



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Análisis de la expresión de RANK y RANKL en líneas
celulares de cáncer de mama y efecto de la inhibición de
RANKL en la regulación de células troncales tumorales
de la línea celular MDA-MB-468**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

P R E S E N T A :

Jorge Yassén Díaz Blancas



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Karla Itzel Vázquez Santillán
Ciudad de México, 2018**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos de Sinodales

1. Datos del alumno.

Díaz

Blancas

Jorge Yassén

62853989

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

302047831

2. Datos del tutor.

Dra.

Karla Itzel

Vázquez

Santillán

3. Datos del Sinodal 1

Dr.

Julio Isael

Pérez

Carreón

4. Datos del Sinodal 2

M. en C.

Bertha

Molina

Alvarez

5. Datos del Sinodal 3

Q.

Viviana

Escobar

Sánchez

6. Datos del Sinodal 4

Dra.

Claudia Andrea

Segal

Kischinevzky

7. Datos de la tesis

Análisis de la expresión de RANK y RANKL en líneas celulares de cáncer de mama y efecto de la inhibición de RANKL en la regulación de células troncales tumorales de la línea celular MDA-MB-468

62 p.

2018

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a María del Refugio por estar a mi lado, reconfortarme y hacer más llevadero cada paso del proceso que fue escribir esta tesis.

Agradezco a mi tutora Karla Itzel Vázquez Santillán por toda la confianza que depositaste en mí, por cada una de las oportunidades, por la paciencia y por todo el tiempo que has invertido en mí (sobre todo aun cuando procrastinaba tanto, lo siento). Gracias por la enseñanza profesional, personal y sobre todo gracias por la amistad y hacer del laboratorio un lugar tan agradable.

A la doctora Vilma Maldonado Lagunas por brindarme un lugar en su laboratorio, una beca de “Ayudante de investigador SNI III” y por el gran voto de confianza para futuros proyectos. Gracias.

Gracias a Oscar Omar Moreno Proo por todo el apoyo y amistad que me brindaste durante toda la carrera, sin ti esto se hubiera puesto muy feo, eres el mejor paps! CTP!!

A mi comité de mágoa: Marianna Ferreira y Rodrigo M. de León. Nada une más a las personas que la angustia y valer tanta ...

A mis compañeros de laboratorio: Alejandro, Rosario, Víctor Hugo y Marcela, por todos los “viernes de ___” y todos los días de pozole, gracias por todo el apoyo. En especial a ti Alex, gracias por ser el amigo/comadre que no sabía necesitaba tanto.

Por último y más importante a Eloiza (si, con z) sin ti, literalmente nada de esto sería posible. Eres la fuerza motora detrás de cada una de mis locuras. Gracias por el amor, el apoyo y la paciencia <3

Contenidos

| | |
|---------------------------------------|----|
| Contenidos..... | 4 |
| Resumen..... | 5 |
| Introducción..... | 7 |
| Definición de cáncer | 7 |
| Epidemiología..... | 16 |
| Clasificación histológica: | 17 |
| Origen del cáncer | 22 |
| Células troncales | 23 |
| Células troncales de mama..... | 25 |
| La vía NF- κ B y las CTCM..... | 26 |
| NF- κ B vía canónica | 27 |
| NF- κ B vía no canónica..... | 27 |
| RANK/RANKL..... | 28 |
| Denosumab..... | 29 |
| Justificación..... | 30 |
| Hipótesis..... | 30 |
| Objetivo General..... | 31 |
| Objetivos particulares..... | 31 |
| Material y Métodos..... | 32 |
| Resultados..... | 38 |
| Discusión | 49 |
| Conclusión | 53 |
| Perspectivas | 54 |
| BIBLIOGRAFIA | 57 |

Resumen

El cáncer es un término utilizado para referirse a un conjunto de enfermedades que comparten características fundamentales y cuya etiología es multifactorial incluyendo interacciones entre factores genéticos, estilos de vida y exposición ambiental. El principal modelo para explicar el origen y desarrollo del cáncer se basa en la existencia de las Células Troncales Tumorales (CTT). Esta subpoblación celular retiene características similares a las células troncales normales de cada tejido y es capaz de reproducir todas las subpoblaciones componentes del tumor original de una forma jerárquica. Esta población celular es regulada por la vía NF- κ B que ha sido ampliamente caracterizada como uno de los principales sustentos para las células troncales de diversos tejidos y ha sido vinculada particularmente al desarrollo de las células troncales de cáncer. El receptor activador del factor nuclear κ B, conocido por RANK y su ligando RANKL son factores clave en la activación de la vía no canónica de NF- κ B. La inhibición de RANK/RANKL por lo tanto presenta un blanco para una terapia dirigida a eliminar a la población de CTT y mejorar el pronóstico y sobrevida en el cáncer de mama. El anticuerpo monoclonal Denosumab diseñado como tratamiento contra la osteoporosis secuestra a RANKL evitando su interacción con RANK y evitando la maduración de los osteoclastos. En el cáncer de mama, el mismo mecanismo de acción de Denosumab presenta una potencial terapia dirigida contra la población de CTT. **Objetivo:** Determinar el nivel de expresión de RANK y RANKL en un panel de líneas celulares y evaluar el efecto de la inhibición farmacológica de RANKL en la regulación de la población troncal. **Metodología:** La determinación

de marcadores de troncalidad y pluripotencia por medio de RT-qPCR. Citometría de flujo por medio del kit de ALDEFLOUR para detección del fenotipo troncal. Ensayos de migración celular por medio de cámaras *Transwell*. Ensayos de viabilidad celular por medio de la técnica de MTS. Ensayos en modelo biológico (*Danio rerio*) de dilución limitante para la evaluación de la capacidad tumorigénica y frecuencia de células troncales. **Resultados:** Existe una asociación entre los subtipos basal y *HER2+* con respecto a la expresión de RANK. La inhibición farmacológica de RANKL disminuye los marcadores de troncalidad NANOG y OCT4, esto en relación con una disminución de la población troncal observada mediante la citometría de flujo. El tratamiento con Denosumab no compromete la viabilidad celular pero reduce la capacidad de migración, proliferación y tumorigenicidad de las células de cáncer de mama de la línea MDA-MB-468 tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. **Conclusión:** La regulación de la vía de NF- κ B por medio de RANK/RANKL es un blanco terapéutico importante que abre las puertas a una nueva terapia dirigida contra las complicaciones más comunes y peligrosas del cáncer de mama como lo son las metástasis y recurrencias.

Introducción

Definición de cáncer

El cáncer es un término utilizado para referirse a un conjunto de enfermedades que comparten características fundamentales y cuya etiología es multifactorial incluyendo interacciones entre factores genéticos, estilos de vida y exposición ambiental ¹. En el año 2000, Douglas Hanahan y Robert A. Weinberg definieron los “*Hallmarks*” o características fundamentales del cáncer, determinando que hay seis alteraciones cardinales en la fisiología celular compartidas en todos los tipos de cáncer conocidos (ilustración 1).

❖ **Autosuficiencia en señales de crecimiento:**

Las células normales permanecen en un estado quiescente hasta que es detectado un factor de crecimiento exógeno, en ese momento la célula pasa a un estado proliferativo activo hasta que la señal de crecimiento es retirada. Este proceso permite que la homeostasis se mantenga en el tejido, evitando crecimiento celular cuando este no es requerido. Una célula cancerígena es capaz de mantener el estado proliferativo gracias a su autosuficiencia, es decir, es capaz de producir el factor de crecimiento al cual ella misma es sensible (estimulación autócrina) o expresar suficientes receptores de membrana, que a concentraciones basales mínimas podrían inducir el estímulo ²⁻⁴.

❖ **Insensibilidad a factores antiproliferativos:**

El ciclo celular regula las fases de quiescencia y proliferación de una forma en la cual los recursos son utilizados eficientemente. Una célula somática sana tiene un número finito de divisiones mitóticas (límite de Hayflick) antes de entrar en el estado post-mitótico irreversible mejor conocido como senescencia ⁵. Diversos factores de inhibición solubles o inmersos en la matriz extracelular aseguran- que las células adyacentes regresen a su estado quiescente (G0 en el ciclo celular) o bien que continúen su camino al estado post-mitótico de tejido maduro.

Cuando una célula se vuelve insensible a estos factores de inhibición su destino es alterado y permanece en un estado proliferativo con una alta tasa de división mitótica, alterando la homeostasis y función del tejido.

❖ **Evasión de la apoptosis:**

La muerte celular programada (apoptosis) es un proceso bien caracterizado, fundamental para la homeostasis del organismo. Cuando una célula presenta daño en su material genético o llega a la senescencia, es necesario retirarla y dar lugar a la renovación del tejido. Este proceso consiste en una serie de pasos precisos que culminan en la destrucción celular sin que los productos de desecho o detritos dañen a las células contiguas. El proceso se puede separar en dos grandes circuitos, el primero encargado de procesar las señales inductoras de apoptosis extracelular (involucrando moléculas como Fas y su ligando) es conocido como el “programa extrínseco”. El segundo circuito, llamado “programa

intrínseco” se encarga de la señalización apoptótica por mecanismos sensores intracelulares (proteínas que detectan el daño en el material genético, la más conocida es p53). Ambos circuitos culminan en la activación de proteínas normalmente latentes (caspasas 8 y 9) las cuales comienzan una cascada proteolítica que culmina en la muerte celular. Las células de cáncer son capaces de burlar este proceso por daño en los genes sensores (principalmente del programa intrínseco de apoptosis) evitando el inicio del proceso apoptótico ^{4,6,7}.

❖ **Potencial replicativo ilimitado:**

Una vez que la célula ha sufrido de 60-70 divisiones (en promedio) esta ha reducido la longitud de sus telómeros debido a la incapacidad de la DNA polimerasa de replicar el extremo 3' en cada replicación. Una vez que los telómeros han sido agotados los extremos de los cromosomas se vuelven inestables y comienzan los desórdenes cariotípicos como las aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales que, invariablemente llevan a la destrucción celular, sin embargo, las células cancerígenas superan el límite de Hayflick incluso llegando a “inmortalizarse” como línea celular. Este fenómeno parece responder a la expresión atípica de la telomerasa, la cual mantiene los telómeros en crecimiento evitando la etapa de crisis cariotípica ^{4,8}.

❖ **Inducción de la angiogénesis:**

Cada célula en un tejido requiere un suministro constante de nutrientes y oxígeno, por lo tanto es necesario que las recién desarrolladas células cancerígenas

obtengan la capacidad de garantizar el acceso a estos, en especial cuando se presenta la fase rápida de crecimiento clonal que lleva al desarrollo de los tumores. Durante la organogénesis existe un crecimiento cuidadosamente coordinado de capilares sanguíneos que permita el correcto desarrollo de todos los tejidos que conformarán al individuo. Una vez pasada esta etapa, el desarrollo de estos capilares es mediado por un equilibrio de señales de crecimiento positivas y negativas según se requiera durante la vida del organismo. En la carcinogénesis, este balance se pierde favoreciendo las moléculas inductoras de angiogénesis, generalmente, aumentando la expresión génica de estos factores como el factor de crecimiento endotelial vascular-A (*VEGF-A*)^{4,9}.

❖ **Invasión de tejido y metástasis:**

La principal complicación y causa de muerte de los pacientes durante el desarrollo del cáncer son las metástasis, que se entienden como la diseminación del cáncer a nuevos órganos y tejidos diferentes al del tumor primario, por medio de células cancerígenas que son capaces de abandonar el tumor primario y formar nuevas colonias en donde la competencia por los nutrientes es menor. El proceso por el cual esto sucede es complejo ya que las células cancerígenas deben mediar la interacción con el nuevo tejido a fin de “adherirse” a él y manipular el microambiente para hacerlo propicio a las necesidades de esta nueva placa cancerígena.

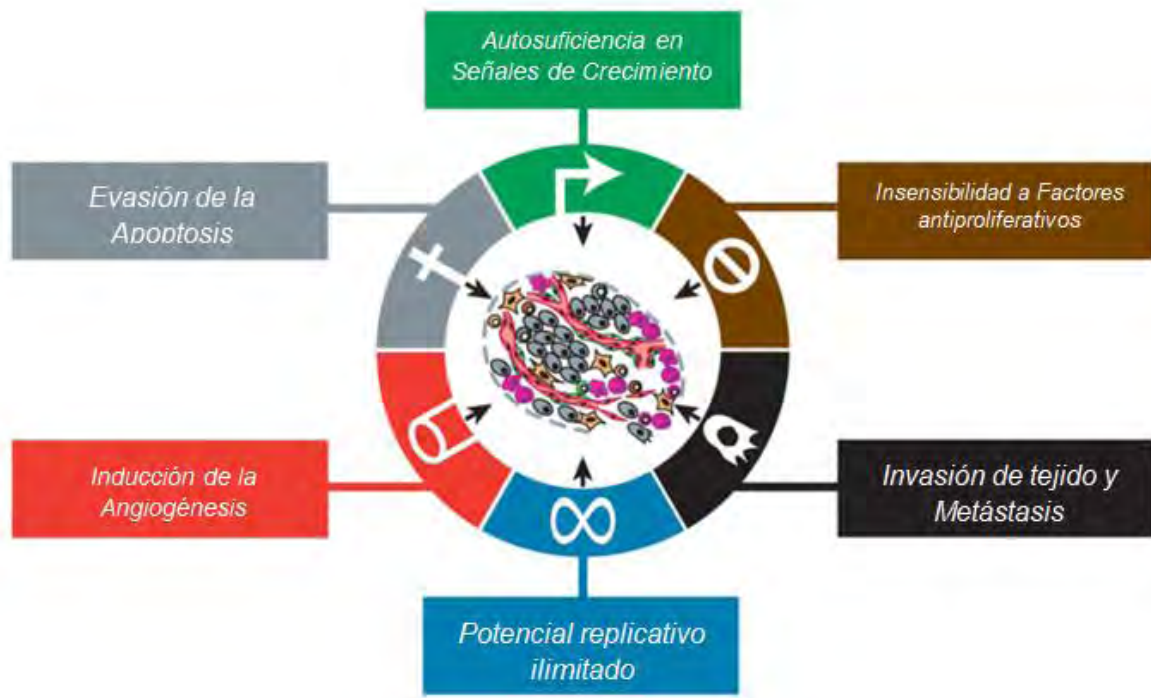


Ilustración 1 Hallmarks del cáncer. Las seis características cardinales del cáncer originalmente postuladas por Douglas Hanahan y Robert A. Weinberg en el año 2000, las cuales proveen las propiedades malignas características de la enfermedad. Imagen modificada de ⁴.

