) y d) Gráficas de barras de los niveles de proteína de CD44 y CD24 de 3 réplicas independientes. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) son marcadas con un asterisco.

Nivel de expresión de los factores de transcripción *NANOG* y *SOX2* en células BT-20 tratadas con denosumab

Los genes *SOX2*, *NANOG* y *OCT4* son reguladores clave de la pluripotencia y la autorenovación en células troncales normales y tumorales. Con la finalidad de conocer el efecto de la inhibición farmacológica de RANKL sobre estos marcadores, se llevaron a cabo ensayos de RT-qPCR de 2 de ellos de células BT-20 tratadas con denosumab durante 24 horas. De estos tratamientos se encontró que, denosumab, disminuye el mRNA de *NANOG* y *SOX2*.

La Figura 11 a y 11 b muestra el nivel de expresión de los genes asociados a la pluripotencia respecto a *TBP*. En la primera se observa que la expresión de *SOX2* disminuye a más de la mitad comparado con las células sin tratamiento (control). En la segunda, se observa que la expresión de *NANOG* también disminuyó en una proporción muy parecida a la de *SOX2*; se observa que el nivel de expresión desciende a más del doble respecto a las células sin tratamiento.

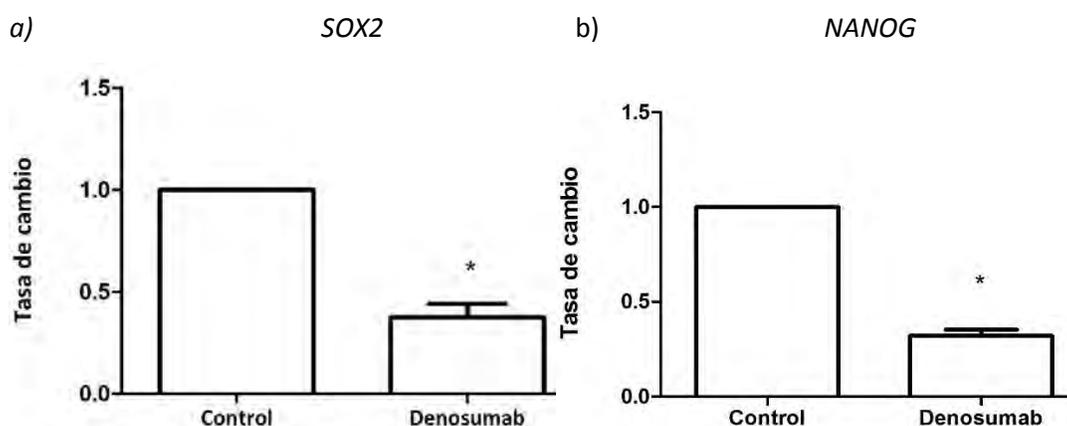


Figura 11. Nivel de expresión de *SOX2* y *NANOG* en células BT-20 tratadas con denosumab durante 24 horas.

a) y b) Gráficas representativas del nivel de mRNA de *SOX2* y *NANOG* mostrado como tasa de cambio. La expresión de ambos genes fue normalizada contra *TBP* y las barras representan el promedio de tres réplicas independientes. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) son marcadas con un asterisco.

Denosumab y su efecto sobre la formación de mamoesferas

Las mamoesferas son estructuras formadas a partir de las continuas divisiones celulares de una célula. Estos ensayos emulan la formación de un tumor *in vitro* y se ha reportado que las CTTs son las responsables de su generación. De los experimentos de formación de estas estructuras se observó que las células BT-20 son capaces de formar mamoesferas maduras en un lapso de 2 semanas (Figura 12 a). La morfología de dichas estructuras al término de este plazo oscilo ligeramente entre redonda y ovalada (Figura 12 a y b).

El número de mamoesferas promedio de 2 réplicas independientes fue de 130 (control) a partir de 5000 células sembradas. Pareciera que el fármaco induce incrementa el número de estas estructuras, ya que en los tratamientos con denosumab se registró 158 mamoesferas, sin embargo, esta observación no resultó estadísticamente significativa (Figura 12 c).

La exposición continua de las células BT-20 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de denosumab, durante 2 semanas, disminuyó el volumen de las mamoesferas aproximadamente 18 veces menos comparado con las células sin tratamiento (Figura 12 a y b). El volumen promedio de las mamoesferas control fue de 0.063 mm^3 y el de las expuestas al fármaco fue de 0.003 mm^3 (Figura 12 d). Se observaron mamoesferas de menor y mayor tamaño con respecto al promedio en ambos casos (Figura 12 d), sin embargo, estas representan la minoría.

