



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE RANKL
EN LA REGULACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES
TUMORALES DE CÁNCER DE MAMA EN LA LÍNEA
CELULAR MCF7**

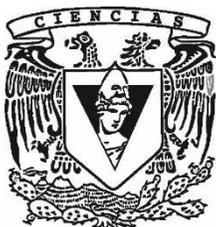
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ALEJANDRO ORDAZ RAMOS



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. KARLA ITZEL VÁZQUEZ SANTILLÁN
CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX.
CIUDAD DE MÉXICO, 2018**



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.

1. Datos del alumno

Ordaz
Ramos
Alejandro
5565363734
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
311117060

2. Datos del tutor

Dra.
Karla Itzel
Vázquez
Santillán

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Patricia
García
López

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Marina
Macías
Silva

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Bertha
Molina
Alvarez

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Gisela
Ceballos
Cancino

7. Datos del trabajo escrito

Efecto de la inhibición farmacológica de RANKL en la regulación de células troncales tumorales de
cáncer de mama en la línea celular MCF7

62 p
2018

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mi mamá, mi papá y mi abuelita por brindarme el apoyo y los recursos a lo largo de toda la carrera y toda mi vida. Muchas gracias por todas sus enseñanzas y consejos dados. Los amo.

Agradezco a la universidad, a mi querida Facultad de Ciencias por todos los aprendizajes y momentos vividos ahí. Agradezco a todos los buenos amigos que conocí durante toda la carrera, especialmente a los “perritos” (Caro, Rodri, Lucero, Diana, Andy, Diego y los que faltan...) por ser tan malditos y adorables, gracias por todo su cariño, apoyo y amistad.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Epigenética del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) bajo la tutoría de la Dra. Karla Itzel Vázquez Santillán. Karla, muchas gracias por todas las oportunidades que me brindaste, tus enseñanzas, tu esfuerzo y paciencia durante la realización del proyecto. Además agradezco tu amistad y todos esos divertidos y buenos momentos pasados en el instituto.

También agradezco a la Dra. Vilma Maldonado Lagunas por permitirme formar parte de su grupo de investigación y facilitarme las instalaciones y equipos de su laboratorio.

Agradezco a la Dra. Cecilia Zampedri por mostrarme y facilitarme el uso de pez cebra para algunos experimentos.

Agradezco también al Dr. Jorge Meléndez Zajgla por aceptarme en el grupo de Taller de “Bases Moleculares de la Medicina Genómica y sus Aplicaciones” y facilitarme la beca de “Ayudante de investigador SNI III” que me sustentó durante la estancia de investigación.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio por los momentos pasados. Agradecimientos especiales para Jorge, Rosario, Víctor, Marcela, Miguel y Karla (de nuevo jaja) por todos esos buenos momentos, chismes y comidas vividos durante este tiempo. Jorge, aunque me hagas bullying y me digas que me odias ¡te quiero amigo! ♥

Finamente, agradezco a mi comité sinodal por el tiempo y las correcciones brindadas en la tesis.

Esto apenas es el comienzo de todo...

Los quiere, Alex. 😊

Contenido

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	3
II.I	DEFINICIÓN DE CÁNCER	3
II.II	DEFINICIÓN DE CÁNCER DE MAMA	6
II.III	CÉLULAS TRONCALES TUMORALES (CTT)	10
II.IV	VÍA DE SEÑALIZACIÓN NF- κ B.....	14
II.V	RANK/RANKL	17
II.VI	RANK/RANKL EN CÁNCER DE MAMA	19
II.VII	TERAPIAS DIRIGIDAS HACIA CTT.....	21
III.	JUSTIFICACIÓN.....	23
IV.	HIPÓTESIS.....	24
V.	OBJETIVO GENERAL.....	24
VI.	OBJETIVOS PARTICULARES	24
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
	Cultivo Celular	25
	Tratamiento con Denosumab	25
	RT-PCR y PCR en tiempo real (qPCR).....	25
	Citometría de Flujo.....	26
	Ensayos de Migración en cámaras de Boyden	27
	Ensayo de viabilidad celular (MTS).....	27
	Ensayos de formación de mamosferas	27
	Xenotransplantes en pez cebra (Danio rerio)	28
	Análisis Estadístico	29
VIII.	RESULTADOS	29
IX.	DISCUSIÓN.....	41
X.	CONCLUSIÓN	47
XI.	PERSPECTIVAS	48
XII.	REFERENCIAS.....	50

ABREVIATURAS IMPORTANTES

ALDH	Aldehído Deshidrogenasa
ATCC	American Type Culture Collection
CD24	Grupo de diferenciación 24
CD44	Grupo de diferenciación 44
CTT	Células Troncales Tumorales
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELDA	Ensayo de Dilución Limitada Extrema
EMT	Transición Epitelio-Mesénquima
FITC	Isotiocinato de fluoresceína
IgG	Inmunoglobulina G
NF-κb	Factor Nuclear κ B
OCT4	Octamer-binding transcription factor 4
PBS	Buffer fosfato salino
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldehído
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
RANK	Receptor Activador del Factor Nuclear κ B
RANKL	Ligando del Receptor Activador del Factor Nuclear κ B
RNA	Ácido ribonucléico
SFB	Suero Fetal Bobino
TBP	Proteína de Unión a TATA
Tm	Temperatura de Fusión
TNF	Factor de Necrosis Tumoral

I. RESUMEN

Introducción: En los tumores existe una subpoblación de células troncales tumorales (CTT) con la habilidad de auto-renovarse y/o diferenciarse a células tumorales maduras. Las CTT son las responsables de la iniciación, progresión, recurrencia y resistencia tumoral. Estas células son reguladas por diferentes vías de señalización como la vía de NF- κ B, la cual participa en el mantenimiento y auto-renovación de la población troncal de cáncer. El Receptor Activador del Factor Nuclear κ B (RANK) al interactuar con su ligando RANKL activa la vía de señalización NF- κ B y promueve la inducción y mantenimiento del fenotipo troncal. Estudios recientes muestran que la inhibición de RANK/RANKL afecta la capacidad de las CTT para auto-renovarse e induce la diferenciación de la población troncal. Con el descubrimiento de las células troncales tumorales se ha planteado el uso de fármacos específicos para eliminar esta población de células y así erradicar el tumor de manera más eficiente. Actualmente existe un anticuerpo monoclonal anti-RANKL (Denosumab), utilizado para el tratamiento de osteoporosis. La efectividad de Denosumab para reducir la población troncal en los tumores aún no ha sido explorada. **Objetivo:** El presente trabajo pretende analizar el efecto de la inhibición farmacológica de RANKL a través de Denosumab y evaluar su potencial para erradicar la población de CTT de la línea celular MCF7. **Metodología:** Para impedir la unión de RANKL a su receptor se utilizó el anticuerpo monoclonal Denosumab en la línea celular MCF7. Las células fueron tratadas con Denosumab a una concentración de 1mg/ml. Para evaluar el efecto de Denosumab en la población troncal, se analizó la subpoblación de CTT ($CD44^+$, $CD24^{-/bajo}$) por medio de citometría de flujo y se evaluó la expresión de marcadores de troncalidad (NANOG, OCT4, ALDH1A3, ALDH8A1) de células

MCF7 tratadas con o sin fármaco. Posteriormente se realizaron ensayos funcionales para determinar la capacidad de las CTT para auto-renovarse en presencia o ausencia del fármaco. La capacidad clonogénica y de auto-renovación se evaluó mediante ensayos de formación de mamíferas. La capacidad de migración se evaluó mediante ensayos de cámaras de Boyden y la viabilidad celular se evaluó mediante la técnica de MTS. Finalmente, se realizaron xenotransplantes en un modelo *in vivo* de pez cebra y mediante ensayos de dilución limitada se analizó la frecuencia de la población troncal y el potencial tumorigénico de las células. **Resultados:** Los resultados indican que la inhibición de RANKL mediante el uso de Denosumab, disminuye la expresión de los marcadores pluripotentes NANOG, OCT4, y ALDH1A3 correlacionando con una disminución de la población troncal $CD44^+$, $CD24^{-/bajo}$ y de la actividad auto-renovativa y de formación de mamíferas. El tratamiento con Denosumab también disminuyó la capacidad de migración celular, sin embargo, se observó un ligero aumento en la viabilidad celular tras 48h de tratamiento. Finalmente, ensayos *in vivo* de dilución limitada en pez cebra indican que Denosumab es capaz de disminuir drásticamente la población de CTT y el potencial tumorigénico de las células. **Conclusión:** En conjunto estos resultados prueban la función de Denosumab en la regulación de la población de CTT de cáncer de mama mediante ensayos funcionales y ensayos *in vivo*. Estos resultados muestran el potencial uso de Denosumab como terapia para disminuir la población de CTT en tumores mamarios.

II. INTRODUCCIÓN

II.I DEFINICIÓN DE CÁNCER

El cáncer es un grupo de enfermedades que se caracterizan por la proliferación desregulada de las células y su posible invasión a sitios distantes en el organismo ¹. Hasta ahora se han clasificado cerca de 100 tipos de cáncer los cuales comparten rasgos distintivos de esta patología.

Hanahan y Weinberg describieron un conjunto de características las cuales están presentes en la mayoría de las neoplasias². Este grupo de atributos son llamados los “Hallmarks del Cáncer” y consisten en diez características adquiridas por las células al desarrollar un fenotipo agresivo en los diferentes estados de progresión de la enfermedad (Figura 1).

Ellos proponen que las células cancerosas suelen presentar:

- *Proliferación sostenida* al desregular señales maestras de crecimiento, permitiendo la progresión en el ciclo y crecimiento celular.
- *Evasión de señales supresoras de crecimiento* al adquirir la capacidad de ignorar señales que evitan la proliferación.
- *Resistencia a la muerte celular* al ignorar señales que favorecen la activación de muerte celular vía Apoptosis y mantener activas señales anti-apoptóticas.
- *Immortalidad replicativa* al evitar la senescencia celular y la fase de crisis que en conjunto conllevan a un estado no proliferativo y muerte celular.

- *Inducción de angiogénesis* al estimular a las células endoteliales vasculares a desarrollar vasos sanguíneos en el tumor, obteniendo niveles de oxígeno y nutrientes necesarios para su supervivencia.
- *Activación de Invasión y Metástasis* al adquirir la capacidad de degradar e invadir tejidos adyacentes al tumor, migrar y establecerse en sitios distantes del organismo.
- *Reprogramación de la energía metabólica* debido a que aún en presencia de oxígeno, las células pueden reprogramar su metabolismo energético hacia glucólisis anaerobia. Este proceso se ve acentuado cuando el microambiente tumoral genera condiciones hipóxicas, permitiéndole a las células sobrevivir en condiciones de estrés oxigénico.
- *Evasión de la destrucción inmune* al evitar ser detectadas y eliminadas por el sistema inmune, a través del reclutamiento de células propias del sistema inmune con actividad inmunosupresora.
- *Inestabilidad genómica* al perder la capacidad de censar y reparar daño al DNA incrementando así la sensibilidad a agentes mutágenos.
- *Promoción de inflamación tumoral* al reclutar células del sistema inmune que mantienen una inflamación persistente en el microambiente permitiendo la biodisponibilidad de moléculas como factores de crecimiento, señales de supervivencia, factores pro-angiogénicos, enzimas que modifican la matriz extracelular y señales inductoras de Transición Epitelio-Mesénquima (EMT), favoreciendo la progresión tumoral.