Si bien los *hallmarks* se pueden definir como capacidades funcionales adquiridas compartidas por todos los tipos de cáncer, la etiología de cada uno de estos es multifactorial y generalmente por diferentes mecanismos en tiempos irregulares dentro del mismo proceso tumorigénico. La ausencia de un proceso central dentro del desarrollo del cáncer que explicara la aparición de cada uno de los *hallmarks* condujo al estudio de las condiciones e interacciones que permiten al cáncer aparecer, crecer y diseminarse. En el año 2011 Hanahan y Weinberg durante una revisión a sus *hallmarks* añadieron el término de “características habilitadoras” que se refieren a las condiciones necesarias para el desarrollo del cáncer ⁴.

❖ **Característica: Inestabilidad genómica y mutaciones**

Uno de los principales eventos celulares es la duplicación correcta del material genético y su segregación hacia dos células hijas, las cuales tendrán la misma información que la progenitora. Los errores durante este proceso suelen tener un efecto acumulativo hacia las siguientes generaciones y pueden implicar la pérdida de función de algún gen o incluso en casos más severos, la pérdida de una gran porción de información genética. Este proceso es conocido como inestabilidad genómica (IG) y es compartido casi universalmente por todos los tipos de cáncer conocidos, siendo la inestabilidad cromosómica (IC) el principal cambio en el material genético observado en las células tumorales. La IC se refiere a los cambios en estructura o número de los cromosomas presentes en las células tumorales en comparación con células normales. Estos cambios aleatorios en el genotipo parecen conferir una ventaja de selección a las clonas celulares subsecuentes permitiéndoles posicionarse como el fenotipo dominante en el tejido ^{4,10,11}.

Aunque la IC es la fuente mayor de inestabilidad genómica en los seres humanos, las mutaciones aleatorias sobre todo en genes del sistema de reparación y mantenimiento del DNA también contribuyen de manera importante al desarrollo del cáncer. Uno de los ejemplos más característicos es la mutación en el gen *TP53* el cual codifica la proteína p53 la cual actúa en respuesta al daño en el DNA arrojando el ciclo celular evitando la proliferación de células anormales. Algunas de las mutaciones en los genes de identificación de daño y reparación del DNA son heredables y proveen una gran evidencia hacia el modelo de IG como el caso

de la mutación en el gen *BRCA1* que ha sido correlacionada directamente con el desarrollo del cáncer de mama ^{4,11-13}.

❖ **Característica: Inflamación como promotor de proceso tumoral**

En la gran mayoría de los tumores se pueden encontrar células inmunes tanto de la respuesta innata como de la respuesta adquirida infiltrando el tejido adyacente, las cuales se pensaba actuaban como una de las primeras respuestas antitumorales del organismo¹⁴, sin embargo, se ha demostrado un efecto paradójico en esta respuesta primaria. Muchas de las moléculas secretadas por estas células inmunes para mantener la inflamación contribuyen al microambiente tumoral actuando como factores que promueven y mantienen el estado proliferativo, inducen angiogénesis y/o modifican la matriz extracelular promoviendo la transición epitelio-mesénquima (TEM) facilitando así la obtención de las características neoplásicas ^{4,15}.

El proceso inflamatorio puede incluso acelerar y promover el desarrollo del cáncer como lo demostraron Grivennikov y colaboradores en el año 2010, dado que, durante el proceso inflamatorio se producen muchas especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) que pueden favorecer el desarrollo de mutaciones del DNA en las células tumorales incrementando la IG ya presente en ellas ^{4,15}.

La adición de estas características habilitadoras al modelo de los *hallmarks* permitió robustecer la hipótesis del cáncer como una entidad compleja con niveles de organización y características emergentes más allá de la suma de las partes

individuales. Estas características emergentes se describieron como dos nuevos *hallmarks* en el año 2011.

❖ **Hallmark emergente: Reprogramación del metabolismo energético celular**

Las células de cáncer mantienen una tasa proliferativa alta y como todo proceso biológico esta requiere energía para sostenerse; bajo condiciones normales la célula es capaz de cubrir su requerimiento energético gracias al metabolismo aeróbico de la glucosa, produciendo una pequeña parte de energía en el citosol mediante la formación de piruvato y continuando el proceso en la mitocondria. Paradójicamente las células cancerígenas favorecen un metabolismo de glucólisis en el citosol, es decir, descomponen la glucosa en lactato aún en condiciones ricas en oxígeno^{4,16}. Este cambio en el metabolismo parecería contraproducente para las células cancerígenas, dado que, el proceso “anaeróbico” que mantienen es 18 veces menos eficiente energéticamente que la fosforilación oxidativa mitocondrial, sin embargo, este cambio metabólico ha sido correlacionado con la activación de oncogenes que favorecen principalmente el estado proliferativo celular (*RAS*, *MYC*) y con variantes mutantes de genes supresores de tumores (*TP53*) limitando el control del ciclo celular.

Para mantener una tasa proliferativa tan alta, las células de cáncer sobre expresan transportadores de glucosa (*GLUT1*) permitiéndoles aumentar su ingesta de glucosa hasta 200 veces más que una célula normal^{4,16,17}.

❖ **Hallmark emergente: Evasión del sistema inmune.**

El papel entre el sistema inmune y el desarrollo del cáncer ha sido motivo de diferentes especulaciones y durante las últimas décadas diversos experimentos han permitido asentar la importancia del sistema inmune para eliminar células cancerígenas incipientes. En pacientes inmunocomprometidos se ha demostrado un incremento significativo en la incidencia de ciertos tipos de cáncer, esto podría ser explicado por la ausencia de vigilancia y control hacia las nuevas células cancerígenas; sin embargo, casi todos estos tipos de cáncer son de etiología viral y se podría argumentar que el sistema inmune destruye células con carga viral, no así, por presentar características cancerígenas ^{4,18}.

En las últimas décadas, la ingeniería genética ha permitido crear animales inmunodeficientes para estudiar con más detalle el papel que juega el sistema inmune en el cáncer. Ratones con deficiencias en componentes del sistema inmune (CD8+ citotóxicas, CD4+ cooperadoras y/o células “*Natural killer*”) demostraron consistentemente una mayor incidencia en cánceres de etiología no viral, demostrando el papel significativo que tiene tanto la respuesta inmune innata como la adquirida en el desarrollo del cáncer. Dentro de los mismos experimentos se demostró que los tumores iniciados en ratones inmunodeficientes eran poco eficientes o incapaces de formar un tumor secundario cuando se trasplantaban a ratones con sistema inmune competente, sin embargo, los tumores desarrollados en ratones con sistema inmune competente presentaban una gran eficiencia en formar metástasis cuando eran trasplantados tanto a ratones inmunodeficientes como normales. Este último resultado generó la hipótesis de que constantemente

pueden presentarse células cancerígenas incipientes, las cuales son detectadas y destruidas por el sistema inmune, demostrando su importancia como barrera de formación de tumores. Sin embargo, una pequeña fracción de las células cancerígenas son capaces de burlar la detección y/o destrucción por parte del sistema inmune y son estas las que progresan a cáncer ^{4,19,20}.

Epidemiología

El cáncer es uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial causando más muertes que todas las enfermedades coronarias o eventos cerebrales cada año ²¹. En el año 2012 se reportaron 14.1 millones de nuevos casos de cáncer a nivel mundial, 8.2 millones de muertes (Globocan 2012) y se predice que este número aumentará en 70% en las siguientes décadas (OMS 2015). En México, el cáncer con mayor incidencia en la población femenina es el cáncer de mama, afectando a casi 1 de cada 3 mujeres mexicanas en algún momento de su vida (Globocan 2012). El INEGI atribuye el 8% de todas las muertes de mujeres mexicanas al cáncer de mama y estima que es culpable del 5.6% de “muertes evitables en exceso” (que son aquellas evitables dada la tecnología médica existente) al año.

El cáncer de mama es una entidad compleja con variantes en presentación, morfología, evolución y respuesta a tratamientos, lo cual lo vuelve un verdadero reto en cuanto al curso de acción terapéutica ²². Dado el complejo panorama que presenta el cáncer de mama, era necesaria la clasificación y estandarización de

formas clínicas. Tomando en cuenta los patrones histológicos presentes en las muestras de pacientes se creó la primera clasificación de cáncer de mama ²³.

Clasificación histológica:

Dado que el cáncer de mama no presenta una progresión histopatológica secuencial como en otros tipos de cáncer, este se puede clasificar en dos grandes grupos: carcinoma *in situ* o carcinoma invasivo. En el caso del carcinoma *in situ* se refiere a los tumores delimitados por la capa basal del tejido y por lo tanto no se han diseminado a diferencia del carcinoma invasivo, el cual ha penetrado los tejidos circundantes de la capa en la que se desarrolló inicialmente. El carcinoma de mama *in situ* presenta otra subdivisión basada en características citológicas y patrones de crecimiento tumoral, dividiéndolos en “ductal” o “lobular”^{23 24}.

El cáncer de mama presenta diversos cursos clínicos y pronto surgió la necesidad de complementar la clasificación clínica e histológica con el fin de aumentar su factor pronóstico de riesgos relativos hacia terapias no radicales ^{23 25}. La búsqueda de estas características permitió la inclusión de marcadores moleculares, los cuales delimitaron 4 subtipos diferentes ²⁶.

❖ Subtipo receptor de estrógeno (ER)

Se caracteriza por la expresión del receptor de estrógeno (17 β -estradiol) y se estima que cerca del 70% de los casos de cáncer de mama pertenecen a este subtipo. La presencia de este receptor es la principal indicación para la terapia

hormonal ²⁷. El uso de moduladores del receptor de estrógeno como Tamoxifen pueden reducir el riesgo de recurrencia del cáncer hasta en un 50% ²⁸.

❖ **Subtipo receptor de progesterona (PR)**

El receptor de progesterona es codificado por el gen *PGR*, se estima que cerca del 80% de los casos de cáncer dependientes de hormonas son del tipo ER+/PR+ y solo alrededor del 3% de estos, presenta el tipo ER-/PR+ donde solo el receptor de progesterona está presente ²⁷.

❖ **Subtipo Receptor factor de crecimiento de tipo epidérmico humano (HER2)**

Este subtipo se presenta en 15-20% de casos de cáncer de mama ²⁹, es codificado por el gen *ERBB2* y se considera un receptor sin ligando identificado, aunque se ha demostrado que puede interactuar con otros receptores de la familia EGF. Este subtipo de cáncer tiene peor pronóstico que los positivos a hormonas, sin embargo, existen opciones de terapias específicas contra el receptor (Trastuzumab) ³⁰.

❖ **Subtipo triple negativo**

Los tumores cuyas células no expresan ninguno de los receptores previamente señalados (PR-, ER-, HER2-) son denominados como “triples negativos”. Este subtipo se presenta en una menor proporción, sin embargo, tiene asociado un

peor pronóstico debido a que los tumores suelen comportarse de manera más agresiva³⁰.

En conjunto ambos sistemas de clasificación (histológico y receptores) presentan un valor pronóstico que permite evaluar ciertos riesgos relativos ante los tratamientos no radicales, sin embargo, no brindan una categorización del comportamiento biológico o clínico del tumor³¹ y la falta de datos del componente molecular, limita las opciones de terapias dirigidas²³.

Gracias al desarrollo tecnológico de las últimas décadas, las nuevas tecnologías han permitido el análisis de patrones de expresión génica de los tumores, que en unión con los sistemas de clasificación anteriores, permite entender al cáncer de mama como un modelo biológico con carácter predictivo²². Esta nueva clasificación propuesta por el grupo de Sørlie y colaboradores, en el año 2001 agrupa 5 diferentes tipos moleculares de acuerdo al patrón de expresión de cada tumor. Actualmente se ha agregado un sexto grupo a esta clasificación³². Este nuevo sistema integral abre las puertas a terapias moleculares específicas, aumentando el repertorio terapéutico y mejorando las probabilidades de supervivencia de los pacientes²³.

1. Tumores luminales

Reciben este nombre ya que presentan un patrón de expresión génica muy similar a las células del epitelio luminal de la glándula mamaria. En general ambos tipos de tumores (luminal A y luminal B) presentan receptores de hormonas (ER+PR+) y

son los tumores más comunes abarcando alrededor del 60%. Estos tumores cuentan con el mejor pronóstico de todos, aunque el subtipo luminal B tiene un peor pronóstico con respecto al subtipo luminal A debido a la expresión de genes asociados a la proliferación ³¹.