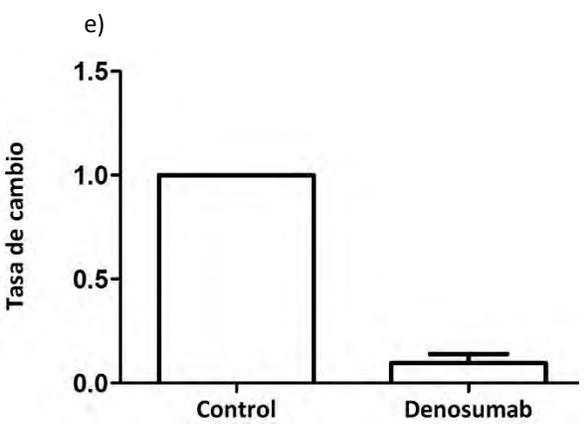
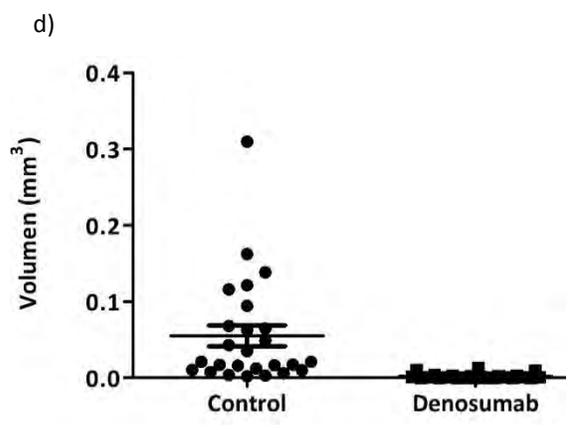
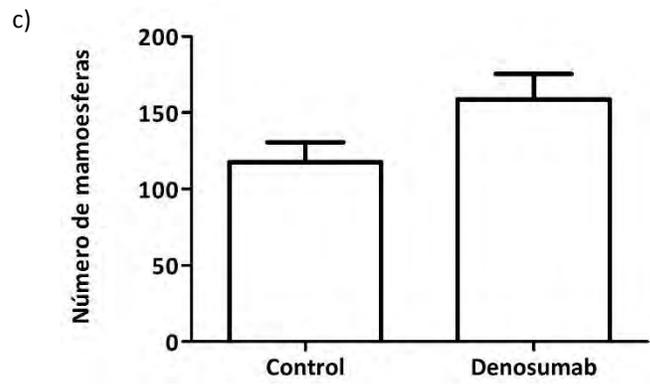
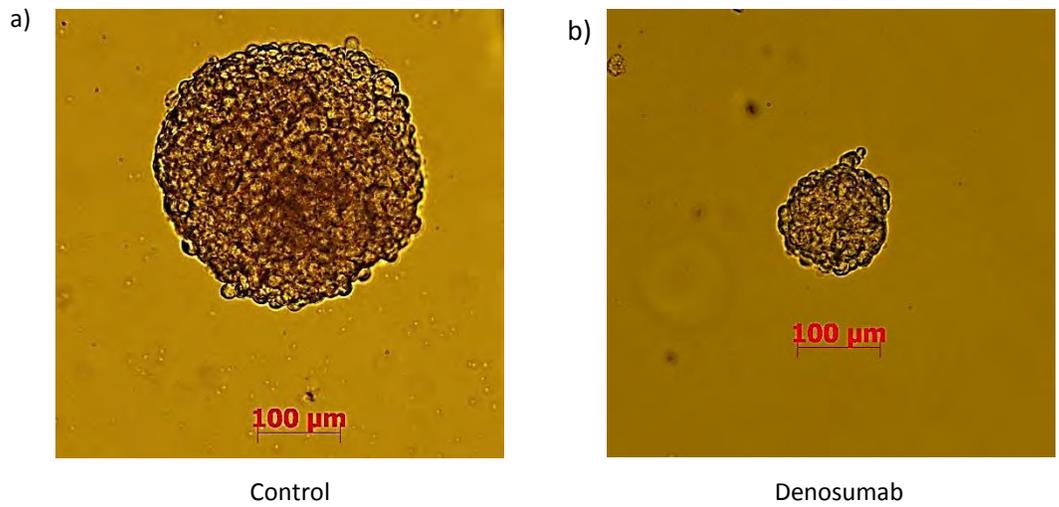


Figura 12. Efecto de denosumab sobre la formación de mamoesferas. a) Imágenes representativas del efecto del fármaco sobre la formación de mamoesferas de la línea celular BT-20. b) Gráfica de barras del efecto del fármaco sobre el número de mamoesferas c) Gráfica que muestra el volumen (mm³) de las mamoesferas. d) Gráfica de barras de la tasa de cambio del volumen de las mamoesferas. Las gráficas muestran el promedio de dos replicas independientes y 3 réplicas técnicas.

VIII. DISCUSIÓN

El sistema de señalización RANK/RANKL/OPG ha emergido en años recientes como un importante regulador de la troncalidad en cáncer de mama (González-Suarez y Sanz-Moreno, 2016). El fenotipo troncal en estos tumores se ha asociado con la reincidencia de la enfermedad después del tratamiento con quimio o radioterapia y a una mayor capacidad de las células tumorales para migrar a otras regiones del cuerpo (Sheridan et al., 2006; Phuc et al., 2011). Los Tumores Triple Negativo se encuentran enriquecidos por CTTs por lo que su eliminación en estos tumores representa un importante blanco de terapia.

El RNA total extraído de los tratamientos realizados en este trabajo resultó íntegro en todas las muestras. Se asume que el RNA se encuentra íntegro si la proporción de la banda correspondiente a la subunidad 28s del ribosoma es dos veces mayor con respecto a la banda de la subunidad 18s (Fleige y Pfaffl, 2006). Por otro lado, las curvas de disociación mostraron que los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de RT-qPCR son específicos de los genes blancos ya que se generó únicamente una curva. Cuando los oligonucleótidos utilizados para los ensayos de RT-qPCR amplifican para más de un blanco se genera más de una curva (Papin et al., 2004), pero no fue el caso.

Los resultados de expresión de RANK y RANKL en las cuatro líneas celulares de cáncer de mama analizadas correlacionan con lo reportado en la literatura. Se ha descrito que la expresión de RANK es alta en líneas celulares negativas a los receptores de hormonas, como MDA-MB-231 o MDA-MB-468 (Ney et al., 2012; Owen et al., 2013). En este estudio se observó algo similar, ya que las líneas celulares MDA-MB-468 y BT-20 mostraron el mayor nivel de expresión de RANK (cabe mencionar que esta última línea celular también es triple negativa). El nivel de expresión de RANKL fue muy bajo en todas las líneas celulares analizadas.

El comportamiento de la expresión de RANK y RANKL en las líneas celulares evaluadas asemeja a lo observado en tejido de pacientes con cáncer de mama, ya que se ha reportado la expresión alta de RANK en tumores primarios y metástasicos (Santini et al., 2011; Santini et al., 2011); esto por supuesto, correlaciona con un mal pronóstico (Zhang et al., 2012). El caso de RANKL es muy diferente, ya que su expresión es baja en los mismos tumores en donde se ha analizado RANK, e incluso otros autores como Ney et al., (2012), Owen et al., (2013), Bhatia y Hansen (2008) han reportado la ausencia de RANKL en tumores y líneas celulares de cáncer de mama. Este comportamiento se explica porque RANKL suele actuar de forma paracrina. Las células tumorales

muestran bajo nivel de expresión de RANKL, pero las células adyacentes que forman parte del microambiente tumoral si expresan RANKL (Kiesel y Kohl, 2016). Las células tumorales estimulan a otros tipos celulares a producir RANKL para que de esta forma se estimule su interacción con RANK en su superficie celular.