Estas diez características de las células al actuar en conjunto, le permiten a la enfermedad adquirir un fenotipo agresivo, el cual está relacionado con la resistencia a los fármacos antineoplásicos, alta capacidad de metástasis a sitios distantes del organismo y regresión de la enfermedad post-tratamiento.



Figura 1. Los Hallmarks del cáncer son un grupo de características que adquieren las células tumorales durante el desarrollo y progresión del cáncer. Este grupo de atributos le permiten a las células sobrevivir y proliferar en los diferentes estados de la enfermedad, favoreciendo el desarrollo de células con características más agresivas. Imagen tomada y modificada de: Hanahan *et. al.* ².

El cáncer es considerado actualmente como uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial. En el año 2012, el Informe Mundial contra el Cáncer dado por la International

Agency for Research on Cancer (IARC) reportó un aproximado de 14.1 millones de casos nuevos, 8.2 millones de muertes y 32.6 millones de personas viviendo con la enfermedad dentro de los cinco años del diagnóstico³.

En México el cáncer es la tercera causa de muerte en el país. En el año 2013 el cáncer alcanzó una tasa de mortalidad de 65.1 que representa el 12.8% de todas las muertes en el mundo. Aproximadamente la mitad de muertes por cáncer se presentan en pulmones, estómago, hígado, próstata, mama y cérvix, con el primer lugar en muertes el cáncer de próstata en hombres y el cáncer de mama en mujeres⁴.

El cáncer de mama es una de las neoplasias más comunes en el mundo, en México ocupa el primer lugar de incidencia y mortalidad en mujeres. La tasa de incidencia y mortalidad en el país reportada para el año 2012 mostró 35.4 casos nuevos y 9.7 muertes por cada 100,000 personas³.

II.II DEFINICIÓN DE CÁNCER DE MAMA

La gran mayoría de los tumores malignos son de tipo epitelial (Carcinomas), siendo responsables de aproximadamente el 80% de las muertes por cáncer en el mundo. El cáncer de mama es de tipo epitelial y pertenece al grupo de los Adenocarcinomas (provenientes de epitelios secretores)⁵. El cáncer de mama se define como un crecimiento anormal de células provenientes del epitelio mamario capaces de formar un tumor, con la capacidad de invadir tejidos y realizar metástasis en áreas distantes del cuerpo ⁶.

De acuerdo al sitio en donde es originado el tumor mamario, el cáncer de mama se puede clasificar como Lobular o Ductal ⁷. Las neoplasias ductales son las más frecuentes y se presentan en las células epiteliales de los ductos mamarios, caracterizadas por presentar atipia celular y potencial invasivo. Por otro lado, las neoplasias lobulares son originadas por las células epiteliales de los lóbulos mamarios, caracterizadas por mantener la arquitectura lobular intacta y poseer potencial invasivo ⁸.

De acuerdo al grado y capacidad invasiva de las células del tumor el cáncer de mama se ha clasificado en dos tipos: Carcinomas *in situ* y Carcinomas invasivos ⁷. Los carcinomas *in situ* se caracterizan por ser neoplasias no invasivas con proliferación intraductal/intralobular de las células epiteliales. Los carcinomas invasivos se refieren al crecimiento anormal de células neoplásicas capaces de penetrar e infiltrarse en la zona del estroma de la mama ⁸. De acuerdo a criterios como tipo celular, secreciones, arquitectura y perfiles inmunohistoquímicos se sub-clasifica a los carcinomas invasivos en al menos 17 subtipos más: tubulares, ductales-lobulares, lobulares invasivos, ductales invasivos, mucinosos, medulares, cribriformes, papilares, adenoides, secretores, apócrinos y metaplásicos, entre otros ⁹.

Estudios en microarreglos con muestras de pacientes han logrado clasificar al cáncer de mama en cinco subtipos principales de acuerdo a sus perfiles de expresión génica: los subtipos Luminales (A y B), Her2+, basales ^{10,11} y el recientemente descrito, subtipo bajo en Claudina ^{12,13}.

El subtipo **Luminal A** es el subtipo más común de cáncer de mama, representando entre el 50% y 60% de todos los tumores mamarios. Se caracteriza por la alta expresión del Receptor de Estrógeno (ER, por sus siglas en inglés) y Progesterona (PgR) y nula expresión del receptor del Factor de Crecimiento Epidermal Humano (HER2, por sus siglas en inglés). El subtipo Luminal A además expresa marcadores de células luminales epiteliales como citoqueratinas 8/18 y tiene una baja expresión de marcadores de proliferación como Ki67. Este subtipo tiene el mejor pronóstico, con una tasa baja de recurrencia y metástasis. Notablemente, este tipo de cáncer genera metástasis principalmente a hueso ¹⁴.

El subtipo **Luminal B** se caracteriza por presentar menor expresión del receptor de estrógenos (ER) y progesterona (PgR) y mayor expresión de marcadores de proliferación y ciclo celular como Ki67, CCNB1 y MYBL2 que el luminal A. Representa cerca del 15-20% de todos los tumores mamarios. Puede ser positivo para el receptor HER2 en cerca del 20% de los tumores. Es el subtipo con mayores niveles de amplificaciones y aberraciones cromosómicas. El subtipo Luminal B presenta mayor agresividad que el luminal A, similar al subtipo HER2, con un potencial metastásico similar a los subtipos basal y HER2, con sitios de metástasis principalmente en hueso y en menor grado pulmón ¹⁵.

El subtipo **HER2 positivo** se caracteriza por la amplificación de la proteína HER2 y proteínas implicadas en la vía HER2. Tumores HER2+ representan cerca de 15-20% de todos los tumores mamarios. Presentan mayor proliferación y agresividad que los tumores luminales, además cerca del 50% de estos tumores presentan expresión del ER. Sin tratamiento, los tumores HER2+ presentan un pronóstico pobre con sitios de metástasis principalmente a cerebro y órganos viscerales ¹⁴.

El subtipo **Basal** es uno de los subtipos menos comunes, con una prevalencia de entre el 3-37% dependiendo de la población de estudio. Son negativos para los receptores ER, PgR y HER2, haciendo que terapias dirigidas hacia este tipo de tumor continúen siendo un reto. El subtipo basal se caracteriza por presentar marcadores moleculares típicos de células del epitelio basal de los ductos mamarios, con un bajo grado de diferenciación y alta capacidad invasiva. Estos tumores comúnmente tienen mutaciones en los genes supresores BRCA1 y TP53. Más del 70% de los tumores con mutación en el gen supresor BRCA1 son catalogados como tumores basales y cerca de 83% de los tumores basales presentan mutaciones en TP53. Los pacientes con tumores de tipo basal presentan un pronóstico pobre y alto riesgo de recurrencia en comparación con cualquier otro tumor mamario ¹⁶.

Finalmente, el subtipo **Bajo en Claudina** representa cerca del 7-14% de los tumores mamarios. Se caracteriza por la alta expresión de marcadores de diferenciación mesenquimales y típicos de EMT, así como un alto contenido de células troncales tumorales. Este subtipo presenta baja expresión de genes luminales, marcadores de proliferación y moléculas de adhesión intracelular ^{13,17}, además de un alto contenido de células inmunes infiltradas. Los pacientes con tumores bajos en Claudina presentan un pronóstico pobre similar a tumores Luminal B, con respuesta baja a quimioterapia (Tabla 1) ^{17,18}.

Subtipo	Frecuencia	ER/PgR/Her2	Marcadores de Proliferación	Supervivencia	Subtipos histológicos comunes
Luminal A	50-60%	ER+ / PgR+ / HER2-	Bajo	Alta	Tubular, Cribiforme, Ductal invasivo, Lobular invasivo
Luminal B	10-20%	ER± / PgR± / HER2±	Alto	Baja	Ductal invasivo, micropapilar
HER2+	10-15%	ER± / PGR- / HER2+	Alto	Baja	Ductal invasivo, Lobular invasivo, Apócrino, micropapilar
Basal	10-20%	ER- / PgR- / HER2-	Alto	Baja	Metaplásico, Medular, Adenoide
Bajo en Claudina	12-14%	ER- / PgR- / HER2-	Alto	Baja	Metaplásico, ductal invasivo, medular

Tabla 1. Subtipos moleculares del cáncer de mama. Actualmente el cáncer de mama se ha clasificado en cinco subtipos de acuerdo a sus perfiles de expresión génica. Estos subtipos moleculares difieren entre ellos por la expresión de ciertas moléculas características, la tasa de proliferación, la agresividad, así como en características clínicas particulares. ^{9,18-20}

II.III CÉLULAS TRONCALES TUMORALES (CTT)

Es bien demostrado que los tumores están conformados de poblaciones funcionales y fenotípicamente heterogéneas, teniendo diferentes capacidades proliferativas, morfológicas y de diferenciación, siendo el origen de esta heterogeneidad blanco de investigación. Actualmente se cuenta con dos modelos que tratan de demostrar el origen de esta heterogeneidad celular en los tumores: el modelo de evolución clonal y el modelo de células troncales de cáncer ²¹.

El modelo de evolución clonal plantea que las células tumorales van adquiriendo una variedad de mutaciones y alteraciones que les confieren características más agresivas que les permiten sobrevivir durante la progresión de la enfermedad. Este modelo postula que cualquier célula tumoral tiene capacidad tumorigénica²². Por otro lado, el modelo de células

troncales de cáncer postula la existencia de un grupo de células con características similares a las células troncales normales las cuales son llamadas “Células Troncales Tumorales”. Las células troncales tumorales (CTT) son células capaces de auto-renovarse o de diferenciarse y generar células fenotípicamente diversas que formaran parte del tumor^{23,24}. Las CTT son las responsables de la iniciación, progresión, recurrencia y resistencia tumoral. Además, de acuerdo a este modelo las CTT son las únicas capaces de generar tumores *in vivo* (Figura 2)

22.