2. Tumores con sobre-expresión de HER2

Estos tumores por lo general suelen correlacionarse con un patrón de receptores hormonales negativos (ER- PR-) y receptor del factor de crecimiento humano positivo (*HER2+*), sin embargo, lo que realmente caracteriza a este grupo es la sobre-expresión de genes en el amplicón del gen *ERBB2*, como por ejemplo *PGAP3*. Estos tumores suelen tener un peor pronóstico que los luminales puesto que la familia *EGF* se ha asociado a vías de señalización de proliferación, migración y supervivencia celular. Los tratamientos con antraciclinas y taxanos en unión a quimioterapias y terapias dirigidas contra el receptor suelen brindar alguna mejora ³¹.

3. Tumores basales

Se denominan basales dado que su patrón de expresión es similar a las células de la capa basal de la glándula mamaria. En este subtipo podemos encontrar a las células triple negativo, es decir, no expresan receptores hormonales ni factor de crecimiento humano (ER-PR-HER2-). Son los tumores con peor pronóstico debido a su progresión clínica rápida y alta tasa de recurrencia. Este subtipo suele

presentarse en mujeres jóvenes pre menopáusicas. A diferencia de los subtipos anteriores, no existe alguna terapia adyuvante a la quimioterapia para tratar este tipo de tumores.

4. Tumor “tipo normal”

Este grupo de tumores tiene la prevalencia más baja alrededor del 5-10% de los casos. Su patrón de expresión suele corresponder con tejido adiposo de la glándula mamaria. Este subtipo molecular suele presentar un patrón triple negativo pero a diferencia del tipo basal, este no expresa moléculas características de la lámina basal como CK5 y EGFR. Su factor pronóstico es intermedio y no muy acertado. Muchas instituciones ponen en duda la existencia como tal de este subtipo, argumentando que podría ser un artefacto técnico en los microarreglos, esto basado a que en las muestras aisladas por micro-disección nunca se ha encontrado el subtipo ³³.

5. Tumor Bajo en Claudinas

Este grupo de tumores se caracteriza por la baja expresión de genes asociados a las uniones estrechas entre células y al fenotipo epitelial de los tejidos incluyendo las claudinas 3, 4, y 7. Se estima que este subtipo representa del 7-14% de todos los carcinomas invasivos de mama y que esto se debe al enriquecimiento de genes de transición epitelio mesénquima, así como a una gran inestabilidad genómica. Este tipo de tumores por lo general presenta células triple negativo y se

ha reportado una tendencia de resistencia a la quimioterapia convencional, haciendo que se asocie a un pronóstico pobre ^{34 35}.

A modo de resumen se presenta en la tabla 1 un listado con las características diferenciales entre cada subtipo de cáncer de mama.

| <i>Subtipo molecular</i> | <i>Receptor de estrógenos</i> | <i>Receptor de Progesterona</i> | <i>Receptor HER2</i> | <i>Frecuencia global</i> |
|--------------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------|--------------------------|
| <i>Luminal A</i> | + | + | - | 50-60% |
| <i>Luminal B</i> | +/- | +/- | +/- | 10-20% |
| <i>Her2 positivo</i> | - | - | + | 10-15% |
| <i>Basal</i> | - | - | - | 10-20% |
| <i>“Normal”</i> | +/- | +/- | - | 5-10% |
| <i>Bajo en claudinas</i> | - | - | - | 7-14% |

Tabla 1: Subtipos moleculares de cáncer de mama y su expresión general de receptores de membrana, así como, sus frecuencias generales relativas.

Origen del cáncer

La identificación y caracterización de los tipos moleculares de cáncer de mama representó un gran avance en el entendimiento del proceso biológico detrás de la patología y es que, en el cáncer de mama a diferencia de otros tipos de cáncer (colon, páncreas) no existe una mutación central sobre la cual se desarrolle la enfermedad. Como se ha demostrado con los subtipos moleculares, no existe una vía de señalización o presentación histológica primaria sobre la cual se desarrollen los demás cambios fisiológicos. No existe una progresión lineal general en el cáncer de mama de un tejido bien diferenciado a un tumor maligno, por el contrario, incluso dentro del mismo tumor existe una *heterogeneidad* celular ²⁴.

Este fenómeno denominado *heterogeneidad* tumoral se define como la presencia de diversas subpoblaciones celulares en el mismo microambiente formado por el tumor ³⁶.

Una de las teorías principales para explicar este fenómeno de *heterogeneidad* celular es el modelo de las Células Troncales de Cáncer (CTC) el cual propone que una subpoblación celular del tumor retiene características similares a las células troncales normales de cada tejido y es capaz de reproducir todas las subpoblaciones componentes del tumor original de una forma jerárquica ²⁶. El origen de estas CTC aún se mantiene desconocido pero se han planteado dos hipótesis posibles; 1) Todas las células de un tumor son equipotentes y por procesos estocásticos una población mantiene la proliferación indiferenciada (CTC) mientras que el resto de las células continúan su proceso de diferenciación ³⁷. 2) Las CTC provienen de una célula troncal mutada y solo estas mediante un proceso jerárquico de diferenciación son responsables de mantener el resto de las subpoblaciones presentes en el tumor ²³.

Células troncales

Las células troncales (CT) son una población presente en la mayoría de los tejidos del cuerpo, estas células han sido encontradas en tracto digestivo, músculo, cerebro y hasta en tejidos hematopoyéticos. Son una subpoblación necesaria para mantener la homeostasis durante toda la vida del organismo ³⁷.

Todas las CT en diferentes tejidos comparten tres características cardinales: 1) Autorrenovación, 2) Capacidad de desarrollarse en múltiples linajes celulares y 3) Gran capacidad de proliferación. Las células troncales de cáncer comparten estas 3 características con sus análogas sanas. El modelo de CTC brinda una explicación a fenómenos complejos como las metástasis, pues bastaría que pocas CTC migraran del tumor original a un nicho diferente para finalmente replicar el tumor. El fenómeno de la reincidencia en pacientes que después del tratamiento se han clasificado como “en remisión” y que tiempo después vuelven a presentar tumores, se podría deber a la supervivencia de pocas CTC resistentes a la terapia convencional las cuales podrían volver a reproducir la *heterogeneidad* del tumor inicial^{38 37}.

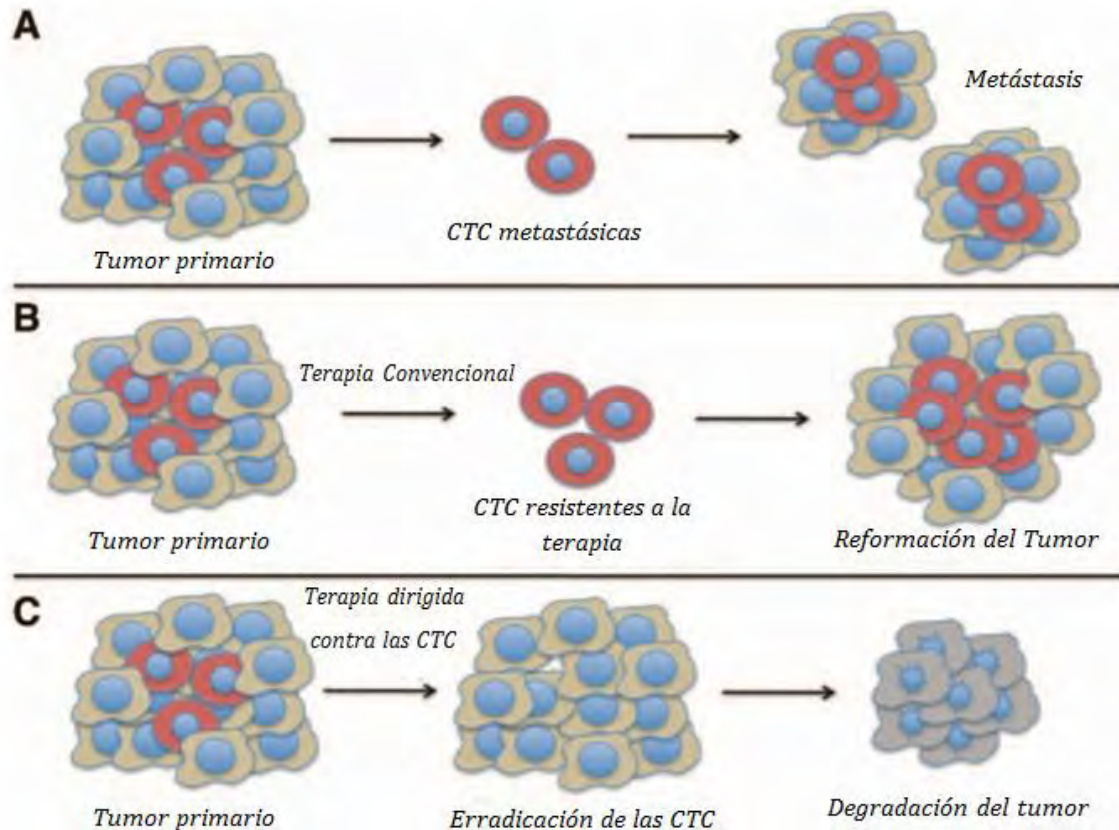


Ilustración 2 Hipótesis de las células troncales de cáncer y sus posibles escenarios de progresión tumoral. **A)** Las CTC son las responsables del proceso metastásico, ya que son las únicas células del tumor capaces de reproducir la heterogeneidad celular total del tumor primario. **B)** Las CTC presentan una mayor resistencia a las terapias convencionales y bastaría que un pequeño número de esta subpoblación celular sobreviviera para formar un tumor refractario y provocar un relapso del cáncer. **C)** Al ser las CTC las únicas células capaces de mantener la heterogeneidad tumoral, bastaría atacar directamente a esa subpoblación para evitar el progreso del cáncer, así como, posibles relapsos o metástasis. Imagen modificada de ³⁹.

Células troncales de mama

La glándula mamaria es un órgano dinámico que se remodela en cada ciclo estral y embarazo, por lo que mantiene una población de células troncales capaz de producir los tres linajes principales que componen el tejido mamario. Actualmente diversos estudios *in vitro* han identificado una subpoblación tumoral con un fenotipo y analogías correspondientes a las CT de la mama, las cuales son

capaces de iniciar tumores. Estas células se han denominado “Células troncales de Cáncer de Mama” (CTCM) y ha sido posible aislarlas mediante el uso de marcadores fluorocitométricos que les confieren un perfil EpCAM+ CD44+ CD24^{low} y positivas a la actividad de aldehído deshidrogenasa ²⁶ Diversos estudios *in vivo* con CTCM aisladas, han demostrado su gran capacidad para iniciar un tumor y su posible potencial como blanco en nuevas terapias dirigidas ²⁶

23 .

La vía NF-κB y las CTCM

Como se ha propuesto es necesario desarrollar una terapia que apunte a disminuir o erradicar la población de células troncales de cáncer de mama para mejorar el pronóstico de supervivencia y disminuir la probabilidad de recurrencia o metástasis en los pacientes. Este tipo de terapia presenta el gran reto de poder discriminar entre una célula troncal de cáncer de mama y una célula normal, con la finalidad de evitar un daño irreversible en el tejido mamario ^{40 38}.

La vía NF-κB consiste de una familia de factores de transcripción con 5 miembros: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105/p50 y p100/p52. Esta vía ha sido ampliamente caracterizada como uno de los principales sustentos para las células troncales de diversos tejidos y ha sido vinculada particularmente al mantenimiento de las células troncales de cáncer, dado que regula una gran cantidad de genes asociados a los “*hallmarks*” del cáncer y a la regulación del microambiente

tumoral. Esta vía puede ser activada por dos formas, la canónica y la no canónica (ilustración 3).

NF- κ B vía canónica

Esta vía es activada por citocinas inflamatorias como TNF o IL-1, una vez recibido el estímulo, el complejo IKK fosforila a la proteína inhibidora I κ B α , provocando la liberación del complejo p65/p50 para su posterior translocación a núcleo, promoviendo la transcripción de sus genes diana que incluyen factores anti-apoptóticos, citocinas y factores de proliferación como ciclina D1.

NF- κ B vía no canónica

Esta vía puede ser activada por receptores como LT β R, BAFFR y RANK que al recibir el estímulo correspondiente ocurre la estabilización de la proteína NIK, lo cual resulta en la activación de los dímeros de IKK α que fosforilan a p100 el cual es procesado parcialmente por el proteosoma convirtiéndose en p52 formando un complejo junto a RelB, el cual puede ser translocado al núcleo para promover la transcripción de genes asociados a resistencia contra la apoptosis como Bcl-xl o CD44 como receptor del ácido hialurónico ⁴¹.