Denosumab redujo la población de células troncales tumorales de la línea celular BT-20 generando un incremento de la población CD44⁺/CD24⁺. Este cambio ocurrió mediante la modulación de CD24. Algo parecido se ha observado en líneas celulares de cáncer de próstata transducidas establemente con RANKL, ya que Chu y colaboradores reportaron en 2014 que, denosumab, reduce la población de las CTTs mediante un incremento de la población CD44⁺/CD24⁺ en estas células (Chu et al., 2014). En ese mismo estudio los autores reportan que denosumab disminuye la expresión de otros marcadores de las CTTs de cáncer de próstata como CD133 o CD49f (Chu et al., 2014).

Las vías de señalización canónica y no canónica de NF-κB son las principales efectoras del receptor RANK. Interesantemente, ambas se han asociado con la regulación del fenotipo troncal en cáncer de mama (Liu et al., 2010; Shostak y Chariot, 2011; Zhao et al., 2013). La inactivación del inhibidor de NF-κB, IκBα (de la vía canónica), incrementa la población troncal en células MCF10A de epitelio de mama inmortalizadas (Liu et al; 2010). Por otro lado, la inhibición de NIK (Cinasa Inductora de NF- κB) (de la vía no canónica), en líneas celulares triple negativo de cáncer de mama, como MDA-MB-468, HCC1937 o HCC1954 reduce la población de CTTs (Yamamoto et al., 2013). En ambos casos NF-κB ha demostrado regular la expresión de los genes asociados a la pluripotencia, *SOX2* y *NANOG*. Por otro lado, se ha demostrado que NF-κB regula la expresión de CD24 (Ju et al., 2011), proteína que se vio modificada en los tratamientos con el fármaco. El mecanismo por el cual NF-κB regula la expresión de CD24 permanece desconocido. Estos reportes sugieren que la vía de señalización mediante la cual se está modulando el fenotipo troncal en las células BT-20 tratadas con denosumab podría ser NF-κB. Para poder comprobar esta hipótesis habría que analizar, mediante ensayos de western Blot o ensayos de fraccionamiento celular, la localización y actividad de las subunidades de dichas proteínas.

La población celular CD44⁺/CD24⁺, que se vio incrementada con el tratamiento con denosumab, carece de todas las características atribuidas a la población troncal (Al-Hajj et al., 2003; Yan et al., 2013) y su fenotipo se asocia con el de células de epitelio de mama diferenciado (Sheridan et al., 2006). La población CD44⁻/CD24⁺, que en este estudio no se vio modificada por la exposición al fármaco, también ha sido descrita como no tumorigénica (Fillmore y Kuperwasser, 2007).

Los factores de transcripción *SOX2* y *NANOG* son clave para el mantenimiento de la pluripotencia y la autorenovación en las CTTs. Denosumab disminuye su expresión, tal como ocurre en células de cáncer de próstata tratadas con el análogo natural del fármaco, OPG (Chu et al., 2014).

Las implicaciones biológicas de la disminución de los factores de transcripción asociados a la pluripotencia en tumores de mama han sido ampliamente descritas. La inhibición de la expresión de *SOX2* en células MCF-7 de cáncer de mama resistentes a tamoxifen reduce la población troncal y las re-sensibiliza al tratamiento con el fármaco (Piva et al., 2014). Por otro lado, la inhibición de *NANOG* en líneas celulares triple negativo reduce la capacidad de estas células para generar metástasis mediante la regulación de la expresión de los genes asociados al proceso de transición epitelio mesénquima (Wang et al., 2014). Se ha reportado que la expresión de *SOX2* y *NANOG* es mayor en tejido de pacientes con cáncer de mama triple negativo y su expresión alta se relaciona con un mal pronóstico y una baja tasa de supervivencia libre de enfermedad (Shima et al., 2016).

Las mamoesferas se encuentran enriquecidas por células troncales tumorales de mama. La población de estas células se incrementa considerablemente con respecto a un cultivo en monocapa (Wang et al., 2014). En este estudio se observó que la línea celular BT-20 forma mamoesferas maduras en un lapso de 2 semanas. No todas las líneas celulares de cáncer de mama pueden formar estas estructuras y el tiempo de formación varía entre estas. Por ejemplo, la línea celular MCF-7, forma mamoesferas maduras en aproximadamente una semana (Manuel-Iglesias et al., 2013).

Por otro lado, se observó que denosumab reduce la formación de mamoesferas de las células BT-20. Esto es muy importante, ya que este es el primer reporte de dicho fenómeno. El mecanismo molecular por el cual RANKL regula la formación de mamoesferas aún permanece desconocido, sin embargo, este pudiera estar llevándose a cabo mediante la modulación de *SOX2* o NF- κ B. Se ha reportado que la expresión de este *SOX2* es fundamental para el desarrollo de las mamoesferas de la línea celular MCF-7, ya que la inhibición de su expresión impide la formación de dichas estructuras (Leis et al., 2012). Cabe mencionar que en los cultivos de BT-20 en monocapa, denosumab, redujo la expresión de este gen. Como ya se mencionó, las vías de señalización NF- κ B canónica y no canónica, son las principales efectoras de RANKL/RANK, por lo que el mecanismo por el cual se está llevando a cabo la inhibición de la formación de mamoesferas de la línea celular BT-20 pudiera ser NF- κ B. Se ha reportado que la inhibición NF- κ B reduce la capacidad de formación de mamoesferas de la línea celular MCF-7 (Chongwen et al., 2015).

Los resultados de este trabajo, en conjunto con lo reportado en la literatura muestran el posible mecanismo por el cual se está llevando a cabo la regulación del fenotipo troncal en células BT-20.