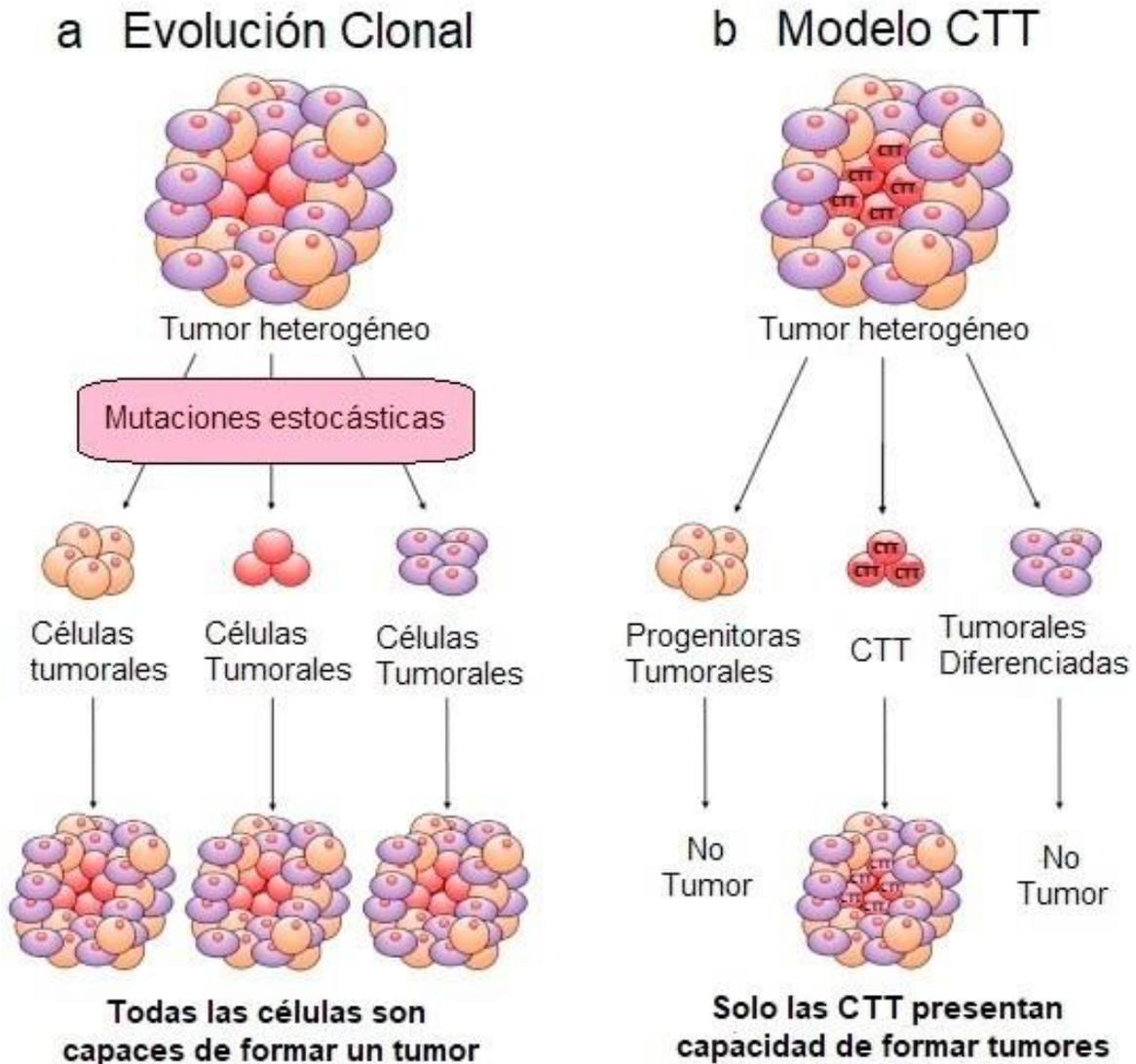


Figura 2. El modelo de evolución clonal plantea que las células tumorales adquieren mutaciones que les confieren diferentes ventajas de supervivencia durante el desarrollo del tumor. El modelo de células troncales del cáncer plantea la existencia de un grupo de células con características troncales las cuales son las responsables del origen y heterogeneidad tumoral. En el modelo de evolución clonal cualquier célula tiene capacidad tumorigénica, sin embargo en el modelo de células troncales del cáncer solo las CTT son capaces de formar tumores *in vivo*. Imagen tomada y modificada de: Koren *et. al.* ²⁵.

La población de células troncales presentes en los tumores se ha logrado aislar y caracterizar a través de la expresión de diversas moléculas de superficie tales como CD44, CD24, CD133, CD90, EpCAM, ABCG5 ²¹. Generalmente, es posible identificar a la población de células

troncales mediante un panel de 2 a 3 marcadores que pueden variar dependiendo del tipo de tumor.

Las CTT poseen características funcionales y fenotípicas que las distinguen del resto de las células del tumor. Estas células tienen estrategias que les permiten escapar a los tratamientos convencionales de quimio y radioterapia. Generalmente, las CTT presentan mayor actividad de enzimas Peroxidasas y Aldehído Deshidrogenasas encargadas de la reducción y eliminación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) generadas por radioterapia. Además, estas células también poseen una mayor actividad de enzimas expulsoras de fármacos como Transportadores ABC y tienen una mayor capacidad de reparación de DNA ²⁶.

En cáncer de mama se sabe que los tumores poseen una cantidad de células troncales típicamente de entre 1-5% ²⁷, sin embargo, el porcentaje de esta población varía de acuerdo al subtipo de cáncer. Park *et. al.*, demostraron que el porcentaje de células troncales en los tumores mamarios correlaciona con el subtipo molecular, siendo los tumores basales los que tienen un mayor porcentaje de CTT y los tumores luminales los que tienen un menor número de CTT ²⁸.

En cáncer de mama las células troncales del tumor pueden reconocerse de acuerdo a la alta expresión de las proteínas CD44 y EpCAM y bajos/nulos niveles de CD24 ($CD44^+CD24^{-}/bajo\ ESA^+$) ²⁶. Además se sabe que la actividad elevada de la enzima ALDH está directamente relacionada con células que presentan un fenotipo troncal ²¹.

Las CTT expresan marcadores típicos de pluripotencia. Analizando la expresión de genes como SOX2, NANOG y OCT4 es posible dar un indicio del potencial pluripotente de las células troncales del tumor. ²⁹.

Se sabe que las CTT tienen la habilidad de crecer cuando son cultivadas en condiciones de baja adherencia. Mediante cultivos de mamíferas es posible cuantificar la actividad y auto-renovación de células troncales y progenitoras mamarias ³⁰. Esta metodología fue diseñada para el análisis de células troncales en tejido mamario ³¹ y recientemente ha sido adaptado en el estudio de la población troncal en tumores y líneas celulares de cáncer de mama³². Metodológicamente las células son cultivadas libres de adherencia y crecidas en medio enriquecido con factores de crecimiento y moléculas que favorecen la auto-renovación de las células. Se cuantifica la eficiencia de formación de mamíferas y puede ser cuantificado el tamaño de las mismas ³⁰.

La auto-renovación y el mantenimiento de las células troncales tumorales se encuentran reguladas por diferentes vías de señalización. Las vías de Notch, Wnt, y Hedgehog son las vías de señalización más estudiadas implicadas en el mantenimiento, balance de troncalidad y diferenciación en CTT ³³. Sin embargo, reportes recientes muestran la relevancia de la vía de NF- κ B en el mantenimiento del fenotipo troncal en las células de cáncer de mama ^{34,35}.

II.IV VÍA DE SEÑALIZACIÓN NF- κ B

El Factor Nuclear κ B (NF- κ B) es un factor de transcripción implicado en diversos procesos celulares como respuesta inmune, supervivencia, respuesta ante estrés y maduración de

diversos tipos celulares, por lo tanto su desregulación se vuelve un factor importante en el desarrollo de diversas enfermedades como el cáncer ^{36,37}.

La señalización de NF- κ B consiste en la translocación de los homodímeros/heterodímeros de proteínas con dominio Rel (Rel A, Rel B, cRel, p50 y p52) y su interacción directa con el DNA ³⁷. Existen dos vías principales para llegar a la translocación nuclear de los dímeros, la vía canónica y la vía no canónica. La vía canónica es activada por señales pro-inflamatorias y respuesta inmune como citocinas (IL1 β y TNF α) y consiste en la activación del complejo NEMO-IKK, resultando en la fosforilación y degradación de la proteína inhibitoria I κ B ($\alpha/\beta/\epsilon$) seguido por la translocación nuclear de los dímeros (RelA-RelA, RelA-p50, cRel-cRel, cRel-p50). Por otro lado, la vía no canónica suele ser activada por estímulos de desarrollo y moléculas como LT β , CD40L y RANKL. Esta vía consiste en la activación del complejo NIK-IKK α seguido del procesamiento proteosomal de la proteína p100 a p52 y la subsecuente translocación de los dímeros RelB-p52 o bien RelA-p52 (Figura 3) ³⁶.

Esta vía ha sido encontrada como reguladora de diferentes procesos en cáncer tales como proliferación, angiogénesis, metástasis, resistencia a quimioterapias y recientemente se ha visto el papel que desempeña en el mantenimiento de células troncales de cáncer en diferentes tumores ³⁸. En cáncer de mama, se sabe que las células troncales tumorales presentan mayor actividad de NF- κ B que las células tumorales maduras y su actividad puede regular la expansión, diferenciación y capacidad de auto-renovación de estas células ³⁵.

El Receptor Activador del Factor Nuclear κ B (RANK) es un receptor que al ser activado por su ligando RANKL es capaz de activar la vía de NF- κ B ³⁹. Estudios recientes han mostrado

que células tumorales de ratones con deficiencia de RANK tienen una disminución en su capacidad de formación de mamosferas. Por otra parte, la sobreexpresión de RANK incrementa la población de células troncales tumorales, sugiriendo así que RANK puede modular el fenotipo troncal de células de cáncer de mama ^{40,41}.