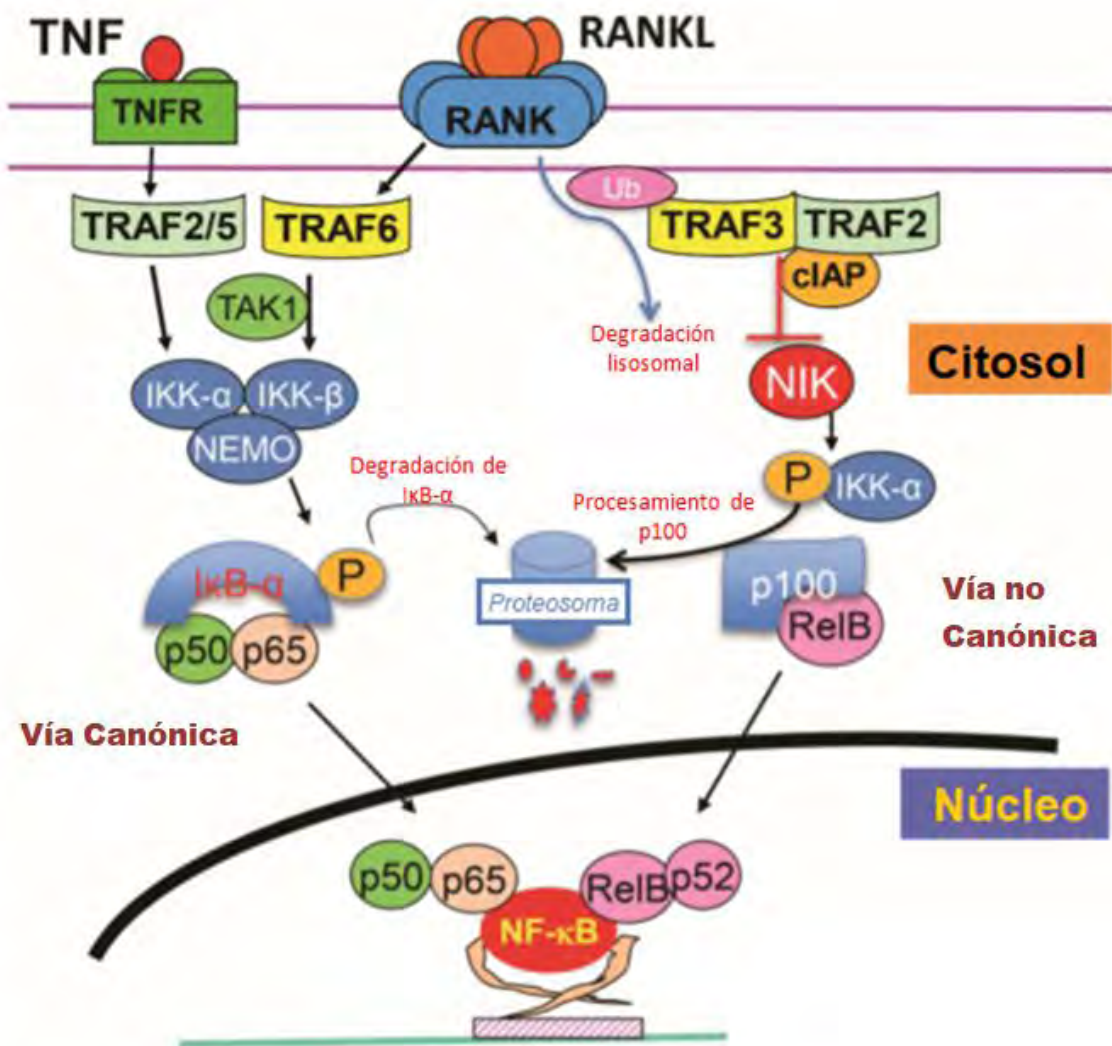


Ilustración 3 La vía NF-κB. A Modo de resumen en la imagen podemos observar las dos ramas que constituyen a la vía. **La vía canónica** (a la izquierda) es activada por estímulo de citocinas como TNF o IL-1 y el complejo IKK con sus unidades α , β y γ y lleva a la fosforilación de I κ B- α liberando al dimero p50/p65 para ser traslocado al núcleo. En **la vía no canónica** (a la derecha) activada por la unión de RANK/RANKL la enzima inductora de NF- κ B (NIK) interactúa con homodímeros de IKK- α los cuales marcan a p100 para su procesamiento, culminando en la traslocación al núcleo de RelB/p52. Imagen modificada de ⁴²

RANK/RANKL

El receptor activador del factor nuclear κ B, conocido como RANK es miembro de la súper familia de receptores TNF. Originalmente fue descrito en la superficie de los osteoblastos y asociado con la remodelación ósea. En la glándula mamaria la

activación de RANK/RANKL induce la transcripción de ciclina D1, aumentando la tasa de proliferación y diferenciación de las células epiteliales del tejido mamario.

RANKL es secretado principalmente por células PR+ y estas por estimulación paracrina estimulan a las CTM (PR-) que expresan el receptor RANK, este mecanismo es altamente conservado y se ha encontrado en todos los mamíferos. Estudios en ratones con RANK o RANKL suprimidos han demostrado una atrofia generalizada de la glándula mamaria e incapacidad de las células alveolares para producir leche. Adicionalmente estos ratones presentan menor incidencia al cáncer de mama inducido por hormonas ⁴³.

Denosumab

Actualmente existen terapias inmunológicas específicas contra la osteoporosis, que emplean un anticuerpo monoclonal altamente selectivo contra RANKL. Al unirse con este ligando el anticuerpo evita la unión con su receptor, evitando el inicio de la señalización que culminaría con la diferenciación de los osteoclastos. Un menor número de osteoclastos maduros se traduce directamente en una disminución significativa de la tasa de destrucción del tejido óseo. Este anticuerpo comercializado bajo el nombre de Denosumab ha sido aprobado por la FDA y catalogado como seguro ⁴⁴.

Dado el efecto de RANK/RANKL que se ha observado en el control y desarrollo de la glándula mamaria y la regulación que ejerce sobre la autorrenovación de las

CTC, se postula el uso de inhibidores de la vía, como Denosumab, como terapia adyuvante al tratamiento de cáncer de mama.

Justificación

El cáncer de mama ocupa el primer lugar tanto en incidencia como mortalidad en la población femenina. Uno de los mayores problemas con este cáncer en México es la poca esperanza de vida y la alta tasa recurrencia tumoral. Es por eso necesario la investigación y desarrollo de nuevas terapias o adyuvantes que permitan una remisión completa o un incremento en la probabilidad de recuperarse del cáncer de mama sin importar el subtipo que se presente. La teoría de las células troncales de cáncer de mama abre la puerta a nuevas terapias dirigidas contra esta subpoblación tumoral, por lo tanto, es necesario experimentar y comprobar el posible uso de cada nueva herramienta disponible en el potencial arsenal terapéutico.

Hipótesis

Si la vía de señalización RANK/RANKL es clave para el desarrollo y sustento de las células troncales tumorales en el cáncer de mama, entonces la inhibición

farmacológica de RANKL disminuirá la población troncal y afectará el crecimiento tumoral.

Objetivo General

- Analizar la expresión de RANK/RANKL en un panel de líneas celulares y evaluar el efecto de la inhibición farmacológica de RANKL en la regulación de la población troncal de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-468.

Objetivos particulares

- Determinar el nivel de expresión de RANK/RANKL en las diferentes líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231, MDA-MB-468, BT-20, MCF7, SK-BR-3, MDA-MB-453, T47D, ZR-75).
- Evaluar el efecto del anticuerpo monoclonal Denosumab en la expresión de marcadores de troncalidad (OCT4, NANOG, ALDH1A3, ALDH8A1).
- Determinar la capacidad de Denosumab para reducir la población de células troncales tumorales mediante el análisis por citometría de flujo y lectura de marcadores de superficie.
- Evaluar la función de Denosumab en la regulación de la población troncal y la capacidad tumorigénica de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-468, así como su impacto en la viabilidad y migración celular.

- Evaluar el efecto antitumoral de Denosumab en un modelo *in vivo* de xenotransplante (*Danio rerio*).

Material y Métodos

Cultivo celular

La línea celular MDA-MB-468 se obtuvo del ATCC (American Type Culture Collection) y se mantuvo en medio DMEM 1X (Corning Ref: 10-013-CMR) suplementado con 5% con suero fetal bovino (SFB) (Gibco Ref: 26140-079). Las células se mantuvieron en incubadora a 37°C con 5% de CO₂ y se tripsinizaron utilizando PBS1X/tripsina/EDTA por 3 minutos cuando alcanzaban una confluencia alrededor del 80%. La tripsina fue neutralizada con el mismo medio DMEM 1X y las células fueron centrifugadas a 1300 rpm por 3 minutos. Las células fueron resuspendidas en medio y resembradas para su propagación.

Curva de Denosumab

En una placa de 12 pozos se colocaron 350,000 células por pozo y posteriormente se probaron diferentes concentraciones de Denosumab desde 0.5mg/ml hasta 5mg/ml por 48 horas para obtener la concentración correlacionada con los cambios en marcadores de superficie por medio de citometría de flujo. En cada ensayo con Denosumab se utilizó medio libre de suero fetal bovino.

Citometría de flujo

Las células se removieron de la placa de cultivo mediante el uso de PBS/EDTA/Tripsina y se lavaron 3 veces con PBS/EDTA para asegurar retirar todo el medio de cultivo presente. Para asegurar que hubiera el mismo número de células entre ensayos técnicos y grupos control y tratamiento, las células se contaron en cámara de Neubauer. La actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) fue determinada por medio del kit “*Aldefluor assay kit*” (*Stem Cell Technologies, Inc., Cambridge, MA, USA*) de acuerdo a las instrucciones de uso del fabricante. Las células se dejaron incubar a 37°C durante 50 minutos con el reactivo *ALDEFLOUR* y cada muestra fue comparada con su control negativo el cual contiene el inhibidor *DEAB* (N,N-dimetilaminobenzaldehído) el cual es un inhibidor selectivo de las isoenzimas aldehído deshidrogenasas. Cada muestra fue leída en el equipo *FACSaria II* y comparada contra su propio control *DEAB* mediante el *software FlowJo V.10.2* (*FlowJo LLC, 2013-2018*).

Extracción de RNA

El RNA total se obtuvo por medio del método de *TRizol* (*Life Technologies*) de acuerdo al protocolo incluido por el productor. Una vez recolectadas las células estas se centrifugaron a 4°C por 5 minutos a 1,300 rpm para formar un botón. Las células fueron resuspendidas en 500ul de *TRizol* y posteriormente se agregó 100ul de cloroformo, esta mezcla fue centrifugada a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Al terminar la centrifugación se obtuvieron tres fases diferentes, se tomó la cristalina (RNA) con ayuda de micropipeta, después se le agregó el mismo

volumen de isopropanol (1:1) y esta mezcla se dejó 20 minutos a -20°C. Transcurrido el tiempo esta mezcla se centrifugó 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El botón resultante fue lavado 2 veces con etanol 70% en agua DEPC (dietilpirocarbonato) y centrifugado a 7,500 rpm durante 10 min a 4°C entre lavados, procurando que la muestra estuviera lo más seca posible entre ellos. Al final se resuspendió el RNA en 20ul de agua libre de nucleasas y se comprobó su calidad y cantidad mediante el uso del espectrofotómetro *NanoDrop™ 2000*.

RT, PCR y qPCR

Un total de 5µg de RNA de cada línea celular (MDA-MB-468, MDA-MB-231, MDA-MB-453, BT-20, MCF-7, SKBR3, ZR75, T-47D) por triplicado biológico, fue retrotranscrito por medio del kit *Maxima First strand cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)* siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. La secuencia de los *primers* utilizados para cada gen y su temperatura de fusión se encuentra resumida en la tabla 2.

Para la línea MDA-MB-468 con o sin tratamiento con Denosumab se retrotranscribieron 500µg de RNA de 3 réplicas biológicas cada una con dos replicas técnicas.

Para el análisis de la expresión génica por RT-PCR en tiempo real se tomaron 10ng del cDNA resultante de la retrotranscripción para la reacción con *SYBR-select Master Kit (Applied Biosystems)* en el sistema 7900HT (*Applied Biosystems*). Para el cálculo de la expresión relativa de los genes de interés se utilizó el

logaritmo $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ donde el ciclo umbral (CT) de cada muestra y se le restó el CT de un gen constitutivo (TBP para el análisis de líneas celulares y 18s para los genes de troncalidad) dando como resultado el valor ΔCT . Para calcular el cambio relativo entre variables se promediaron los CT de las muestras control al cual se le resto el valor ΔCT , obteniendo el valor $\Delta\Delta CT$.

| Gen | | Secuencia | TM |
|----------------|----|-----------------------------------|-----------|
| 18s | F' | ATG GCC GTT CTT AGT TGG TG | 55.3 |
| | R' | TCC TCG TTC ATG TTT AAT AA | 53.2 |
| TBP | F' | CCA CAG CTG TTC CAC TCA CA | 57 |
| | R' | CTG ATG ATT ACC GCA GCA AA | 53.3 |
| ALDH8A1 | F' | CAG GCT ACT TTA TGC TTC CCA C | 55.7 |
| | R' | GCT CTT TCA ATC ACC TCC TCT T | 54.7 |
| ALDH1A3 | F' | GCA TAC CGT GGA AGG GCG | 50.1 |
| | R' | GCT CTC TGG GCT ATT GAT TCT GTC | 57.2 |
| OCT4 | F' | ACA TCA AAG CTC TGC AGA AAG AAC | 55.8 |
| | R' | CTG AAT AAC TTC CCA AAT AGA ACC C | 55.2 |
| NANOG | F' | AGG CAA ACA ACC CAC TTC TG | 55.8 |
| | R' | TCT GCT GGA GGC TGA GGT AT | 57.7 |
| RANK | F' | ATC TGG GAC GGT GCT GTA A | 56 |
| | R' | CCA CAG GGC AGA CAT ACA CT | 56.9 |
| RANKL | F' | TAT GCC AAC ATT TGC TTT CG | 51.8 |
| | R' | GGT GCT TCC TCC TTT CAT CA | 54.8 |

Tabla 2: Listado de los primers utilizados y sus temperaturas de fusión.