Las células $CD44^+CD24^{-/low}$ expresan RANK, el cual responde a la unión de RANKL mediante la activación de las proteínas TRAFs en el citoplasma. Posteriormente, éstas proteínas activan las vías de señalización de NF- κ B canónica o no canónica, que permiten la transcripción de los genes asociados a la pluripotencia y la autorenovación, como *SOX2*, *NANOG* y *CD24*, en el núcleo celular. Por el contrario, el tratamiento de células BT-20 con denosumab obstaculiza la interacción de RANKL con RANK. Esto previene la activación de las TRAFs, las cuales no pueden llevar a cabo la activación de las subunidades de NF- κ B, por lo cual los genes que regulan la troncalidad no son activados. Esto tiene como efecto final la conversión de las células $CD44^+CD24^{-/low}$ a células $CD44^+CD24^+$ no tumorigénicas.

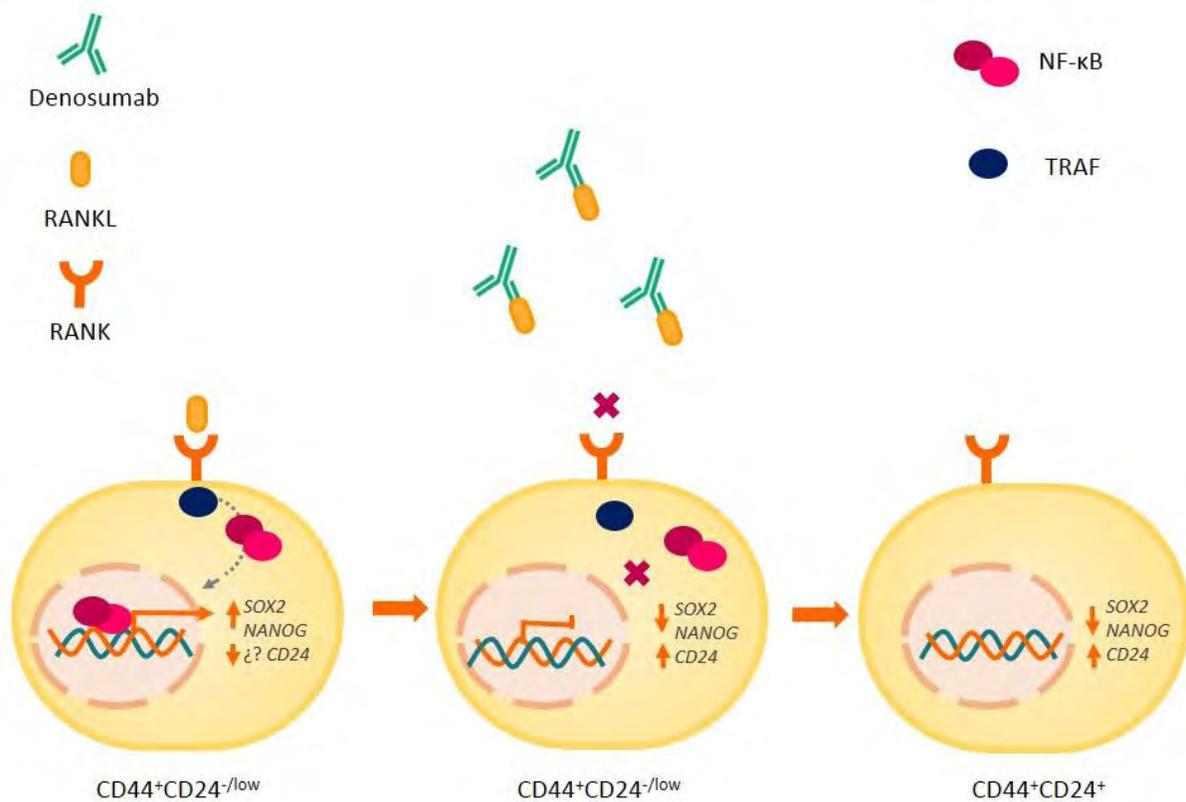


Figura 13. Posible mecanismo de acción de denosumab sobre el fenotipo troncal. Denosumab evita la interacción de RANKL con RANK, lo que impide que las vías de señalización río abajo del receptor no sean activadas. Una de las vías que podría estar modulando el fenotipo troncal en células BT-20 es NF- κ B, por lo que la inhibición de RANKL podría estar inactivándola y, por tanto, induciendo la conversión de las células $CD44^+CD24^{-/low}$ a $CD44^+CD24^+$.

Denosumab fue aprobado en el año 2010 para el tratamiento de la osteoporosis, sin embargo, con el paso de los años su uso se amplió a otro tipo de enfermedades, como el cáncer. RANKL – blanco de denosumab- y su receptor (RANK) han tomado mucha relevancia en cáncer de mama. Recientemente, dos grupos de trabajo demostraron de manera independiente que las células de tejido de mama heterocigotas para BRCA-1 (BRCA-1 mut/+) exhiben expresión alta de RANK. Las mutaciones en BRCA-1 se han asociado con cáncer de mama hereditario (Nolan et al., 2016 y Sigl et al., 2016). El subtipo molecular de cáncer de mama al que se ha asociado las mutaciones en BRCA-1 es el tipo basal, el cual es triple negativo. Interesantemente, la línea celular utilizada en este trabajo también es basal, triple negativa (Chavez et al., 2010), y mostró el mayor nivel de expresión de RANK del panel de líneas celulares analizadas. Varios autores han reportado que la expresión de RANK es mayor en tumores de mama del subtipo basal comparado con otros subtipos como los Luminales A, B o positivos a HER2 (Santini D., et al., 2011; Yoldi et al., 2016). Nolan y colaboradores también reportan que la inhibición de RANKL con OPG genera un aumento en la supervivencia libre de enfermedad de ratones inmunodeficientes transducidos viralmente con BRCA-1 y positivos a RANK.

La inhibición de RANKL con denosumab podría evitar el desarrollo de cáncer de mama en los individuos portadores de las mutaciones en BRCA-1, tal como proponen Nolan y sus colaboradores, pero también podría ser una alternativa de tratamiento para los individuos que ya desarrollaron el cáncer.

Los reportes que apoyan la idea del uso del fármaco como un nuevo tratamiento para el cáncer de mama cada vez son más frecuentes. En el año 2013, denosumab fue aprobado por primera vez para el tratamiento de un tumor sólido, el de células gigantes del tejido óseo. Se espera que en los próximos años, denosumab, sea aprobado para su uso en otro tipo de neoplasias malignas.