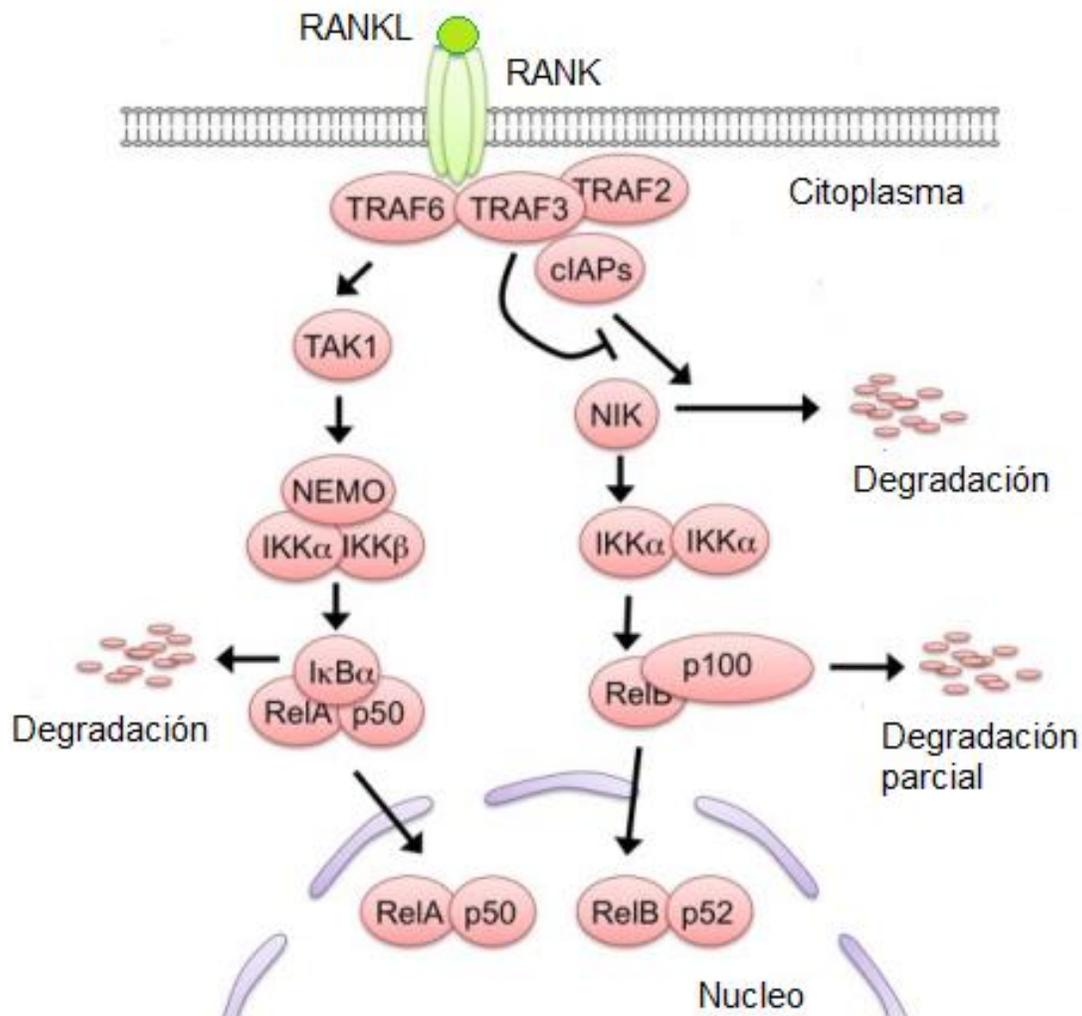


Figura 3. La interacción entre RANK/RANKL desencadena el reclutamiento de proteínas TRAF y la activación de la vía NF-κB. La vía canónica consiste en la activación del complejo NEMO-IKK encargados de fosforilar a la proteína inhibitoria IκBα con su consiguiente degradación y liberación de los dímeros de NF-κB. La vía no canónica comienza con la activación del complejo NIK-IKKα con la consiguiente fosforilación y degradación parcial de la proteína p100 a p52 y la liberación de los dímeros NF-κB. Imagen tomada y modificada de: Akiyama *et. al.* ⁴².

II.V RANK/RANKL

El Receptor activador del Factor Nuclear κ B (RANK) (TNFRSF11A) y su ligando RANKL (TNFSF11) son un dúo de proteínas transmembranales pertenecientes a las superfamilias de los Factores de Necrosis Tumoral (TNF) y receptores TNF que al interactuar activan señales implicadas en diversos procesos celulares ⁴³⁻⁴⁵.

RANK/RANKL fueron descubiertas en el año 1997 al desarrollar un papel importante en la regulación de células T y células dendríticas, así como en la regulación de la remodelación ósea dada por osteoclastos/osteoblastos⁴³. Se han visto expresadas en diversos tipos celulares como osteoclastos, células T (CD4+ y CD8+), células dendríticas, linfocitos B, células epiteliales mamarias, queratinocitos, etc., desarrollando diversos roles fisiológicos como remodelación ósea, regulación inmune, desarrollo de órganos linfoides y en el desarrollo de glándulas mamarias lactantes ⁴³.

En primera instancia fue caracterizado el papel de RANK/RANKL en procesos inmunitarios. Análisis en células inmunes mostraron alta expresión de RANKL en células T (CD4+ y CD8+) y mayor expresión de RANK en células dendríticas⁴⁶. La estimulación con RANKL promueve la supervivencia de células dendríticas a través de la expresión de la proteína anti-apoptótica bcl-xl^{46,47}. La interacción entre células T y células dendríticas a través de la vía RANK/RANKL aumenta la supervivencia de las células dendríticas y la activación de las células T, potenciando en conjunto a la respuesta inmunitaria ^{48,49}.

De manera simultánea a la inmunoregulación, se descubrió el papel de RANK/RANKL en la fisiología del hueso. RANK/RANKL induce la formación y activación de osteoclastos a partir

de la diferenciación de sus precursores^{50,51} RANKL se encuentra expresado en la superficie de osteoblastos y osteocitos, mientras que RANK se expresa en la superficie de precursores de osteoclastos. La interacción entre RANK/RANKL induce la diferenciación de los precursores de osteoclastos a osteoblastos maduros capaces de degradar el hueso⁴³. El desbalance en la actividad de RANK/RANKL en tejido óseo conlleva al desarrollo de patologías como la osteoporosis. La hiperactividad de RANKL estimula la producción excesiva de osteoclastos. La actividad elevada de los osteoclastos genera un desbalance entre la producción y remoción ósea, favoreciendo el desgaste excesivo del tejido óseo⁵².

Recientemente también se descubrió el papel que desarrolla RANK/RANKL en la fisiología de las glándulas mamarias durante el embarazo. Estudios en ratones deficientes de RANK/RANKL mostraron deficiencias morfológicas en el desarrollo de las glándulas mamarias lactantes durante el embarazo acompañado de una disminución en la proliferación y diferenciación de las células epiteliales y progenitoras mamarias⁵³. De manera cronológica se sabe que durante el embarazo los niveles de la hormona sexual progesterona se ven aumentados. Este aumento en progesterona resulta en un aumento en la expresión de RANKL en células luminales epiteliales mamarias sensibles a progesterona. Los niveles altos de RANKL favorecen la activación de la vía RANK/RANKL en células progenitoras y epiteliales mamarias *RANK*⁺ estimulando la proliferación y expansión de estas células⁵⁴.

II.VI RANK/RANKL EN CÁNCER DE MAMA

Debido a que RANK/RANKL son reguladores de la proliferación y diferenciación de células epiteliales y progenitoras mamarias, un desbalance en la vía está relacionado con el desarrollo o progresión de neoplasias en el epitelio mamario.

En cáncer de mama se conoce el papel de RANK/RANKL en la progresión y agresividad de la enfermedad. Estudios en pacientes con cáncer de mama correlacionan la expresión de RANKL con el desarrollo y la agresividad de la enfermedad. Además, RANKL se ha propuesto como un marcador pronóstico, predictivo y de metástasis^{55,56}.

Estudios en líneas celulares muestran el papel de RANK/RANKL en tumorigénesis y procesos metastásicos. Palafox *et. al.*, reportan que la expresión de RANK es capaz de inducir el proceso de Transición Epitelio mesénquima (EMT), inducir el fenotipo troncal ($CD44^+CD24^-$) y promover tumorigénesis y metástasis en la línea celular de epitelio mamario MCF10A⁴⁰. Un segundo estudio muestra una relación positiva entre la expresión de RANK y el número de metástasis óseas de línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 trasplantada en ratones⁵⁷.

Además de procesos metastásicos, estudios actuales mostraron la relación entre RANK/RANKL en el desarrollo de cáncer de mama en pacientes con mutación en el gen de reparación BRCA1/2. Análisis en muestras de tejido pre-neoplásico con mutación en BRCA1/2 y tejido normal mostraron mayor expresión de RANK en las células con BRCA1/2 mutado. Adicionalmente, células $BRCA^{mut}RANK+$ mostraron mayor daño al DNA, capacidad clonogénica y proliferación. Estos resultados en conjunto demuestran que

RANK/RANKL puede promover el desarrollo de neoplasias en pacientes con mutación en BRCA1/2⁵⁸.

Finalmente, experimentos recientes en ratones han demostrado el papel de la vía RANK/RANKL en la capacidad troncal de tumores mamarios. Al abatir la vía de señalización RANK/RANKL utilizando una proteína recombinante RANK-Fc se demostró que la inhibición de RANKL disminuye el potencial tumorigénico a través de la disminución de la población de células troncales en el tumor, forzándolas a diferenciarse en células tumorales maduras⁵⁹.

Debido a que RANK/RANKL está asociado con diferentes procesos implicados en la progresión y agresividad del cáncer de mama y correlaciona con un pronóstico pobre, la inhibición de esta vía promete brindar buenos resultados en el tratamiento y prevención de tumores en tejido mamario. Además debido al papel de RANK/RANKL en la regulación de fenotipo troncal, se ha planteado que la inhibición del RANKL puede impactar en la eliminación de la población troncal y por ende en el tratamiento del cáncer.

Actualmente existen fármacos dirigidos contra la interacción de RANK/RANKL. Denosumab, un anticuerpo IgG2 monoclonal anti-RANKL es usado como tratamiento para la enfermedad de osteoporosis post-menopáusica, reduciendo y previniendo el desgaste de los huesos. Además es usado para prevenir fracturas óseas en pacientes con metástasis a hueso y problemas asociados con tejidos óseos en pacientes con cáncer de mama y próstata^{43,44}.

II.VII TERAPIAS DIRIGIDAS HACIA CTT

Debido a que las células troncales tumorales poseen la capacidad de iniciar y promover el crecimiento tumoral, y tienen una gran resistencia a la quimioterapia⁶⁰, es necesario proponer estrategias terapéuticas dirigidas para la eliminación de células con características troncales. Actualmente se ha planteado el uso de fármacos dirigidos hacia la eliminación de células troncales tumorales, de manera simultánea con fármacos quimioterapéuticos convencionales para eliminar de manera más eficiente el tumor e impedir la recurrencia tumoral (Figura 4)³³.

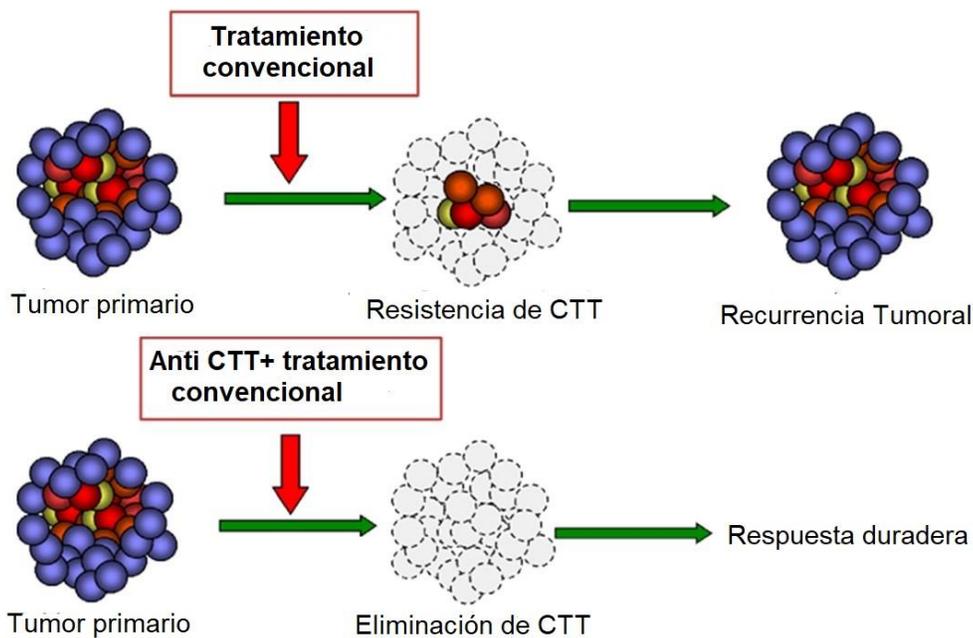


Figura 4. Las CTT al ser resistentes a fármacos antineoplásicos convencionales son las responsables de la recurrencia tumoral tras recibir un tratamiento. El uso de terapias convencionales combinadas con terapias anti-CTT promete la eliminación total del tumor evitando así la recurrencia del mismo. Imagen tomada y modificada de: Verastem⁶¹.