Viabilidad Celular

Para el ensayo de viabilidad celular se sembraron 8000 células MDA-MB-468 en placas de 96 pozos con 200ul de medio DMEM 1X en cada uno de los pozos. Se realizaron 3 réplicas biológicas de 3 diferentes tiempos de exposición al tratamiento (24h, 48h, 72h). Se agregó 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante y finalmente las placas fueron analizadas por absorbancia a una longitud de onda de 450nm utilizando la fórmula: "Viabilidad celular= (O.D. tratamiento /Control O.D.) X100".

Migración Celular

Se utilizaron placas de 24 pozos "Transwell" (#3422 Corning Incorporated, Kennebunk ME, USA) los cuales fueron hidratados con medio DMEM 1x por 90 minutos previos al experimento. En la parte superior del *Transwell* se colocaron 35,000 células en 200ul de medio DMEM 1x las cuales se dividieron en dos grupos: Control vs. Tratamiento. En la parte inferior se colocaron 600ul de medio DMEM 1x al 10% SFB. Al mismo tiempo se sembró la misma cantidad de células otra placa de 24, estos sirvieron como controles de carga para verificar el número de células sembradas. Pasadas las 24 horas se realizaron lavados secuenciales de los *Transwell*, pozos y controles de carga con PBS. Los *transwell* y los pozos

se fijaron con PFA 4% durante 20 minutos, inmediatamente después se realizaron 3 lavados secuenciales con PBS. Finalmente tanto los *Transwell* como los controles de carga se tiñieron con Cristal Violeta y se lavaron con PBS para retirar el exceso. Las células en el interior de los *Transwell* fueron retiradas mecánicamente por medio de un hisopo, dejando así solamente las células dentro de la membrana. Los *transwell* fueron observados a microscopio y fotografiados para el conteo de células que migraron. Los controles de carga fueron destañidos con ácido acético y leídos para absorbancia.

Generación de línea estable MDA-MB-468 GFP positiva.

Se utilizaron 1×10^6 células por pozo en cajas de 6 pozos correspondientes al 80% confluencia. Estas células fueron transfectadas con 3ug del vector pGFP-V-RS (*OriGene*) por medio de 7.5µg *Lipofectamine 2000* (*Invitrogen*) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. 48 horas después de la transfección las células fueron sometidas a selección por geneticina (g418) a una concentración de 0.4ug/ul.

Xenotransplantes en pez cebra (Danio rerio)

Con el fin de analizar la capacidad tumoral de la línea celular MDA-MB-468 *in vivo*, se obtuvieron embriones de pez cebra a partir de cruza naturales adultas, las cuales fueron mantenidas a un pH constante de 7.2-7.4, un rango de temperatura entre 26-28°C y un ciclo de luz/oscuridad de 14h/10h. Los embriones obtenidos de las cruza se mantuvieron separados de los adultos a 28.5°C durante 48 horas

post-fertilización. Posteriormente los embriones fueron decorionados y anestesiados con tricaina (MS-222 #cat. E10521) para el proceso de inyección.

Se sembraron células de la línea estable MDA-MB-468 GFP positiva en dos grupos, un control y un tratamiento el cual fue expuesto a Denosumab en concentración de 1mg/ml durante 24 horas previas a la inyección de embriones de pez cebra 48 horas después de la post fertilización. Pasadas las 24 horas de tratamiento, las células fueron lavadas con PBS y tripsinizadas, estas fueron contadas para concentrar 1×10^6 células en 100ul de medio DMEM 1X. Se inyectaron 3 diferentes concentraciones celulares por ensayo biológico (200, 300 y 400 células respectivamente) en embriones de pez cebra de 48 horas post fertilización para descartar algún efecto dependiente del número celular inyectado. Estos embriones fueron monitoreados por 5 días después del xenotransplante y fotografiados mediante microscopio óptico con luz normal y fluorescencia con el fin de determinar la presencia de tumores, volumen de los mismos y migración o invasión de células cancerígenas. Los resultados obtenidos se analizaron mediante el software “ELDA: Extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays ⁴⁵” de la división bioinformática de instituto The Walter and Eliza Hall en Australia para calcular la frecuencia de células troncales de cáncer en los grupos control y tratamiento.

Resultados

- ***RANK* se expresa más en las líneas celulares triple negativas**

La expresión de *RANK* y *RANKL* se determinó mediante PCR en tiempo real en un panel de líneas celulares. El análisis por PCR en tiempo real muestra un aumento en la expresión relativa de *RANK* en las líneas celulares MDA-MB-468 y BT-20, ambas dentro del subtipo triple negativo. La línea celular SBKR3 perteneciente al subtipo *HER2+* también demuestra un aumento en la expresión relativa de *RANK*, sin embargo, la otra línea *HER2+* presente en el estudio (MDA-MB-453) no presenta el mismo comportamiento (figura 1). Las líneas celulares pertenecientes a los subtipos luminales (T47D, MCF7 y ZR75) presentan una marcada disminución en la expresión de *RANK* (figura 2).

Con respecto a *RANKL*, este se expresó en todos los subtipos moleculares y no mostró ninguna asociación con algún subtipo molecular.

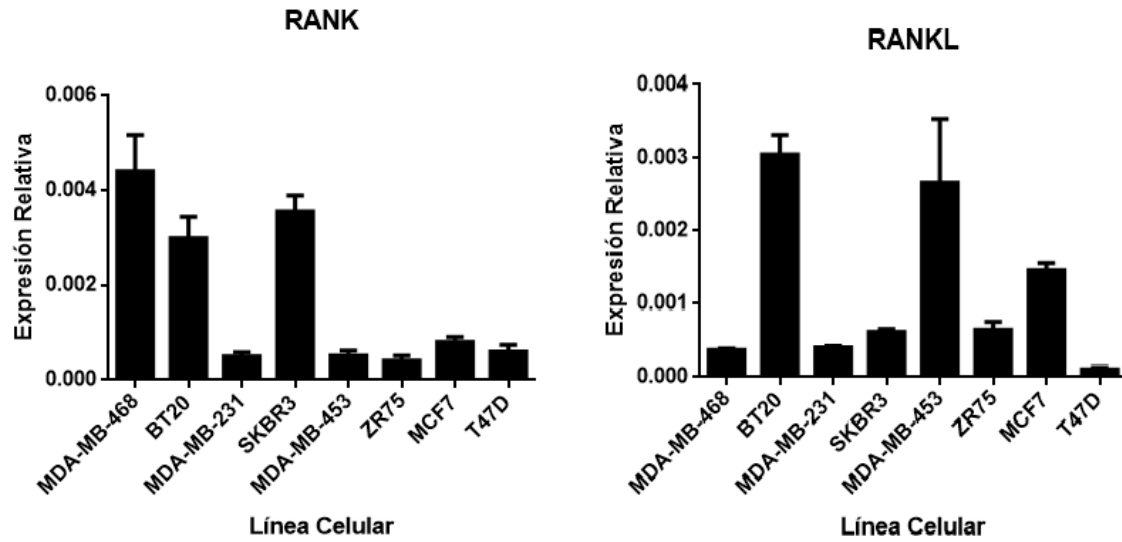


Figura 1: Análisis de la expresión de RANK/RANKL mediante PCR en tiempo real. La gráfica muestra la expresión de *RANK* (A) y *RANKL* (B) en un panel de 8 líneas celulares. Las gráficas representan el promedio de tres replicas independientes, con barras de error estándar. Se observa que la expresión de *RANK* es favorecida en líneas triple negativo y *HER2+* mientras que *RANKL* no presenta asociación con algún subtipo molecular.

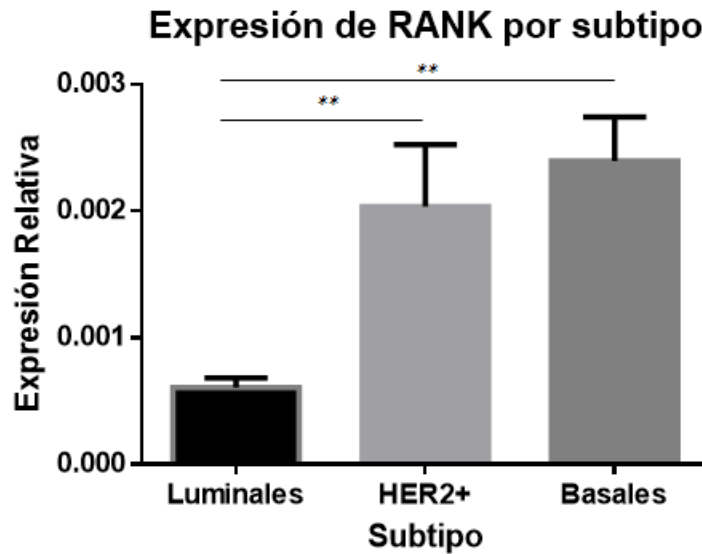


Figura 2: Análisis de asociación entre la expresión de RANK y el subtipo molecular. La gráfica representa una prueba de ANOVA de una vía de los datos de PCR en tiempo real, clasificados por subtipos moleculares ($p < 0.0016$). *RANK* es expresado significativamente más en los subtipos basales (líneas MDA-MB-468, BT-20 y MDA-MB-231) y *HER2+* (SKBR3, MDA-MB-453).

- **El tratamiento con Denosumab disminuye la expresión de marcadores de troncalidad**

Las CTT presentan una firma de expresión particular que les permite mantener su estado indiferenciado pluripotente, estos marcadores (*ALDH1A3*, *ALDH8A1*, *OCT4*, *NANOG*) han sido ampliamente reportados y su expresión puede relacionarse directamente con el fenotipo troncal tumoral. Para determinar si la inhibición farmacológica de *RANKL* afecta la expresión de estos marcadores, se utilizaron células de la línea MDA-MB-468 tratadas con denosumab y células control sin tratamiento. El análisis de la expresión relativa por PCR en tiempo real demuestra una tendencia a la baja de los marcadores *ALDH1A3* y *ALDH8A1* los cuales están asociadas con un fenotipo celular troncal ⁴⁶. En el caso de los genes *OCT4* y *NANOG* se observa un decremento significativo (*figura 3*) en el grupo tratado con Denosumab con respecto al grupo control. *OCT4* ha sido ampliamente identificado como un marcador asociado al fenotipo troncal, especialmente involucrado en la capacidad de autorrenovación ^{47 48 49 50}. *NANOG* se conoce como un gen pluripotente y ha sido ampliamente reportado como marcador de células troncales de cáncer. La presencia de *NANOG* se relaciona directamente con un peor pronóstico y fenotipos de cáncer de mama más agresivos ⁴⁸⁻⁵¹.

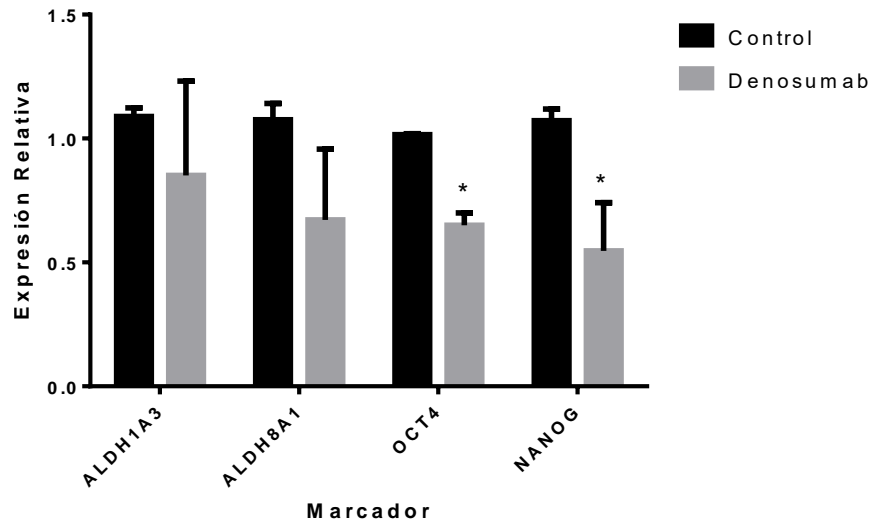


Figura 3: Niveles de expresión relativa de marcadores de troncalidad por PCR en tiempo real en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-468. El grupo tratamiento fue expuesto a Denosumab 24 horas previas a la extracción de RNA total. En el caso de los genes OCT4 y NANOG se muestra una disminución significativa ($p < 0.05$) en los niveles de transcrito. La gráfica presenta el resultado de 3 réplicas biológicas cada una con su duplicado técnico y sometido a una prueba de t-Student.

- **El tratamiento con Denosumab disminuye la población troncal en la línea celular MDA-MB-468:**

Además del uso de marcadores de superficie, la actividad de ALDH ha sido ampliamente identificada en subpoblaciones con fenotipo troncal y representa un método confiable y altamente reportado de identificación de CTT en cáncer de mama. Una de las mayores ventajas presentes en este método de identificación es que la actividad de ALDH muestra una relación directamente proporcional con el porcentaje de CTT^{48,52,53}. La actividad de la enzima ALDH se determinó con base a la capacidad de la enzima para oxidar un aldehído fluorescente no tóxico, la cual fue observada por medio de citometría de flujo. Usando esta técnica

observamos una disminución significativa de la población celular positiva a la actividad metabólica de aldehído deshidrogenasa (figura 4). En general el grupo sometido al tratamiento con Denosumab a una concentración de 1mg/ml durante las 72 horas previas a la citometría, demostró una disminución cercana al 50% de la población celular con actividad de ALDH con respecto al control.