IX. CONCLUSIÓN

La inhibición farmacológica de RANKL con denosumab reduce la población de células troncales tumorales de la línea celular BT-20. En este trabajo se encontró que RANK —el receptor de RANKL— se expresa en líneas celulares de cáncer de mama, especialmente en los tipos celulares triple negativo. También se encontró que RANKL se expresa poco en las líneas celulares analizadas lo que correlaciona con lo reportado tejido de pacientes con cáncer de mama en donde la expresión de dicho gen ha sido reportada como baja.

Denosumab disminuye la población $CD44^+CD24^{-/low}$, generando un incremento en la expresión de CD24, que conduce a un aumento de la población $CD44^+CD24^+$. Denosumab también reduce otras características atribuidas a las CTTs, como la expresión de los genes asociados a la pluripotencia (*SOX2* y *NANOG*) y la formación de mamoesferas. La literatura sugiere que la modulación del fenotipo troncal podría estar llevándose a cabo mediante la vía de señalización NF- κ B.

Los resultados de este trabajo sugieren que, denosumab, podría ser utilizado como un nuevo inhibidor de las CTTs de mama en los tumores en donde esta población celular se encuentra enriquecida, como los tumores triple negativo.

X. PERSPECTIVAS

La presente tesis muestra que denosumab tiene un enorme potencial como fármaco inhibidor de la población de células troncales tumorales de mama. A continuación se describen una serie de experimentos que podrían mostrar de manera más amplia el efecto de la inhibición farmacológica de RANKL sobre el fenotipo troncal en células tumorales de mama.

Denosumab va dirigido contra la proteína RANKL, por lo que se requieren realizar ensayos que permitan determinar la presencia de dicha proteína, y de RANK, en un panel más amplio de líneas celulares de cáncer de mama. Esto podría llevarse a cabo mediante ensayos de Western Blot o inmunohistoquímica. Además, se propone agregar controles que permitan confirmar el efecto de la inhibición de RANKL sobre el fenotipo troncal. En este caso se podrían usar RNAs de interferencia o Short Hairpin RNAs, dirigidos contra RANK Y RANKL para disminuir su presencia en alguna línea celular. De estos ensayos, en conjunto con los del fármaco, será necesario analizar la expresión y actividad de otros genes asociados a la pluripotencia y autorenovación, como las isoformas de la enzima aldehído deshidrogenasa *ALDH1A1*, *ALDH1A3*, o el nivel de expresión del factor de transcripción *OCT4*. Una vez realizados los ensayos *in vitro*, el siguiente paso será determinar el efecto de la inhibición farmacológica de RANKL sobre la formación de tumores derivados de las CTTs en ratones inmunodeficientes –la comprobación del modelo *in vivo*–.

La monoterapia en cáncer fue utilizada en décadas pasadas con la idea de que los tumores se formaban de poblaciones celulares homogéneas y que un fármaco podría eliminarlas por completo, sin embargo, esto no ocurrió y la reincidencia después del tratamiento con quimio o radio terapia es muy frecuente. Denosumab podría ser combinado con otros fármacos como el cisplatino o paclitaxel, para generar una mejor respuesta de tratamiento. Para esto se propone realizar combinaciones farmacológicas y determinar su efecto sobre las características que definen el fenotipo troncal: marcadores de superficie, marcadores de expresión, capacidad clonogénica y formación de tumores *in vivo*.

Finalmente, se propone extrapolar los datos generados de esta propuesta a la parte clínica. En este contexto se propone analizar la expresión de RANK y RANKL en tejido de pacientes con cáncer de mama de mujeres mexicanas. Esto con la finalidad de establecer una relación entre la expresión de dichos genes y parámetros de importancia clínica como: el grado del tumor, la edad, la sobrevida libre de enfermedad o sobrevida global, entre otras.

XI. REFERENCIAS

Artículos

- Abdullah L. N., y Chow E. K-H. (2013). Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and Translational Medicine*, 2, 3.
- Ajani J. A., Song S., Hochster H. S., y Steinberg I. B. (2015). Cancer Stem Cells: The Promise and the Potential. *Seminars of Oncology*, 2, 2, S3-S17.
- Al-Hajj M., Wicha M. S., Benito-Hernandez A., Morrison S. J., Clarke M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 7, 3983-3988.
- Atkins G. J., Kostakis P., Pan B., Farrugia A., Gronthos S., Evdokiou A., Harrison K., Findlay D. M., y Zannettino A. C. (2003). RANKL expression is related to the differentiation state of human osteoblasts. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 18(6), 1088-1098.
- Badve S., Dabbs D. J., y Schnitt S. J. (2011). Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologist and oncologist. *Modern Pathology*, 24, 157-167.
- Bhatia P., Sanders M.M., Hansen M.F. Bhatia P., Sanders M.M., Hansen M.F. (2005). Expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B is inversely correlated with metastatic phenotype in breast carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 11:162–165
- Beaver C. M., Ahmed A., y Masters J. R. (2014). Clonogenicity: Holoclones and Meroclones Contain Stem Cells. *PLOS ONE*, 9(2), e89834.
- Blake M. L., Tometsko M., Miller R., Jones J. C., y Dougall W. C. (2013). RANK expression on breast cancer cells promotes skeletal metastasis. *Clinical and Experimental Metastasis*, 31(2), 233-245.
- Bonnet D., y Dick J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine*, 3, 730-737.
- Brenton J. D., Carey L. A., Ahmed A. A., y Caldas C. (2005). Molecular Classification and Molecular Forecasting of Breast Cancer: Ready for Clinical Application? *Journal of Clinical Oncology*, 23, 29.
- Brooks M. D., Burness M. L., y Wicha M. S. (2015). Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell*, 17, 3, 260-271.