El ácido retinóico es el primer fármaco dirigido hacia la eliminación de la población de células troncales tumorales. Este fármaco es utilizado para tratar la Leucemia pro-mielítica

aguda debido a la inducción de diferenciación de las células leucémicas pre-mieloides en células maduras. De manera interesante, se ha visto que este fármaco tiene capacidad antineoplásica a través de la inhibición de crecimiento e inducción de diferenciación celular de CTT en diferentes tipos de cáncer.⁶² Estudios en otros tipos de neoplasias, como tumores de páncreas, han demostrado que el ácido retinóico tiene la capacidad de diferenciar a las CTT y de reducir su capacidad de auto-renovación, forzándolas a su diferenciación terminal^{63,64}. Actualmente, este fármaco se encuentra en investigación para determinar su posible uso en tumores sólidos.

Además del ácido retinóico, algunos estudios han mostrado que diversos compuestos fitoquímicos tienen el potencial para disminuir la población troncal de tumores cancerígenos. Compuestos tales como curcumina, metformina, quercitina, sulforafano, se han propuesto como candidatos capaces de reducir la población de CTT de los tumores. Sin embargo, a pesar de los estudios, la efectividad de estos compuestos no ha sido establecida con claridad⁶⁵.

Actualmente, Chu *et. al.*, demostró que Denosumab posee la capacidad de disminuir diversos marcadores moleculares de CTT tales como CD44, CD133, SOX2, OCT3/4, CD491 y NANOG en líneas celulares de cáncer de próstata, dando así el primer indicio de que Denosumab posee la capacidad de disminuir la población de CTT⁶⁶. En cáncer de mama Cuyàs *et. al.*, mostró la eficiencia de Denosumab para disminuir la capacidad de formación de mamosferas en la línea epitelial mamaria MCF10A con mutación en BRCA1⁶⁷. Paralelamente, muestran la capacidad de Denosumab en combinación con metformina

para disminuir la formación de mamosferas de la línea de cáncer de mama MDA-MB-436 con mutación en BRCA1 ⁶⁸.

III. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial. A pesar de la existencia de terapias dirigidas hacia la mayoría de los tumores mamarios, aún se presenta baja efectividad y altas tasas de recurrencia. Las CTT son responsables del establecimiento, progresión y mantenimiento del tumor, por lo tanto, la eliminación de esta población promete buenos resultados en el tratamiento del cáncer.

La señalización de NF- κ B está implicada en el mantenimiento y auto-renovación de las CTT de cáncer de mama. RANK/RANKL activan la vía de NF-KB, y su expresión es crucial para la sobrevivencia y mantenimiento del fenotipo troncal. El uso de inhibidores de la vía RANK/RANKL podría brindar una ventaja terapéutica para eliminar la fracción troncal de tumores cancerígenos. Denosumab, un anticuerpo igG monoclonal anti-RANKL aprobado para el tratamiento de osteoporosis podría funcionar como un antineoplásico para eliminar la población de CTT, sin embargo su uso no ha sido completamente explorado. El uso de Denosumab en pacientes con cáncer de mama en combinación con fármacos convencionales podría disminuir la recurrencia tumoral y erradicar en su totalidad al tumor. Sin embargo su uso en cáncer aún es limitado.

IV. HIPÓTESIS

La vía de señalización de RANK/RANKL es vital para el mantenimiento de la población de células troncales de cáncer de mama. La inhibición de la vía mediante un anticuerpo neutralizante (Denosumab) impide la auto-renovación de estas células y por lo tanto afecta el crecimiento tumoral.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la función de Denosumab en la regulación de la población troncal y la capacidad tumorigénica de la línea celular de Cáncer de mama MCF7.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de Denosumab en la expresión de marcadores de troncalidad.
2. Determinar la capacidad de Denosumab para reducir la población de células troncales tumorales.
3. Evaluar el efecto de Denosumab en la capacidad clonogénica y auto-renovativa de la línea celular.
4. Analizar el efecto de Denosumab en la viabilidad y migración celular de la línea.
5. Evaluar el efecto antitumoral de Denosumab en un modelo *in vivo* de pez cebra (*Danio rerio*).

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo Celular

Se trabajó con la línea celular de cáncer de mama del tipo Luminal A, MCF7 obtenida del ATCC que fue cultivada en medio RPMI 1640 (Cat.# 10-040-CMR) enriquecido con 5% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Cat.# 26140-079). Las células se mantuvieron creciendo en una incubadora a 37°C con 5% de CO_2 .

Tratamiento con Denosumab

Anteriormente en el laboratorio se realizó una curva de concentración vs respuesta (disminución de la población $CD44^+CD24^{-/bajo}$) del tratamiento con Denosumab en células BT20. La EC50 del fármaco fue aproximadamente de 460µg/ml, por tanto, para alcanzar el efecto total deseado se utilizó la concentración de 1mg/ml. Extrapolando esta información se decidió utilizar la concentración de 1mg/ml para los experimentos en la línea celular MCF7.

Un total de 350,000 células fueron cultivadas en placas de 12 pozos en medio RPMI deficiente de SFB y tratadas con Denosumab (Amgen®, Xgeva®) a la concentración de 1mg/ml durante 24 horas para los ensayos de PCR en tiempo real (qPCR), migración y ensayos *in vivo*; y durante 48 horas para los ensayos de citometría de flujo.

RT-PCR y PCR en tiempo real (qPCR)

El RNA total se obtuvo por medio de TRIzol Reagent (Cat.# 15596026) siguiendo las recomendaciones del proveedor. La cantidad e integridad del RNA fue cuantificado mediante espectrofotometría utilizando un Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer. Un total de 500ng a 2µg de RNA fueron tratados con RQ1 RNase-Free DNase (Cat.# M6101) y retro-transcritos utilizando los kits SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Cat.# 11754050), High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Cat.# 4368813) o Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Cat.#K1671). La qPCR fue realizada utilizando 7µl de SYBR Select Master Mix (Cat.# 4472908) en el termociclador 7900HT (Cat.# 4329001). La tasa de cambio fue calculada utilizando el método $\Delta\Delta CT$. Los primers utilizados para la reacción se encuentran enlistados en la tabla 2.

Gen	Secuencia Sentido (5' - 3')	Secuencia Antisentido (5' - 3')	Tm(°C)
TBP	GCTCTCATCTACCCTTGCTCCC	TGCCACTCCCTGCAACTCAACA	60
18s	ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG	TCCTCGTTCATGGGGAATAA	56
OCT4	ACATCAAAGCTCTGCAGAAAGAAC	CTGAATAACTCCCAAATAGAACCC	56
NANOG	AGGCAAACAACCCACTTCTG	TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT	56
ALDH8A1	CAGGCTACTTTATGCTTCCCAC	GCTCTTTCAATCACCTCCTCTT	56
ALDH1A3	GCATACCGTGGAAGGGCG	GCTCTCTGGGCTATTGATTCTGTC	56

Tabla 2. Secuencia de Primers y temperatura de fusión (Tm) de los genes evaluados por qPCR.

Citometría de Flujo

Un total de 1×10^6 células fueron resuspendidas en PBS enriquecido con SFB 1% y se incubaron con los anticuerpos CD44/FITC (Cat.# 555478) y CD24/PE (Cat.# 555428) durante 30min a 4°C. Los anticuerpos Fcγ-IgG1 (Cat.# 130-092-213) y PE-IgG1 (Cat.# 130-092-212)

se utilizaron como control de isotipo. Las células fueron analizadas en el citómetro FACSaria y los resultados fueron analizados en el programa Flowjo Software Package.

Ensayos de Migración en cámaras de Boyden

Se cultivaron 6,000 células en pozos Transwell de 6.5mm y poro de 8.0µm en 200µl de medio RPMI deficiente de SFB colocados en placas de 24 pozos con 600µl de medio enriquecido con SFB al 10%, incubándose durante 24 horas a 37°C. Las células que migraron fueron fijadas con Paraformaldehído (PFA) al 4% y teñidas con cristal violeta para su análisis.

Ensayo de viabilidad celular (MTS)

Se cultivaron 10,000 células en placas de 96 pozos en medio RPMI deficiente de SFB y se trataron con Denosumab a las concentraciones de 250µg/ml, 500µg/ml y 1mg/ml por 24, 48 y 72 horas. El ensayo de MTS se realizó utilizando CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Cat.# G5430). Las células se incubaron con el reactivo durante 2h con 30min a 37°C en oscuridad. Los resultados fueron analizados en el espectrofotómetro Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector a una longitud de onda de 596nm.

Ensayos de formación de mamosferas

Para evaluar la capacidad clonogénica y de auto-renovación de la línea celular, 6,000 células fueron cultivadas en placas de 12.5 cm² con 3ml de medio MammoCult Human Medium Kit (Cat.# 05620) enriquecido con 0.48µg/ml de hidrocortisona y 4µg/ml de heparina y tratadas con Denosumab a la concentración de 1mg/ml. Después de 14 días de crecimiento se obtuvo el RNA total de las esferas, o bien, se disociaron y sub-cultivaron bajo las mismas

condiciones por tres generaciones. Se contó el número de esferas y se calculó el volumen con la formula $V = \frac{4}{3}\pi a^2 b$.

Para determinar el potencial del fármaco en disminuir el tamaño de las mamografías se realizó una variante del experimento, cultivando 6,000 células en medio MammoCult enriquecido con 0.48µg/ml de hidrocortisona y 4µg/ml de heparina y se mantuvieron las células sin tratar durante 14 días. Posterior a estos días las células fueron tratadas con 1mg/ml de Denosumab durante 14 días más y se cuantificó el número y volumen de las esferas.