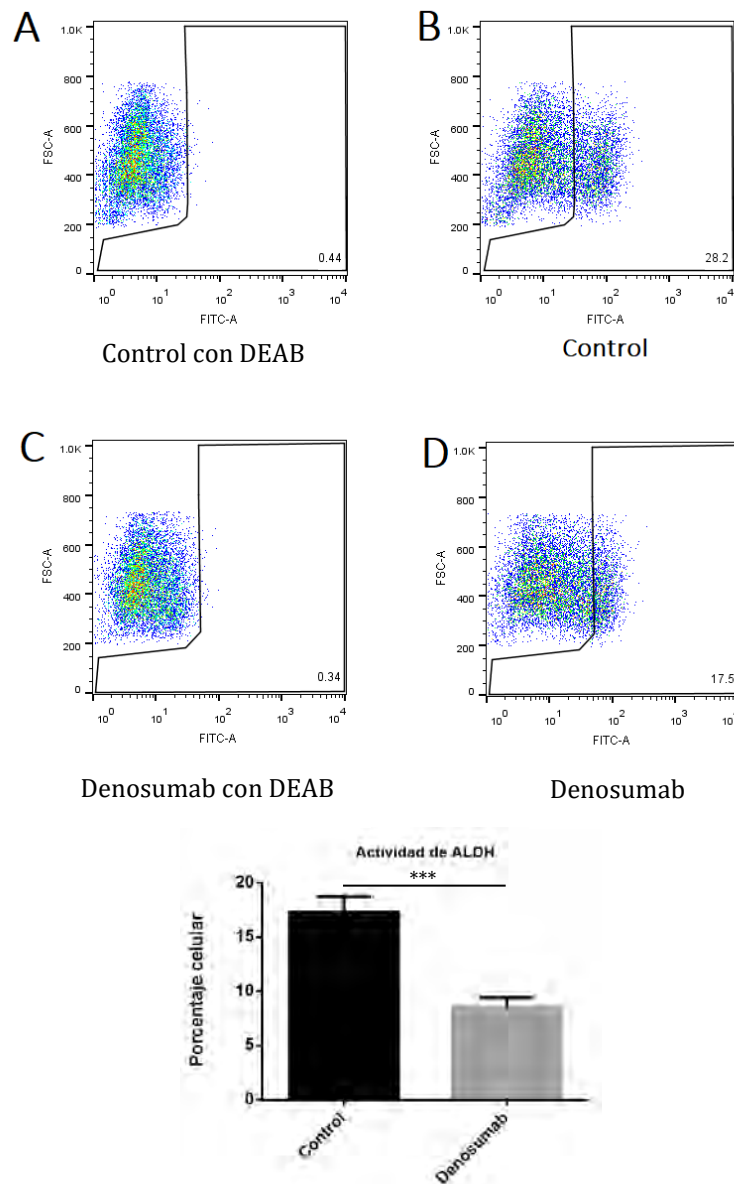


Figura 4: Determinación de la actividad de la enzima ALDH mediante citometría de flujo con el kit ALDEFLOUR: El objetivo de este ensayo es detectar la subpoblación celular con actividad de ALDH, la cual es capaz de transformar el sustrato (aminoacetaldehído) en un producto fluorescente (aminoacetato). La

acumulación intracelular de este producto confiere fluorescencia a las células, la cual es definida mediante citometría de flujo para establecer el punto a partir del cual se determina que las células son ALDH positivas. En los cuadrantes presentados se observa la intensidad de la fluorescencia en el eje de las x, mientras que en el eje de las y podemos ver la medida de dispersión de luz, relacionada al tamaño celular. **A)** se observan las células del grupo control, las cuales fueron tratadas con el reactivo DEAB, el cual es un inhibidor de la enzima ALDH. El uso de este reactivo permite definir fluorescencia basal de las células para establecer el punto del cual estas serán consideradas ALDH positivas. **B)** Observamos las células del grupo control con actividad de ALDH dentro del polígono de detección, el cual fue delimitado por los datos de fluorescencia basal obtenidos en el ensayo previo (a) **C)** El histograma muestra las células tratadas con Denosumab, las cuales fueron incubadas con el inhibidor DEAB al igual que con el control, esta prueba define la fluorescencia basal para el grupo tratamiento. **D)** Histograma del grupo tratamiento con actividad ALDH dentro del polígono de detección. **E)** Porcentaje celular positivo a la actividad de aldehído deshidrogenasa detectado mediante citometría de flujo. En las células expuestas a Denosumab 72 horas antes de la citometría se nota un decremento significativo ($p < 0.0001$). La gráfica representa el conjunto de tres réplicas biológicas por triplicado técnico.

- **La exposición a Denosumab no compromete la viabilidad celular de la línea de cáncer de mama MDA-MB-468:**

Para determinar si Denosumab afecta la viabilidad celular, se expusieron células de la línea MDA-MB-468 a diferentes concentraciones del fármaco a distintos tiempos y fueron analizadas por medio de un ensayo de MTS^{54 34}. Se observa que ni el tiempo, ni la concentración de Denosumab tienen un efecto adverso sobre la viabilidad celular general con respecto a una población control (figura 5). Estos resultados sugieren que la disminución en la población troncal no es mediada por afeción a la viabilidad celular.

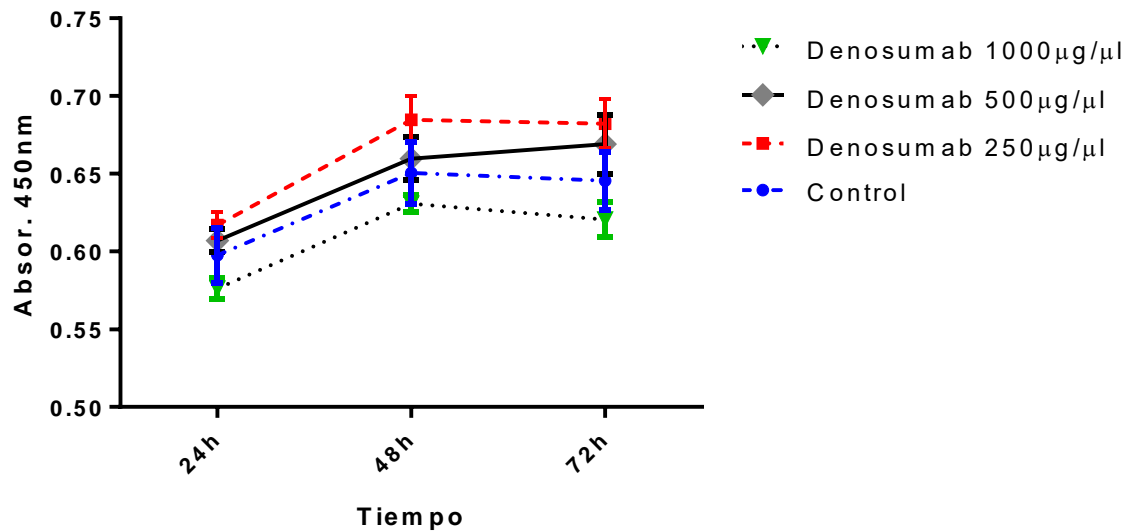


Figura 5 Ensayo de viabilidad celular por medio de MTS: El cambio en la absorbancia de la muestra es directamente proporcional al metabolismo celular. No se observa desviación significativa en el comportamiento de las muestras sin importar la concentración o tiempo de exposición a Denosumab.

- **El tratamiento con Denosumab disminuye la capacidad de migración celular en la línea de cáncer de mama MDA-MB-468.**

La relación entre la capacidad de migración mediada por procesos de transición epitelio mesénquima y el fenotipo troncal de las células de cáncer ha sido ampliamente descrita ^{55 56}. En este ensayo podemos ver una disminución significativa del número de células que migraron a través del *Transwell* en el grupo tratado con Denosumab con respecto a la población control (Figura 6). Las células que migran quedan atrapadas en la matriz porosa del pozo. Estas células son fijadas y teñidas para su conteo. El análisis de los datos demostró que en promedio, se encontraban 38.5% menos células en el grupo tratado con Denosumab con respecto al grupo control.

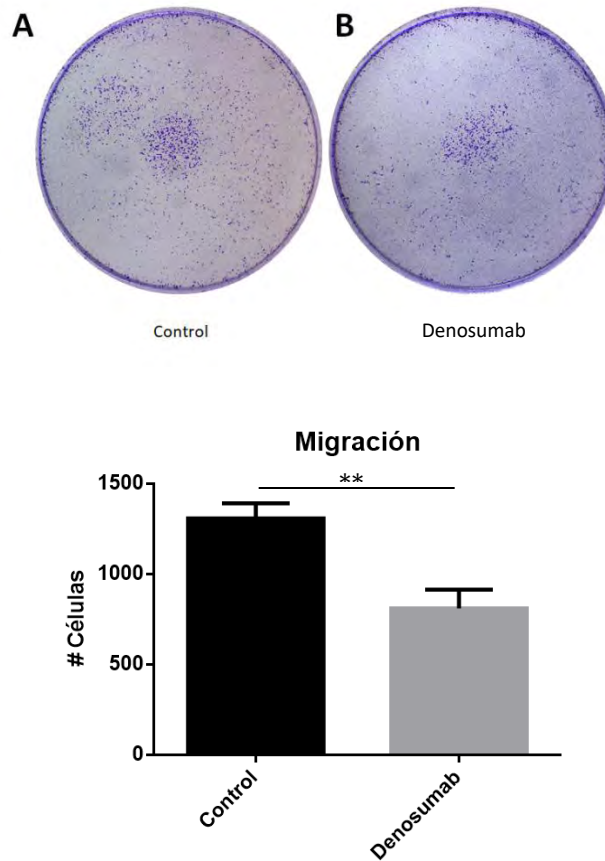


Figura 6 Ensayo de migración celular por *Transwell*: **A)** membrana representativa del grupo control, se observan en morado las células que lograron migrar por la membrana del *transwell* por la quimio atracción del medio suplementado con SFB. **B)** Membrana del grupo tratamiento, se denota una disminución en la proporción de células presentes. **C)** Gráfica representando tres réplicas biológicas por duplicado técnico ($p < 0.001$).

- **Generación de una línea estable GFP positiva:**

Para evaluar la capacidad tumorigénica de la línea celular MDA-MB-468 en un modelo *in vivo* se generó una línea estable GFP positiva mediante la transfección del plásmido pCMV6-AC-GFP (*OriGene*), la cual fue seleccionada por medio de geneticina a una concentración de 0.4ug/μl por 3 semanas. Pasadas las tres semanas se observaron a microscopio óptico y fluorescencia para corroborar la expresión de GFP. Se obtuvieron cultivos celulares donde >90% fueron positivas a la expresión de GFP (Figura 7).

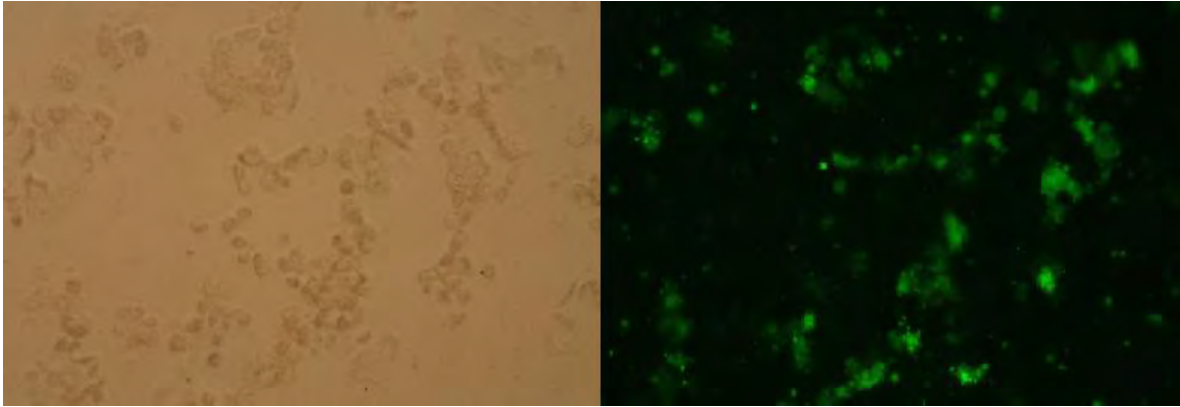


Figura 7 Generación de línea GFP: en el panel izquierdo se observan las células en campo claro a un aumento de 10X. En el panel derecho se observa el mismo campo bajo fluorescencia demostrando la expresión de la proteína verde fluorescente en >90% de las células observadas.