- Chávarri-Guerra Y., Villarreal-Garza C., Liedke P. E. R., Knaul F., Mohar A., Finkelstein D. M., y Goss P. E. (2012). Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system. *Lancet Oncol*, 13, e335-43.
- Chavez K. J., Garimella S. V., y Liptowitz S. (2010). Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatmen of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis*, 32(1-2), 35-48.
- Chekun S. V., Zdvorny T. V., Tymovska Yu. O., Anikusko M.F., Novak O. E., Polishchuk L. Z. CD44+/CD24- markes of cancer stem cells in patients with breast cancer of different molecular subtypes. *Experimental Oncology*, 37, 1.
- Chen, Y., Song, J., Jiang, Y., Yu, C., & Ma, Z. (2015). Predictive value of CD44 and CD24 for prognosis and chemotherapy response in invasive breast ductal carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(9), 11287–11295.
- Chon J. D., Singh B., Sahin A., et al. (2016). Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC. *Am J Cancer Res*, 6(9), 1864-1872.
- Chongwen X., Xin S., Qin X., Wang., et al. (2014). Let-7a regulates mammosphere formation capacity through Ras/NF-Kb and Ras/MAPK/ERK pathway in breast cancer stem cells. *Cell cycle*, 14, 11, 1686-1697.
- Chu G. C-Y., Zhau H. E., Wang R., Rogatko A., et al. (2014). RANK-and c-Met-mediated signal network promotes prostate cancer metastatic colonization. *Endocrine-Related Cancer*, 21, 311-326.
- Collins A. T., Berry P. A., Hyde C., Stower M. J., y Maitland N. J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Research*, 65(23), 10946-10951.
- Clarke M.F., Dick J. E., Dirks P. B., et al. (2006). Cancer Stem Cells- Perspectives on Current Status and Future Directions: ACCR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Research*, 66, 19.
- Creighton C. J. (2012). The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics: Targets and Therapy*, 6, 289-297.
- Croce, C. M. (2008). Molecular Origins of Cancer: Oncogenes and Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 358(5).
- Crook T., y Vousden K. H. (1991). Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinc from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell*, 67, 3, p547-556.
- Czerwinska P., y Kaminska B. (2015). Regulation of breast cancer stem cell features. *Contemporary oncology*, 19(1A), A7-A15.

- Dahiya N, et al. (2014). Denosumab: A bone antiresorptive drug. *Medical Journal Armed Forces India*, 3, 1-5.
- Danielsen S. A., Eide P. W., Nesbakken A., Guren T., Leithe E., y Lothe R. A. (2015). Portrait of the PI3K/AKT pathway in colorectal cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1855 (1), 104-21.
- Dick J. E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*, 112, 13.
- Dick J. E. (2009). Looking ahead in cancer stem cell research. *Nature Biotechnology*, 27, 44-46.
- Eroles P., Bosch A., Pérez-Fidalgo J. A., y Lluch. (2012). Molecular Biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, 38, 698-707.
- Expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB is inversely correlated with metastatic phenotype in breast carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2005; 11:162–165.
- Fang X., Zheng P., Tang J., yLiu Y. (2010). CD24: from A to Z. *Cellular & Molecular Immunology*, 7, 100-103.
- Fillmore C., y Kupperwasser. (2007). Human breast cancer stem cell markers CD44 and CD24: enriching for cells with functional properties in mice or in man. *Breast Cancer Research*, 9, 303.
- Fleige S., Pfaffl M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine* 27, 126-139.
- Frank, S. A. (2004). Genetic predisposition to cancer – insights from population genetics. *Nature reviews. Genetics*, 5(10), 764-772.
- Genestier C. Hur M H., Charafe-Jauffret E., Monville F., et al. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 1(5), 555-567.
- Gnant M., Pfeiler, Dubsy P. C. et al. (2015). Adjuvant denosumab in breast cancer (ABCSCG-18): a multicenter, randomized, double blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 386, 433-443.
- Gonzalez-Niño L. A., Ávila-Garavito A., Echeverri-Jaramillo C., Jaramillo-Velásquez S., Salazar-Corcho R. D., y Aristizábal-Bernal B. H. (2007). Cáncer de mama: HER2/neu, métodos diagnósticos y consideraciones clínicas. *RevColombCancerol*, 11(1), 40-57.
- Gonzalez-Suarez E., y Sanz-Moreno. RANK as a therapeutic target in cancer. *The FEBS journal*.
- Gonzalez-Suarez E., Jacob A. P., Jones J., et al. (2010). RANK ligand mediates progesterin-induced mammary epithelial proliferaci3n and carcinog3nesis. *Nature*, 4, 468.
- Gutierrez C., y Schiff R. (2011). HER 2: Biology, Detection, and Clinical Implications. *Arch Pathol Lab Med.*, 135(1), 55-62.

- Grimm M., Renz C., Munz A., Hoefert S., Krimmel M., y Reinert S. (2013). Co-expression of CD44+/RANKL+/ tumor cells in the carcinogenesis of oral squamous cell carcinoma. *Odontology*, 103, 36-49.
- Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of cancer. *Cell*, 100 (1), 57-70.
- Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Holliday D. L., y Speirs V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, 13,215.
- Holen I., y Shipman C. M. Role of Osteoprotegerin (OPG) in cancer. *Clinical Science*. 110 (3), 279-291.
- Jaggupilli A., y Elkord E. (2012). Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012.
- Ju J., Jang K., et al. (2011). CD24 enhances DNA damage-induced apoptosis by modeling NF- κ B signaling in CD44-expressing breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 0, 0, 1-10.
- Ju S-Y., Chiou S-H., y Su Y. (2013). Maintenance of the stemness in CD44⁺ HCT-15 and HCT-116 human colon cancer cells requires miR-203 suppression. *Stem Cell Research*, 12, 86-100.
- Kandoth C., McLellan M. D., Vandin F., Ye K., Niu B., Lu C., et al. (2013). Mutational landscape and significance across 12 majorcancertypes. *Nature*, 502, 333.
- Karamboulas C. y Ailles L. (2013). Developmental signaling pathways in cancer stem cells of solid tumors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1830, 2, 2481-2495.
- Kiesel L., y Kohl. (2016). Role of the RANK/RANKL pathway in breast cancer. *Maturitas*, 86, 10-16.
- Kristiansen G., Winzer K-J., Mayordomo E., et al. (2003). CD24 Expression Is a New Prognostic Marker in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 9, 4906-4913.
- Lacey L. D., Boyle W. J. Simonet S. W., Kostenuik P. J., Dougall W. C., Sullivan W. C., San Martin J., y Dansey R. (2012). Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab. *Nature reviews. Drug Discovery*, 11(5), 401-4019.
- Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., et al. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367 (6464), 645-8.
- Lawrence A. (2001). A Mutator Phenotype in Cancer. *Perspectives in cancer research*, 61, 3230-239.
- Lee H. J., Gallego-Ortega D., Ledger A., et al. (2013). Progesterone drives mammary secretory differentiation via RankL-mediated induction of Elf5 in luminal progenitor cells. *Development and Stem Cells*, 140, 1397-1401.