*Xenotransplantes en pez cebra (*Danio rerio*)*

Para analizar la capacidad tumoral *in vivo* de las células, se obtuvieron embriones de pez cebra de cruces naturales adultas que fueron mantenidas con un pH constante de 7.2-7.4, temperatura de 26-28 °C y ciclo luz oscuridad 14h/10h. Los embriones fueron colocados en cajas de Petri con medio especial de embriones de pez cebra y mantenidos a 28.5°C durante 48h post-fertilización. Posteriormente, los embriones fueron decorionados y anestesiados con tricaina (MS-222) (Cat.# E10521). Se inyectaron cuatro diluciones de células (200, 300, 400 y 700) en el saco vitelino de los embriones utilizando un Picoliter Microinjector PLI-100A acoplado a una aguja de borosilicato. Los peces trasplantados se mantuvieron en una incubadora a una temperatura de 34°C hasta el fin del experimento. Ensayos de Dilución Limitada fueron analizados utilizando el software Extreme Limiting Dilution Analysis (ELDA)

Análisis Estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado biológico (excepto en los casos marcados). Todos los datos fueron analizados en el programa GraphPad Prism 7. Mediante la prueba de T de Student se calculó la significancia estadística. Una p value <0.05% fue considerada estadísticamente significativo. Las gráficas reportadas están acompañadas por barras de error estándar (excepto en los casos marcados).

VIII. RESULTADOS

Las células troncales se caracterizan por expresar factores asociados a pluripotencia, los cuales les permiten auto-renovarse y permanecer en un estado no diferenciado. La disminución en la expresión de estos marcadores reduce la capacidad de auto-renovación de las CTT²⁹. Para evaluar el efecto de Denosumab en la capacidad troncal de la línea celular MCF7 se evaluó la expresión de marcadores moleculares de pluripotencia mediante qPCR. Como se muestra en la Figura 5, el tratamiento con Denosumab durante 24h fue suficiente para reducir la expresión de OCT4, NANOG y ALDH1A3 de manera significativa, con cerca del 50% de inhibición de la expresión, sin embargo, a pesar de que la expresión de ALDH8A1 no es significativa, se logró observar una tendencia a la disminución. Este resultado nos muestra el primer indicio del potencial de Denosumab para disminuir el fenotipo troncal de las CTT.

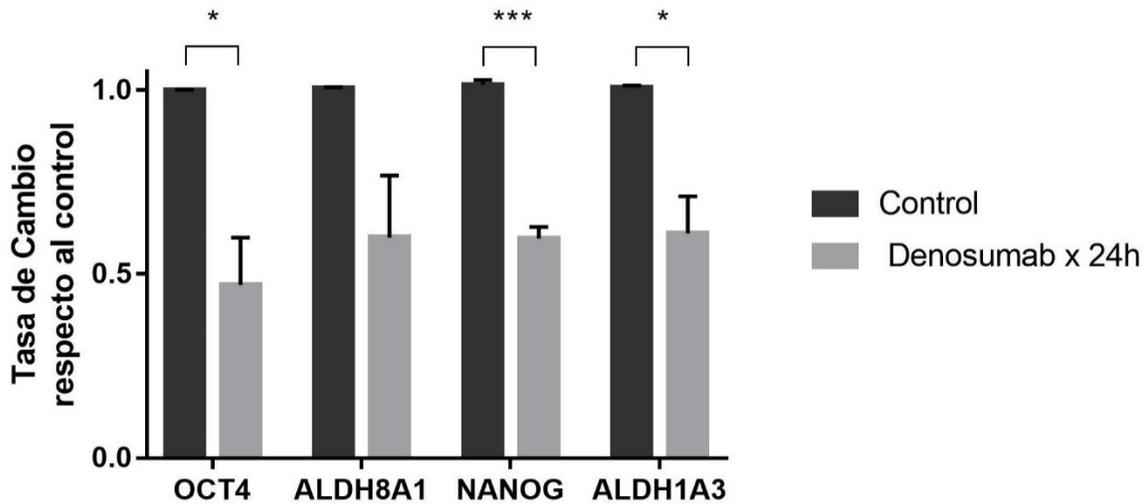


Figura 5. Denosumab disminuye la expresión de marcadores de pluripotencia. Expresión de los marcadores pluripotentes OCT4, ALDH8A1, NANOG y ALDH1A3 evaluada por qPCR en la línea celular MCF7 con y sin tratamiento con 1mg/ml de Denosumab durante 24h. La expresión de los genes fue normalizada utilizando la expresión del gen constitutivo TBP o 18S. La tasa de cambio se analizó contra el grupo control. Las gráficas mostradas representan el promedio de tres replicas independientes con tres replicas técnicas, con barras de error estándar. * $p < 0.033$ ** $p < 0.002$ *** $p < 0.001$.

Las CTT de cáncer de mama se han caracterizado de acuerdo a la alta expresión de la proteína CD44 y la baja o nula expresión de CD24²⁶. Para evaluar el efecto de Denosumab en la población troncal de la línea celular MCF7 se analizó la expresión de las proteínas CD44 y CD24 mediante citometría de flujo tras 48h de tratamiento. En MCF7, la población troncal $CD44^+CD24^{-/bajo}$ fue de aproximadamente 0.15% (Fig. 6). De manera interesante, la inhibición de RANKL a través de Denosumab durante 48h redujo la población troncal en aproximadamente un 20% (Fig. 6a, b). Estos resultados sugieren que Denosumab es capaz de disminuir la población de CTT aun en líneas celulares con bajo contenido de estas.

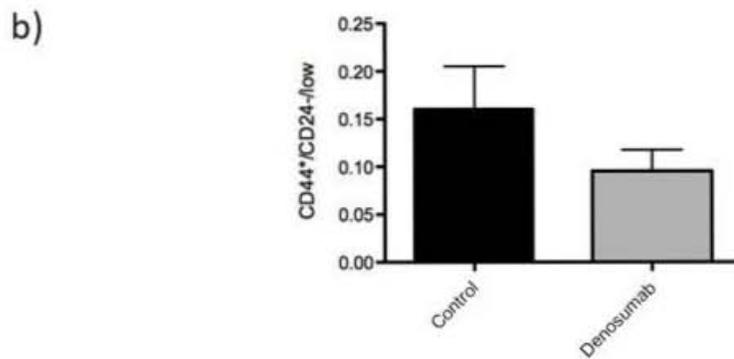
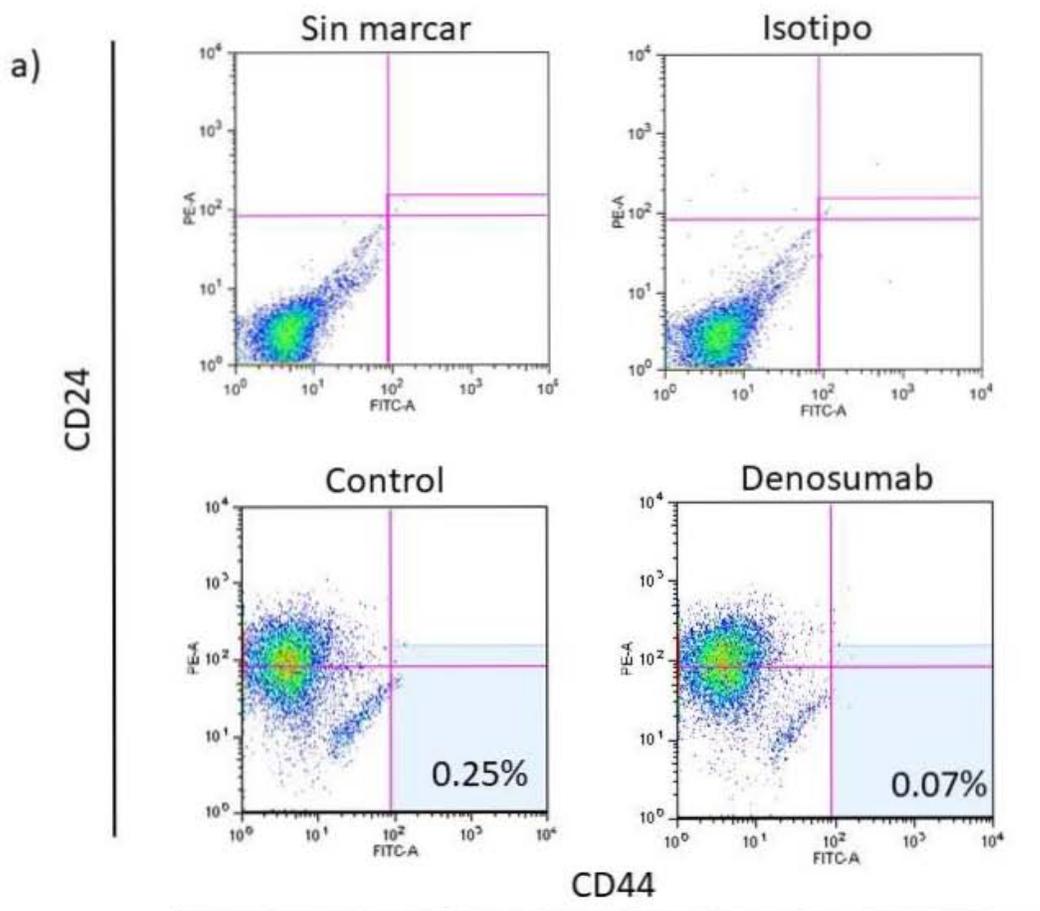


Figura 6. Denosumab disminuye la población de células $CD44^+CD24^{-/bajo}$. Análisis de expresión de las proteínas CD44 y CD24 por citometría de flujo en células MCF7 control y MCF7 tratadas con Denosumab durante 48h. (a) Las gráficas muestran la expresión conjunta de CD44 y CD24 de células MCF7 control y MCF7

tratada con Denosumab. Los datos fueron normalizados con base a los isotipos. La gráfica representa una réplica técnica de un experimento independiente. (b) Porcentaje de células $CD44^+CD24^{-/bajo}$ de la línea MCF7 control y MCF7 tratada con Denosumab. La gráfica representa el promedio de un experimento independiente con triplicado técnico y barras de desviación estándar.

Las CTT poseen la capacidad de crecer y formar colonias cuando son cultivadas en condiciones de baja adherencia^{30,31}. Para evaluar el efecto de Denosumab en la capacidad clonogénica se realizaron cultivos de mamíferas por dos semanas a partir de células MCF7 control y células MCF7 tratadas con Denosumab (Fig. 7a). De manera interesante el tratamiento con Denosumab no logró disminuir de manera significativa el número de mamíferas formadas (Fig. 7b), sin embargo, las mamíferas formadas por la línea MCF7 tratada con Denosumab presentaron un diámetro y volumen drásticamente menor que las mamíferas formadas por las células MCF7 control (Fig. 7c, d, e). Estos resultados dan un indicio de que la inhibición de RANKL a través de Denosumab es suficiente para reducir el tamaño de las esferas formadas por la línea celular MCF7.