- **Las células previamente tratadas con Denosumab disminuyen su capacidad tumorigénica y metastásica en un modelo *in vivo* de xenotransplante:**

Se evaluó la capacidad tumorigénica de la línea celular MDA-MB-468 mediante tres réplicas biológicas de xenotransplantes en embriones de pez cebra con 48 horas posteriores a la fecundación. Los resultados demuestran que las células de la línea MDA-MB-468 tratadas con Denosumab, muestran una menor capacidad tumorigénica, ya que en este grupo se detectaron tumores en menor proporción en comparación con el grupo control, el cual presentaba hasta 2.5 veces más tumores que el grupo tratamiento. De manera interesante, los tumores formados en el grupo tratado tuvieron un menor volumen que los presentes en el grupo control. El número de tumores por población fue analizado mediante un ensayo de *ELDA* (ensayo de dilución limitante extremo por sus siglas en inglés) con el fin de calcular el posible número de células troncales de cáncer en cada población,

demostrando que en la población control se encuentra una CTC por cada 1196 células presentes, mientras que en el grupo tratado existe una CTC por cada 3097 células ($p < 0.005$). Otro fenómeno a denotar es que las células tratadas permanecieron en el vitelo o en estructuras muy cercanas a este, mientras que, las células de control tenían la capacidad de migrar e invadir tejidos distantes como la cola del embrión (Figuras 8-9).

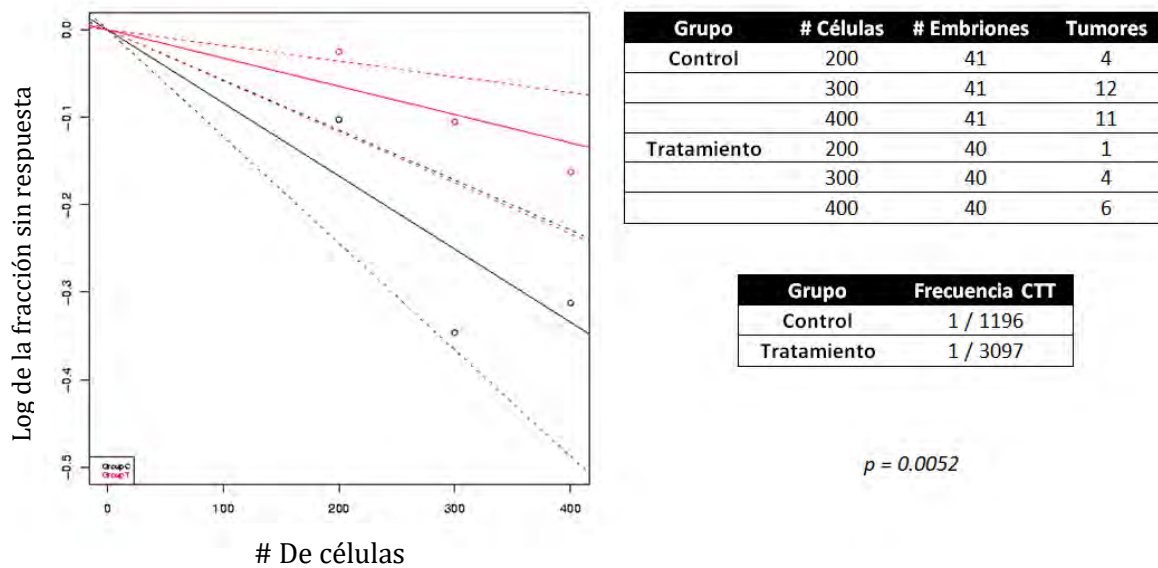


Figura 8 Resultados de ELDA: La gráfica representa el número de células inyectadas por embrión (en el eje de las x) contra el logaritmo de la fracción celular sin respuesta (eje de las y). Esto se puede traducir como la frecuencia en la que aparece una célula troncal en cada población, la cual es 2.5 veces mayor en el grupo control que en el grupo sometido a tratamiento con Denosumab. La tabla superior indica la cantidad de células de la línea MDA-MB-468 inyectadas en el número de embriones indicados, así como, la cantidad de tumores formados bajo cada condición (control vs tratamiento). La tabla inferior muestra la frecuencia de ocurrencia de las células troncales en las poblaciones control y tratamiento.

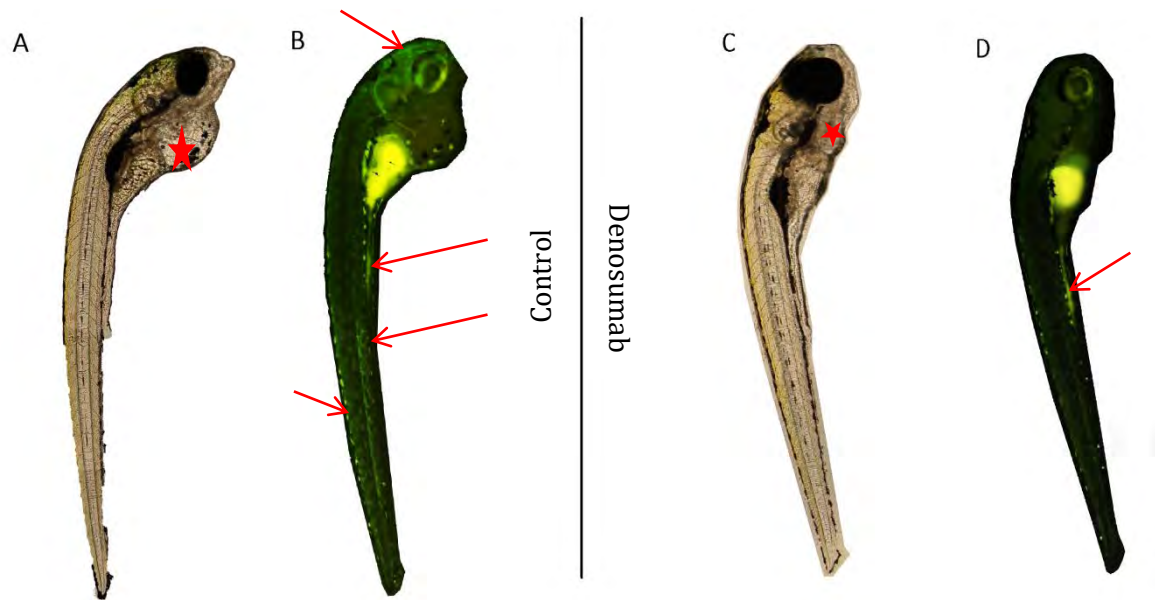


Figura 9 Ensayo de migración, invasión y tumorigénesis en pez cebra: Del lado izquierdo de la línea negra se observa un embrión de pez cebra 5 días después del xenotransplante bajo campo claro (A) y bajo fluorescencia (B). La estrella roja marca el tumor mientras que las flechas rojas señalan células MDA-MB-468 marcadas con GFP las cuales han invadido casi toda la longitud de la cola del embrión, así como la región cefálica. Del lado derecho de la línea observamos un embrión de pez cebra de 5 días transplantado con células previamente tratadas con Denosumab. En el campo claro (C) observamos un tumor de mucho menor tamaño comparado contra el control (estrellas rojas) y bajo fluorescencia (D) observamos que las células inyectadas se mantienen juntas y cercanas al sitio de inyección original, no se observa invasión a otros tejidos.

Discusión

La expresión de *RANK* y *RANKL* ha sido demostrada en diversos tipos de cáncer (ovario, mama, próstata, pulmón) y siempre es un factor pronóstico negativo ya que está asociado a una mayor tasa de recurrencia, metástasis, resistencia a la quimioterapia y en general a una supervivencia menor ⁵⁷⁻⁵⁹. En el cáncer de mama, la expresión particular de *RANK* ha sido asociada de forma directa con un fenotipo más agresivo, resistente al tratamiento y con una firma de genes desregulados característica del subtipo basal ⁴⁴. De forma interesante, el análisis

de expresión de *RANK* por medio de qPCR presentado en este trabajo parece confirmar esta asociación, favoreciendo especialmente a la línea MDA-MB-468 clasificada dentro del subtipo basal. Con respecto al ligando *RANKL* estudios anteriores sugerían la posibilidad de que *RANKL* era suministrado exclusivamente por células del nicho estromal del tejido sano, sin embargo, el análisis por qPCR de este trabajo detectó el mRNA de *RANKL* en células tumorales de todos los subtipos de cáncer de mama, sin demostrar evidencia que asociara la expresión de *RANKL* con algún subtipo molecular.

La activación de la vía no canónica de NF- κ B mediante la unión de *RANK/RANKL* es un proceso presente en todas las etapas del desarrollo de cáncer de mama⁵⁹⁻⁶¹ y el uso de terapias específicas contra esta ruta de señalización han demostrado tener un gran efecto anti tumoral y anti metastásico gracias a la disminución en la población troncal de las células cancerígenas,^{44,60,62} las cuales se proponen son la única subpoblación tumoral capaz de recrear la heterogeneidad tumoral en su totalidad o capaces de formar metástasis^{37,38}. Hasta la fecha diversos estudios corroboran la hipótesis de las CTT como responsables directas de la formación de metástasis ya que, han demostrado que la sobre-expresión de *RANK* en células del epitelio mamario conlleva a la adquisición de un fenotipo troncal. Así mismo, el incremento en el nivel del mRNA de los genes *RANK/RANKL* se correlación directamente con la formación de metástasis^{63,64}.

El papel del eje *RANK/RANKL* en el desarrollo primario del cáncer de mama lo posiciona como un blanco específico para terapias preventivas⁶¹. Estudios

recientes han demostrado que la aplicación preventiva de Denosumab en pacientes con mutaciones en los genes *BRCA1/2* disminuye significativamente el riesgo en el desarrollo de cáncer de mama^{13,44,65}. Este hecho ha sido explicado por el efecto que tiene sobre las propiedades de auto renovación y pluripotencia de las células troncales tumorales. Genes específicos como *NANOG* y *OCT4* son necesarios para mantener un estado indiferenciado en las células troncales permitiéndoles conservar las características necesarias para generar la heterogeneidad tumoral⁶⁶⁻⁶⁸. Palafox y colaboradores demostraron la correlación entre el fenotipo troncal en cáncer de mama mediante la sobre expresión de *RANK* y el aumento en el nivel de los mRNA de *OCT4* y *NANOG*, en concordancia con esto, este trabajo demostró que la inhibición de *RANK/RANKL* disminuye significativamente el nivel de los mRNA tanto de *OCT4* como de *NANOG*. El mecanismo por el cual esto sucede, aún permanece desconocido, sin embargo, se ha demostrado que *RANK/RANKL* induce la vía NF- κ B, la cual ha sido descrita como reguladora de genes de pluripotencia .

Otra forma de explorar el papel de *RANK/RANKL* sobre el fenotipo troncal de las células tumorales es mediante la actividad de enzimas como las de la familia ALDH, las cuales han sido ampliamente reportadas en poblaciones de CTT y células troncales del estroma. Wicha y colaboradores demostró que las células que expresaban ALDH eran capaces de sobrevivir a la quimioterapia y que su existencia se relacionaba a un peor pronóstico y menor supervivencia⁶⁹⁻⁷¹. Como se puede apreciar en los resultados de este trabajo, la inhibición de *RANK/RANKL* mediante el uso de Denosumab redujo la población celular positiva a la actividad

de ALDH observada por citometría de flujo, lo cual infiere una disminución de la población de CTT en coherencia con la disminución de marcadores de pluripotencia observado por qPCR.

Para entender el mecanismo por el cual la población de CTT disminuye tras la exposición a Denosumab, se realizaron estudios de viabilidad celular. Los resultados obtenidos reflejan que el tratamiento con Denosumab en diferentes concentraciones (0.25mg/ml, 0.5mg/ml y 1mg/ml) no afecta la viabilidad celular de la línea de cáncer de mama MDA-MB-468 con respecto a un control para el tratamiento. Este resultado sugiere indicar que la población de CTT no es destruida, más bien, el fenotipo troncal parecería perderse a favor de uno con mayor grado de diferenciación y con un potencial proliferativo menor con respecto a las CTT como lo ha reportado Yoldi y colaboradores⁷².

La relación entre la activación de RANK/RANKL con respecto a la migración celular y su capacidad de metástasis ha sido descrita por el efecto positivo que tiene esta vía sobre la TEM y la neo vascularización, las cuales son características cercanamente relacionadas a los *hallmarks* necesarios para el desarrollo del cáncer^{59,73}. En un estudio más dirigido a la vía RANK/RANKL, Jones y colaboradores demostró que la activación de la vía aumentaba el proceso de migración en células de cáncer de mama⁷⁴. Los resultados de este trabajo corroboran este hecho, dado que, la inhibición de RANKL mediante Denosumab disminuyó la migración celular en ensayos *in vitro*.

Este trabajo demostró una correlación directa entre la inhibición farmacológica RANKL por medio del anticuerpo monoclonal Denosumab y la disminución en el fenotipo troncal de las células de la línea triple negativo MDA-MB-468 mediante el uso de metodologías previamente establecidas para la detección de células troncales ^{48,52,53}.

Conclusión

En este trabajo se ha demostrado los siguientes hallazgos:

1. La expresión de RANK presenta una asociación con los subtipos moleculares basales y *HER2+*.
2. La expresión del ligando RANKL no está asociada a ningún subtipo molecular, pero es expresado por todas las líneas celulares de cáncer de mama presentes en este estudio, demostrando independencia de las células estromales del tejido sano de mama para la activación de la vía RANK/RANKL.
3. El tratamiento con Denosumab no afecta la viabilidad celular de la línea MDA-MB-468 de cáncer de mama en ninguna de las concentraciones reportadas.
4. El tratamiento con Denosumab afecta negativamente la expresión de marcadores de troncalidad, pluripotencia y auto renovación en la línea de cáncer de mama MDA-MB-468.