- Lim S. C. (2005). CD24 and human carcinoma: tumor biological aspects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 59, s351-s354.
- Lipton A., y Jacobs I. (2011). Denosumab: benefits of RANK ligand inhibition in cancer patients. *Bone and haematological problems*, 5, 258-264.
- Liu M., Thiyuki S., et al. (2010). The canonical NF-Kb pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer Research*, 70(24), 10464-10473.
- Marcato P., Dean C. A., Pan D., Araslanova R., et al. (2011). Aldehyde Dehydrogenase Activity of Breast Cancer Stem Cells is Primarily Due to Isoform ALDH1A3 and Its Expression is Predictive of Metastasis. *Stem Cells*, 29, 32-45.
- Medema J. J. (2013). Cancer stem cells: The challenges ahead. *Nature Cell Biology*, 15, 338-344.
- Min J-K., Cho Y-L., et al. (2006). Receptor activator of nuclear factor (NF)-Kb ligand (RANKL) increases vascular permeability: impaired permeability and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 109, 4.
- Misso G., Porru M., Stoppacciaro A., Castellano M., DeCicco F., Leonetti C., Santini D., Caraglia M. (2012). Evaluation of the in vitro an in vivo antiangiogenic effects of denosumab and zoledronic acid. *Cancer biology & therapy*, 13(14), 1491-1500.
- Ney, J. T., Fehm, T., Juhasz-Boess, I., & Solomayer, E. F. (2012). RANK, RANKL and OPG Expression in Breast Cancer – Influence on Osseous Metastasis. *GeburtshilfeUndFrauenheilkunde*, 72(5), 385–391.
- Nolan E., Vaillant F., et al. (2016). RANK ligand as a potential target for breast cancer prevention in BRCA1-mutation carriers. *Nature Medicine*, 22, 933-939.
- Owen S., Ye L., Sanders A. J., Mason M. D., y Jiang W. G. (2013). Expression profile of receptor activator of nuclear-Kb (RANK), RANK ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in breast cancer. *Anticancer Research*, 33(1), 199-206.
- Pan G., y Thomson J. A. (2007). Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Research*, 17, 42-49.
- Papin J. F., Vahrson W., Ditmer D. P. (2004). SYBR Green-Based Real-Time Quantitative PCR Assay for Detection of West Nile Virus Circumvents False-Negative Results Due to Strain Variability. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), 1511-1518.
- Pastrana E., Silva-Vargas V., y Doetsch F. (2011). Eyes Wide Open: A Critical Review of Sphere-Formation as an Assay for Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 8(5), 486-498.

- Pellegrini P., Cordero A., Gallego M I., Dougall C. W., Muñoz P., Pujana M A., yGonzález-Suarez E. (2013). Constitutive Activation of RANK Disrupts Mammary Cell Fate Leading to Tumorigenesis. *Stem Cells: Tissue-Specific Stem Cells*, 31, 1954-1965.
- Perou C. M., Sørli T., Eisen M. B., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406, 747-752.
- Pfzner B. M., Branstetter D., Loibl S, Denkert C., Lederer B., Schmitt W. D., Dombrowski F, Werner M, Rudiger T, Dougall W. C., et al. (2014). RANK expression as a prognostic and predictive marker in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 145,307–315.
- Phuc P. V., Nhan P. L. C., Nhung T. H., Tam N. T., Hoang N. M., et al. (2011). Downregulation of CD44 reduces doxorubicin resistance of CD44+CD24- breast cancer cells. *OncoTargets and Therapy*, 4, 71-78.
- Piva M., Domenici G., Iriando O., et al. (2014). Sox2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cell. *EMBO Molecular Medicine*, 6, 1.
- Prat A., Parker J. S., Karginova O, Fan C., Livasky C., Herschkowitz J. I., He X., y Perou C. M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 12, R68.
- Renema N., Navet B., Heymann M-F., Lezot F., y Hermann D. (2016). RANK-RANKL signaling in cancer. *Biosci. Rep.*, 36, e00366.
- Ricardo S., Vieira A. F., Gerhard R., et al. (2011). Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *Journal of Clinical Pathology*, 64, 937-946.
- Rizzino A. (2013). The Sox2-Oct4 Connection: Critical players in a much larger interdependent network integrated at multiple levels. *Stem Cells*, 31(6), 1033-1039.
- Rodríguez-Berriguete G., Fraile B., Martínez-Onsurbe P., Olmedilla G., Paniagua R., y Royuela M. (2012). MAP Kinases and Prostate Cancer. *Journal of Signal Transduction*.
- Sacks J. D., y Barbolina M. V. (2015). Expression and Function of CD44 in Epithelial Ovarian Carcinoma. *Biomolecules*, 5, 3051-3066.
- Santini D., Schiavon G., Vincenzi B., Gaeta L., Pantano F., Russo A., Ortega C., Porta C., Galluzzo S., Armento G., et al. (2011). Receptor activator of NF- κ B (RANK) expression in primary tumors associates with bone metastasis occurrence in breast cancer patients. *PLoS One* 6, e19234.