Es bien sabido que los cultivos en mamíferas tienen poblaciones enriquecidas de CTT y por tanto poseen una mayor expresión de los marcadores de células troncales^{30,31}. Para verificar la repercusión de la formación de mamíferas en el fenotipo troncal, se analizó la expresión de los marcadores pluripotentes en células cultivadas en monocapa y en mamíferas a partir de la línea celular MCF7. Como se observa en la Figura 7f las células que conforman las mamíferas presentaron una mayor expresión de NANOG y ALDH8A1. El gen OCT4 se expresó de manera similar en ambas condiciones de cultivo y curiosamente, la expresión de ALDH1A3 se vio disminuida en cultivos en mamíferas. Para evaluar el efecto de Denosumab en la expresión de los marcadores pluripotentes en células cultivadas en

mamosferas se evaluó la expresión de OCT4, NANOG, ALDH8A1 y ALDH1A3 en cultivos en mamosfera tratados con o sin Denosumab. Sorprendentemente en la Figura 7g se observa que la expresión de NANOG y ALDH8A1 disminuye cuando las células son tratadas con Denosumab. De manera interesante la expresión de ALDH1A3 y la expresión de OCT4 no presentaron cambios notorios. En conjunto estos resultados muestran un posible aumento en los marcadores pluripotentes de las células cultivadas en mamosferas, sin embargo, el tratamiento con Denosumab parece lograr atenuar este aumento en el fenotipo troncal a través de la regulación de los marcadores pluripotentes.

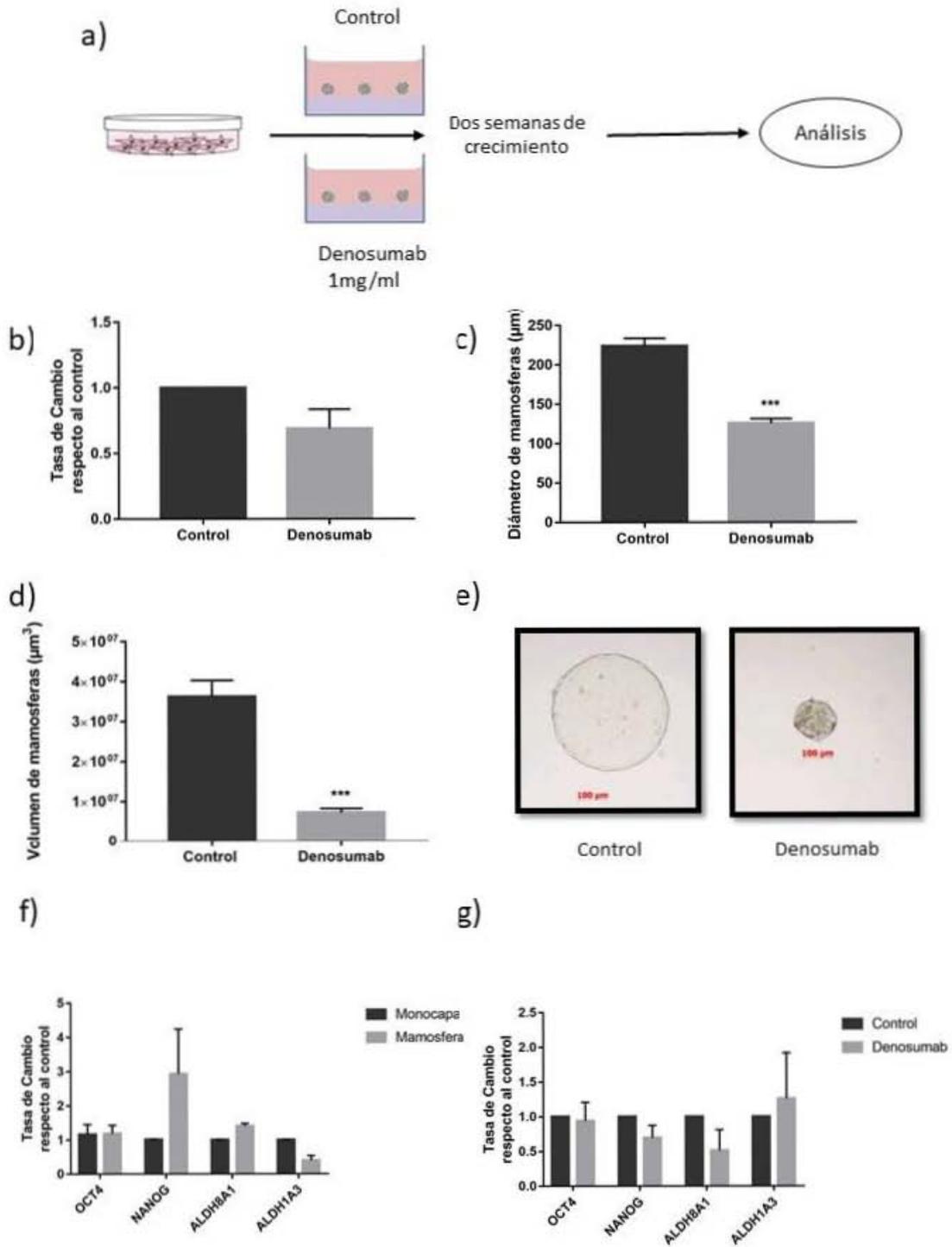


Figura 7. La inhibición de RANKL con Denosumab disminuye el tamaño de mamosferas y modifica la expresión de genes de pluripotencia en estos cultivos. (a) Células MCF7 obtenidas a partir de un cultivo en monocapa se cultivaron en mamosfera durante 14 días. Uno de estos cultivos recibió tratamiento con

Denosumab 1mg/ml durante los 14 días de crecimiento, hasta el fin del experimento. (b) Tasa de cambio, (c) diámetro y (d) volumen de mamosferas formadas por células MCF7 control y MCF7 tratadas con Denosumab durante 14 días de crecimiento en cultivos en mamosferas. Las gráficas representan el promedio de tres replicas independientes, con barras de error estándar. * $p < 0.033$ ** $p < 0.002$ *** $p < 0.001$. (e) Imágenes representativas de mamosferas formadas por células MCF7-Control y MCF7-Denosumab. (f) Expresión de marcadores de células troncales tumorales en cultivos en monocapa contra cultivos en mamosfera de la línea celular MCF7. La expresión de los genes fue normalizada utilizando el gen constitutivo TBP o 18S. La gráfica representa el promedio de dos réplicas biológicas con barras de desviación estándar. (g) Expresión de marcadores de células troncales tumorales en cultivos en mamosferas de células MCF7 control y MCF7 tratadas con Denosumab durante 14 días. La expresión de los genes fue normalizada utilizando el gen constitutivo TBP o 18S. La gráfica representa el promedio de dos réplicas biológicas con barras de desviación estándar. Las tasas de cambio de los experimentos fueron analizadas con respecto al grupo control. * $p < 0.033$ ** $p < 0.002$ *** $p < 0.001$.

Las CTT poseen un potencial auto-renovativo que les permite mantener los niveles de células troncales presentes en los tumores^{23,24}. Para evaluar el efecto de Denosumab en la capacidad de auto-renovación, se realizaron ensayos seriales de formación de esferas durante tres pases a partir de células MCF7 con o sin tratamiento con Denosumab. De manera interesante, el tratamiento con Denosumab no disminuyó el número de mamosferas formadas en los pases (Fig. 8a). Sorprendentemente el volumen de las mamosferas se vio reducido drásticamente en las tres generaciones de crecimiento (Fig. 8b, c). Este experimento nos da un indicio del potencial de Denosumab para disminuir la capacidad de formación de mamosferas a través del volumen durante tres pases de crecimiento de la línea celular MCF7.

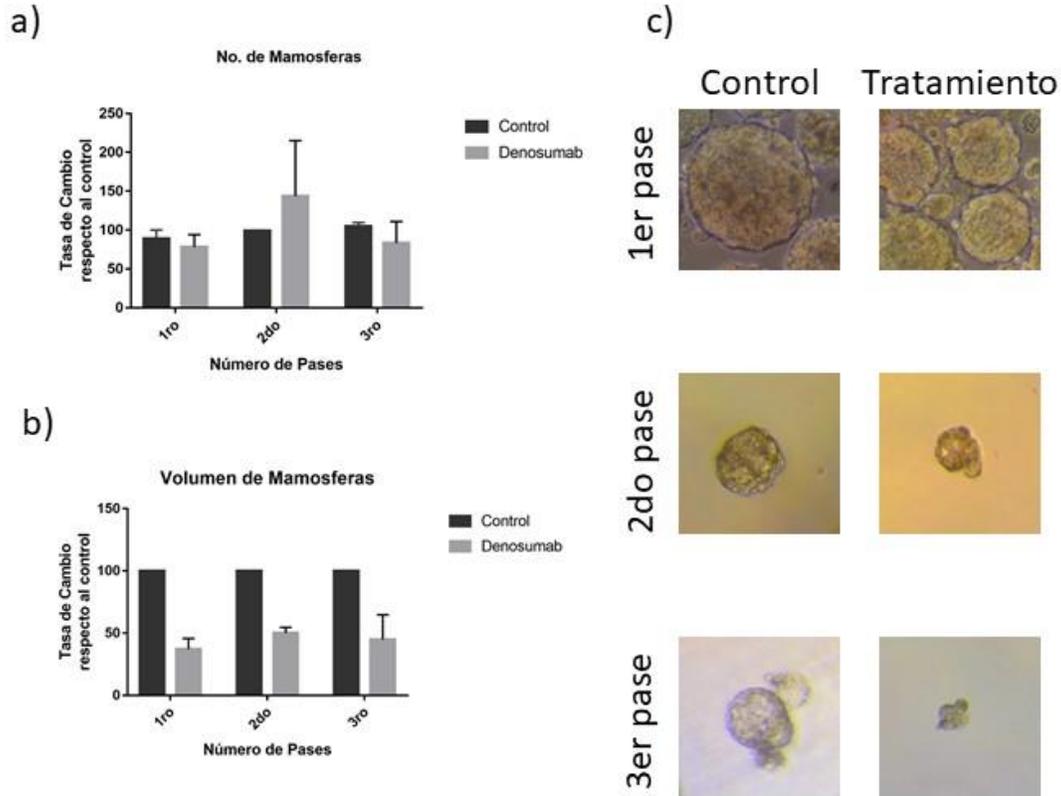


Figura 8. Denosumab disminuye el volumen de mamosferas de tres pases de crecimiento. Tasa de cambio del (a) número y (b) volumen de mamosferas formadas en tres generaciones de células MCF7 control y MCF7 Denosumab crecidas en cultivos en mamosferas. La tasa de cambio se analizó contra el grupo control. La gráfica representa dos réplicas independientes con barras de desviación estándar. (c) Imágenes representativas de mamosferas formadas por células MCF7 control y MCF7 tratadas con Denosumab en las tres generaciones.

Los resultados mostrados hasta ahora demuestran el potencial de la inhibición de RANKL para reducir la capacidad de formación de esferas de las células tratadas con Denosumab.