5. La capacidad de migración de las células MDA-MB-468 tratadas con Denosumab se vio afectada negativamente en ensayos *in vivo* e *in vitro*. La regulación de la vía de NF- κ B por medio de RANK/RANKL es un blanco terapéutico importante que abre las puertas a una nueva terapia dirigida contra las complicaciones más comunes y peligrosas del cáncer de mama como lo son las metástasis y recurrencias. Además de ser una vía terapéutica preventiva en pacientes con riesgo de desarrollar cáncer de mama evitando así procedimientos invasivos y radicales.

Perspectivas

Los resultados de este trabajo demostraron la eficacia de Denosumab para disminuir la expresión de marcadores de troncalidad en las células tumorales de la línea MDA-MB-468, sin embargo, el mecanismo molecular específico por el cual esto es logrado permanece poco claro. Ampliar el conocimiento sobre este mecanismo podría aportar conocimiento relevante sobre posibles ventajas o complicaciones de su uso en pacientes.

En este estudio se realizaron xenotransplantes en pez cebra (*Danio rerio*) como un modelo biológico por las ventajas que este organismo presenta como lo son: la transparencia que permite la visualización de la migración celular y la observación directa del tumor y la velocidad de desarrollo de los organismos. Sin embargo, implementar los xenotransplantes en mamíferos (*Mus musculus*) podría ofrecer

mayor información sobre el efecto de Denosumab a las concentraciones terapéuticas mostradas en este estudio en el tejido mamario sano; así como corroborar los resultados obtenidos.

La concentración terapéutica presentada en este estudio (1mg/ml) fue determinada en cultivos celulares en monocapa, donde la disponibilidad del fármaco no se ve afectada por microambientes o estructuras celulares en tres dimensiones, por lo tanto, estudiar el método de entrega del fármaco en un modelo *in vivo* y la concentración media en sangre es fundamental para un futuro uso terapéutico.

Finalmente se propone estudiar la interacción de Denosumab con agentes quimioterapéuticos para su aplicación conjunta en pacientes. La unión de la quimioterapia dirigida a la reducción total de la población tumoral en conjunto con Denosumab dirigido a la población troncal tumoral podría presentar un mejor resultado limitando las posibles recaídas.

BIBLIOGRAFIA

1. Albuquerque, R. C. R., Baltar, V. T. & Marchioni, D. M. L. Breast cancer and dietary patterns: A systematic review. *Nutr. Rev.* **72**, 1–17 (2014).
2. Manuscript, A. NIH Public Access. *Inflammation* **432**, 332–337 (2011).
3. Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A. & Moses, H. L. TGF- β signaling deficient fibroblasts enhance Hepatocyte Growth Factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol. Cancer Res.* **6**, 1521–1533 (2008).
4. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. *Hallmarks of cancer: The next generation.* *Cell* **144**, 646–674 (2011).
5. Shay, J. W. & Wright, W. E. Hayflick, His Limit, and Cellular Ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 72–76 (2000).
6. Lowe, S. W., Cepero, E. & Evan, G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**, 307–315 (2004).
7. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**, 1324–1337 (2007).
8. Blasco, M. A. Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 611–622 (2005).
9. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 789–791 (2009).
10. Editor, G. & Shen, Z. Genomic instability and cancer : an introduction. 1–3 (2011). doi:10.1093/jmcb/mjq057
11. Negrini, S., Gorgoulis, V. G. & Halazonetis, T. D. Genomic instability an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 220–228 (2010).
12. Elstrodt, F. y colaboradores. BRCA1 mutation analysis of 41 human breast cancer cell lines reveals three new deleterious mutants. *Cancer Res.* **66**, 41–45 (2006).
13. Cuyàs, E. y colaboradores. BRCA1 haploinsufficiency cell-autonomously activates RANKL expression and generates denosumab-responsive breast cancer-initiating cells. *Oncotarget* **5**, 35019–35032 (2017).
14. Dvorak, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.* **315**, 1650–9 (1986).
15. Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, Inflammation, and

- Cancer. *Cell* **140**, 883–899 (2010).
16. DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. & Thompson, C. B. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab.* **7**, 11–20 (2008).
 17. Jones, R. G. & Thompson, C. B. Tumor suppressors and cell metabolism: A recipe for cancer growth. *Genes Dev.* **23**, 537–548 (2009).
 18. Vajdic, C. M. & Van Leeuwen, M. T. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int. J. Cancer* **125**, 1747–1754 (2009).
 19. Kim, R. Cancer Immunoediting: From Immune Surveillance to Immune Escape. *Cancer Immunother.* 9–27 (2007). doi:10.1016/B978-012372551-6/50066-3
 20. Teng, M. W. L., Swann, J. B., Koebel, C. M., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 988–993 (2008).
 21. Ferlay, J. y colaboradores. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **136**, E359-386 (2015).
 22. Rakha, E. A., El-Sayed, M. E., Reis-Filho, J. & Ellis, I. O. Patho-biological aspects of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **113**, 411–422 (2009).
 23. Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H. & Band, V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol. Ther.* **10**, 955–960 (2010).
 24. Caldas, C. & Stingl, J. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 791–9 (2007).
 25. Bevers, T. B. y colaboradores. Breast Cancer Screening and Diagnosis. *J. Natl. Cancer Inst.* **7**, 1060–1096 (2009).
 26. Al-Ejeh, F. y colaboradores. Breast cancer stem cells: Treatment resistance and therapeutic opportunities. *Carcinogenesis* **32**, 650–658 (2011).
 27. Lumachi, F., Brunello, A., Maruzzo, M., Basso, U. & Basso, S. Treatment of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Curr. Med. Chem.* **20**, 596–604 (2013).
 28. Dieci, M. V., Arnedos, M., Delaloge, S. & Andre, F. Quantification of residual risk of relapse in breast cancer patients optimally treated. *Breast* **22**, S92–S95 (2013).

29. Zhou, P. y colaboradores. Clinicopathological characteristics of patients with HER2-positive breast cancer and the efficacy of trastuzumab in the People's Republic of China. *Onco. Targets. Ther.* 2287 (2016). doi:10.2147/OTT.S97583
30. Mitri, Z., Constantine, T. & O'Regan, R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother. Res. Pract.* **2012**, 1–7 (2012).
31. Dai, X. y colaboradores. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res* **5**, 2929–2943 (2015).
32. Prat, A. y colaboradores. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **12**, (2010).
33. Yersal, O. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J. Clin. Oncol.* **5**, 412 (2014).
34. Herschkowitz, J. I. y colaboradores. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* **8**, 1–17 (2007).
35. Dias, K. y colaboradores. Claudin-low breast cancer; clinical & pathological characteristics. *PLoS One* **12**, 1–17 (2017).
36. Doherty, M. R., Smigiel, J. M., Junk, D. J. & Jackson, M. W. Cancer stem cell plasticity drives therapeutic resistance. *Cancers (Basel)*. **8**, 1–13 (2016).
37. Beck, B. & Blanpain, C. Unravelling cancer stem cell potential. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 727–738 (2013).
38. Jordan, C. T., Guzman, M. L. & Noble, M. Cancer Stem Cells. *N Engl J Med* **355**, 1253–61 (2006).
39. O'Flaherty, J. D. y colaboradores. The cancer stem-cell hypothesis: Its emerging role in lung cancer biology and its relevance for future therapy. *J. Thorac. Oncol.* **7**, 1880–1890 (2012).
40. Chi, L. y colaboradores. TIMELESS contributes to the progression of breast cancer through activation of MYC. *Breast Cancer Res.* **19**, 1–10 (2017).
41. Rinkenbaugh, A. L. & Baldwin, A. S. The NF- κ B Pathway and Cancer Stem Cells. (2016). doi:10.3390/cells5020016
42. Boyce, B. F., Xiu, Y., Li, J., Xing, L. & Yao, Z. NF- κ B-Mediated Regulation of Osteoclastogenesis. *Endocrinol. Metab.* **30**, 35 (2015).

43. Rao, S., Cronin, S. J. F., Sigl, V. & Penninger, J. M. RANKL and RANK: From Mammalian Physiology to Cancer Treatment. *Trends Cell Biol.* 1–11 (2017). doi:10.1016/j.tcb.2017.11.001
44. Nolan, E. *y colaboradores*. RANK ligand as a potential target for breast cancer prevention in BRCA1-mutation carriers. *Nat. Med.* **22**, 933–9 (2016).
45. Hu, Y. & Smyth, G. K. ELDA: Extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J. Immunol. Methods* **347**, 70–78 (2009).
46. Rock, L. & Therapeutics, C. C. Human Placenta-Derived Adherent Cells Prevent Bone loss , Myeloma in Bone. *Bioscience* 263–273 (2011). doi:10.1002/2010
47. Kar, S. & Patra, S. K. Overexpression of OCT4 induced by modulation of histone marks plays crucial role in breast cancer progression. *Gene* **643**, 35–45 (2018).
48. Moghbeli, M., Moghbeli, F., Forghanifard, M. M. ahd. & Abbaszadegan, M. R. ez. Cancer stem cell detection and isolation. *Med. Oncol.* **31**, 69 (2014).
49. Vazquez-Santillan, K. *y colaboradores*. NF-kappa B-inducing kinase regulates stem cell phenotype in breast cancer. *Sci. Rep.* **6**, 1–17 (2016).
50. Thomas, D. *y colaboradores*. Increased cancer stem cell invasion is mediated by myosin IIB and nuclear translocation. *Oncotarget* **7**, 47586–47592 (2014).
51. Li, X. *y colaboradores*. Sonic hedgehog and Wnt/ β -catenin pathways mediate curcumin inhibition of breast cancer stem cells. *Anticancer. Drugs* **29**, 208–215 (2018).
52. ZHENGWEI, L. *y colaboradores*. A reliable method for the sorting and identification of ALDHhigh cancer stem cells by flow cytometry. *Exp. Ther. Med.* **14**, 2801–2808 (2017).
53. Huang, E. H. *y colaboradores*. NIH Public Access. **69**, 3382–3389 (2010).
54. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
55. Kong, L., Guo, S., Liu, C. & Zhao, Y. Overexpression of SDF-1 activates the NF- κ B pathway to induce epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes of breast cancer cells. 1085–1094 (2016). doi:10.3892/ijo.2016.3343

56. Shan, S. *y colaboradores*. Wnt/ β -catenin pathway is required for epithelial to mesenchymal transition in CXCL12 over expressed breast cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol* **8**, 12357–12367 (2015).
57. Zhang, L. *y colaboradores*. Receptor activator for nuclear factor κ B expression predicts poor prognosis in breast cancer patients with bone metastasis but not in patients with visceral metastasis. *J. Clin. Pathol.* **65**, 36–40 (2012).
58. Pfitzner, B. M. *y colaboradores*. RANK expression as a prognostic and predictive marker in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **145**, 307–315 (2014).
59. Renema, N., Navet, B., Heymann, M.-F., Lezot, F. & Heymann, D. RANK-RANKL signalling in cancer. *Biosci. Rep.* **36**, e00366–e00366 (2016).
60. Sisay, M., Mengistu, G. & Edessa, D. The RANK/RANKL/OPG system in tumorigenesis and metastasis of cancer stem cell: Potential targets for anticancer therapy. *Onco. Targets. Ther.* **10**, 3801–3810 (2017).
61. de Groot, A. F., Appelman-Dijkstra, N. M., van der Burg, S. H. & Kroep, J. R. The anti-tumor effect of RANKL inhibition in malignant solid tumors – A systematic review. *Cancer Treat. Rev.* **62**, 18–28 (2018).
62. Sigl, V., Jones, L. P. & Penninger, J. M. RANKL/RANK: from bone loss to the prevention of breast cancer. *Open Biol.* **6**, 160230 (2016).
63. Palafox, M. *y colaboradores*. RANK induces epithelial-mesenchymal transition and stemness in human mammary epithelial cells and promotes tumorigenesis and metastasis. *Cancer Res.* **72**, 2879–2888 (2012).
64. González-Suárez, E. & Sanz-Moreno, A. RANK as a therapeutic target in cancer. *FEBS J.* **283**, 2018–2033 (2016).
65. Sigl, V. *y colaboradores*. RANKL/RANK control Brca1 mutation-driven mammary tumors. *Cell Res.* **26**, 761–774 (2016).
66. Niwa, H., Miyazaki, J. & Smith, A. G. Quantitative expression of OCT3 / 4 defines differentiation , dedifferentiation or self-renewal of ES cells . Nat . Quantitative expression of Oct-3 / 4 defines differentiation , dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* **24**, 2–6 (2016).
67. Masui, S. *y colaboradores*. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 625–635 (2007).
68. He, S., Nakada, D. & Morrison, S. J. Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **25**, 377–406 (2009).

69. Neumeister, V. & Rimm, D. Is ALDH1 a good method for definition of breast cancer stem cells? *Breast Cancer Res. Treat.* **123**, 109–111 (2010).
70. Resetkova, E. y colaboradores. Prognostic impact of ALDH1 in breast cancer: A story of stem cells and tumor microenvironment. *Breast Cancer Res. Treat.* **123**, 97–108 (2010).
71. Liu, S. y colaboradores. BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 1680–5 (2008).
72. Yoldi, G. y colaboradores. RANK signaling blockade reduces breast cancer recurrence by inducing tumor cell differentiation. *Cancer Res.* **76**, 5857–5869 (2016).
73. Gonzalez-Suarez, E. y colaboradores. RANK ligand mediates progestin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. *Nature* **468**, 103–107 (2010).
74. Jones, D. H. y colaboradores. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* **440**, 692–696 (2006).