- Santini D., Schiavon G., Vincenzi B., Gaeta L., Pantano F., Russo A., Ortega C., Porta C., Galluzzo S., Armento G., (2011) Receptor activator of NF- κ B (RANK) expression in primary tumors associates with bone metastasis occurrence in breast cancer patients. *PLoS One*, 6:e19234.
- Saunders A., Faiola F., y Wang J. (2013). Pursuing Self-Renewal and Pluripotency with the Stem Cell Factor Nanog. *Stem Cells*, 31(7), 1227-1236.
- Schramek D., Leibbrandt A., Sigl V., et al. (2010). Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progesterin-driven mammary cancer. *Nature*, 468, 98-102.
- Sebatier R., Finetti P., Guille A., Adelaide J., et al. (2014). Claudin-low breast cancers: clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. *Molecular Cancer*, 13, 228.
- Seymour T., Twigger A-J., y Kakulas F. (2015). Pluripotency Genes and Their Functions in the Normal and Aberrant Breast and Brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 27288-27301.
- Shackleton M., Quintana E., Fearon E. R., y Morrison S. J. (2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*, 138(5), 822-9.
- Schmitt M., Metzger M., Gradl D., Davidson G., y Ovarian-Rousseau V. (2014). CD44 functions in Wnt signaling by regulatin LRP6 localization and activation. *Cell Dearth & Differentiation*, 22, 677-689.
- Schnitt S. J. (2010). Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Modern Pathology*, 23, S60-S64.
- Sheridan C., Kishimoto H., Fuchs R. K., Mehrotra., et al. (2006). CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Reseach*, 8, R59.
- Shiozawa Y., Nie B., Pienta K. J., Morgan T. M., y Taichman R. S. (2013). Cancer stem cells and their role in metastasis. *Pharmacology & therapeutics*, 138(2), 285-293
- Shipitsin M., Campbell L. L., Argani P., et al. (2007). Molecular Definition of Breast Tumor Heterogeneity. *Cancer Cell*, 11, 259-273.
- Sigl V., Owusu-Boaitey K., Joshi et al. (2016). RANKL/RANK control *BRCA1* mutation-driven mammary tumors. *Cell Research*, 26, 761-774.
- Singh S. K., Hawkins C., Clarke I. D., Squire J. A., Bayani J., et al. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432, 396-401.
- Shostak K., y Chariot A. (2011). NF- κ B, stem cells and breast cancer: the links get stronger. *Breast Cancer Research*, 13, 214.

- Sørli T., Perou C. M., Tibshirani R., et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS*, 98, 19, 10869-10874.
- Tan W., Zhang W., Strasner A., Grivennikov S., Cheng J. Q., Hoffman R.M. y Karin M. (2011). Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature*. 470, 548–553.
- Terpos E., Szydlo R., Apperley J. F., et al. (2003). Soluble receptor activator factor κ B ligand-osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood*, 3, 102.
- Toru H., Susumu I. y Hiroaki N. (2013). Cancer Stem-like Cell Marker CD44 Promotes Bone Metastases by Enhancing Tumorigenicity, Cell Motility, and Hyaluronan Production. *Cancer Research*, (73) (13) 4112-4122.
- Tran B., y Bedard P. L. (2011). Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. *Breast Cancer Research*, 13, 221.
- Wang J., Zeng H., Li H., Zhang J., Wang S. (2015). Roles of sex-determining region Y-box 2 in cell pluripotency and tumor-related signaling pathways. *Molecular and Clinical Oncology*, 3, 1203-1207.
- Wang Y. J., Bailey J. M., Rovira M., Leach S. D. (2013). Sphere-forming assays assessment on benign and malignant pancreatic stem cells. *Methods in molecular biology*, 980, 281-90.
- Welsh P. L., y King M-C. (2001). BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Human Molecular Genetics*, 10 (7), 705-713.
- Wogan G.N., Hecht S. S., Felton J.S., Conney A. H., y Loeb L. A. (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 14, 473-486.
- Wu Y., Sarkissyan M., y Vadgama V. (2016). Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 5, 13.
- Xie P. (2013). TRAF molecules in cell signaling and in human diseases. *Journal of Molecular Signaling*, 8, 7.
- Xu X., Tian Y., Yuan X., Liu Y., Hua W., Liu Q., Sheng-Wu G., y Wu K. (2016). Enrichment of CD44 in basal-type breast cancer correlates with EMT, cancer stem cell gene profile, and prognosis. *OncoTargets and Therapy*, 9, 431-444.
- Yan W., Chen Y., Yao Y. Zhang H., Wang. (2013). Increased invasion and tumorigenicity capacity of CD44+/CD24- breast cancer MCF7 cells in vitro in nude mice. *Cancer Cell International*, 13, 62.

- Yan Y., Zuo X., yWei D. (2015). Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Translational Medicine*, 4, 1033-1043.
- Yang F., Xu J., y Guan X. (2016). Breast cancer stem cell: the roles and therapeutic implications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1-16.
- Yoldi G., Pellegrini., Trinidad E. M., Cordero A., Gomez-Miragaya J. (2016). RANK Signaling Bblockade Reduces Breast Cancer Recurrence by Inducing Tumor Cell Differentiation. *Cancer Research*, 76(19), 5857-69.
- Zhang J., Dai J., Qi Y., Lin D-L., et al. (2001). Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. *The Journal of Clinical Investigation*, 107, 10.
- Zhang L., Teng Y., Zhang., Liu J., et al. (2012). Proteasome inhibitor bortezomib (PS-341) enhances RANKL-induced MDA-MB-231 breast cancer cell migration. *Molecular Medicine Reports*, 5: 580-584.

Libros

- Pelayo R., Santa-Olalla J., y Velasco I. Células troncales y medicina regenerativa. Programa Universitario de Investigación en Salud.
- Weinberg, R. A. (2014). The biology of cancer. Segunda edición.

Páginas WEB:

- Breast Cancer Society of Canada. (2016). Types of breast cancer. [online] Disponible en: <http://www.bccsc.ca/p/41/l/506/t/Breast-Cancer-Society-of-Canada---Types-of-Breast-Cancer> [Consultado: 01 Ago. 2016].
- Cancer.org. (2016). American Cancer Society | Information and Resources for Cancer: Breast, Colon, Lung, Prostate, Skin. [online] Disponible en: <http://www.cancer.org/> [Accessed 01 Nov. 2016].
- Globocan.iarc.fr. (2016). Fact Sheets by Population. [online] Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx [Consultado 10 Nov. 2016].

World Health Organization. (2016). Cancer. [online] Disponible en:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> [Consultado 01 Nov. 2016].