Para determinar si Denosumab puede actuar sobre esferas totalmente formadas, se realizaron cultivos en mamosferas mantenidas durante 14 días. Y posteriormente se trataron con Denosumab durante 14 días (Fig. 9a). Como era de esperarse, no se encontraron cambios en cuanto al número de mamosferas formadas en ambas condiciones

(Fig. 9b), sin embargo se observó una disminución drástica en el diámetro y volumen de las mamíferas formadas por células MCF7 tratadas con Denosumab (Fig. 9c, d, e). Estos resultados muestran el potencial de Denosumab para disminuir el tamaño de mamíferas previamente formadas.

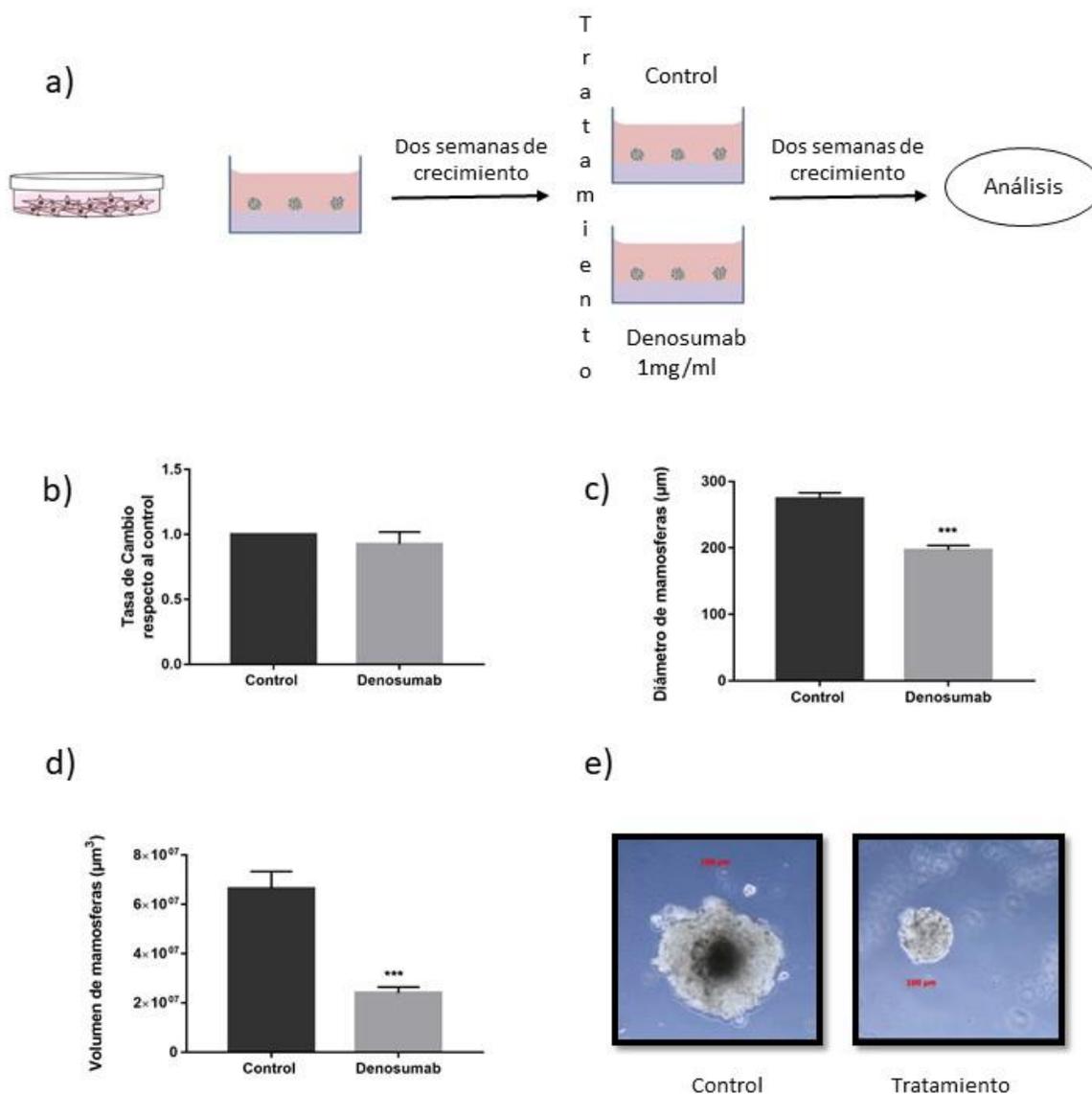


Figura 9. Denosumab disminuye el tamaño de mamíferas totalmente formadas. (a) Las mamíferas fueron crecidas en las mismas condiciones durante 14 días, posteriormente se comenzó el tratamiento con Denosumab 1mg/ml durante 14 días más. (b) Tasa de cambio, (c) diámetro y (d) volumen de mamíferas formadas por la línea células MCF7. Las gráficas representan el promedio de tres réplicas biológicas con barras

de error estándar. * $p < 0.033$ ** $p < 0.002$ *** $p < 0.001$. (e) Imágenes representativas de mamíferas formadas por MCF7 Control y MCF7 tratadas con Denosumab.

Debido al impacto de Denosumab en la disminución del tamaño de las esferas formadas por MCF7, se decidió evaluar el efecto del fármaco en la viabilidad celular durante un rango de tiempo de 24h-72h y con un rango de concentraciones de 250 μ g/ml–1mg/ml para así corroborar si el efecto observado en las mamíferas es debido a una disminución en la viabilidad de las células. Los resultados muestran que el tratamiento con tres concentraciones de Denosumab (250 μ g/ml, 500 μ g/ml ,1mg/ml) a 24, 48 y 72 horas no disminuyen la viabilidad, por el contrario, la administración de Denosumab logra aumentar la viabilidad de la línea celular MCF7 (Fig. 10). La administración de 1mg/ml con Denosumab aumenta de manera significativa la viabilidad de las células a las 48h del tratamiento. Estos resultados sugieren que Denosumab no afecta de manera negativa la viabilidad de la línea celular MCF7, sugiriendo otro mecanismo por el cual Denosumab disminuye el crecimiento de las esferas.

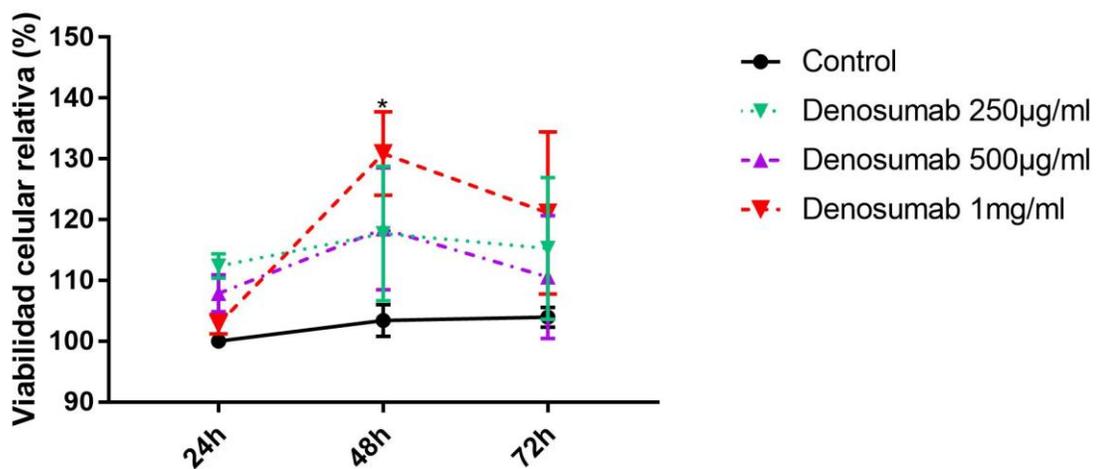


Figura 10. Denosumab no disminuye la viabilidad de la línea celular. Viabilidad relativa de las células MCF7 control y MCF7 tratadas por 24, 48 y 72 horas con Denosumab a tres concentraciones (250µg/ml, 500µg/ml y 1mg/ml). Lectura de absorbancia a 596nm. La gráfica representa el promedio de tres experimentos independientes con triplicado técnico, con barras de error estándar. Todos los datos se normalizaron contra el Control 24h. *p<0.033 **p<0.002 ***p<0.001.

Evidencias recientes, demuestran que las CTT tienen capacidad migratoria⁷⁰. Para evaluar el efecto de Denosumab en la capacidad de migración celular, se realizaron ensayos de migración en cámaras de Boyden durante 24 horas. Los datos muestran que el tratamiento con Denosumab disminuyó la capacidad de migración de la línea celular de manera significativa en cerca de un 20%. (Fig. 11).

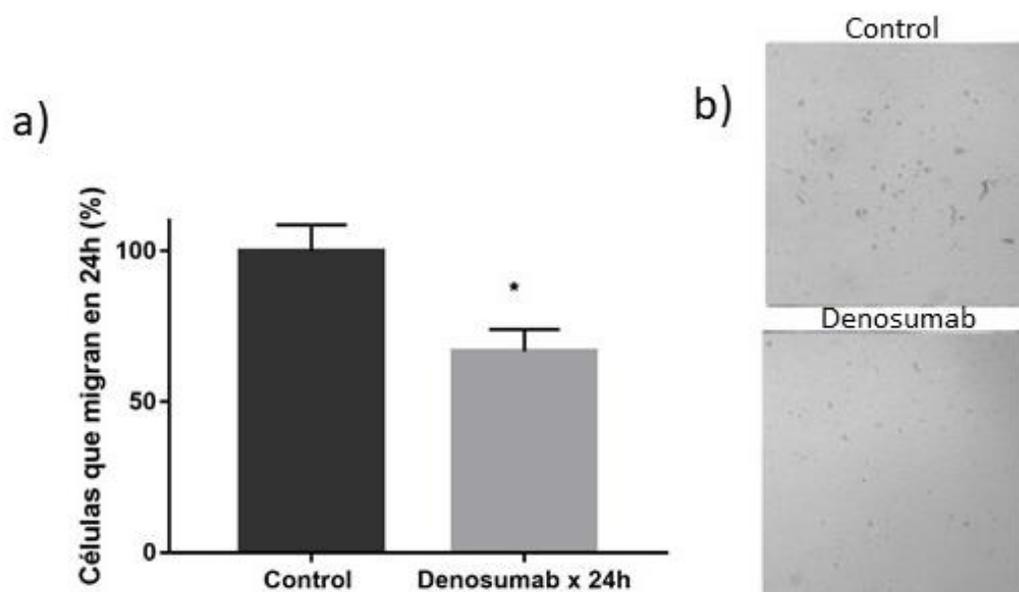


Figura 11. Denosumab disminuye la migración de la línea celular. Ensayos de migración de la línea celular MCF7 control y MCF7 tratada con Denosumab por 24 horas. (a) Cuantificación del porcentaje de células que migraron a través de una membrana de policarbonato después de 24 horas. La gráfica representa el promedio de tres experimentos independientes con triplicado técnico, con barras de error. *p<0.033 **p<0.002 ***p<0.001. (b) Imágenes representativas de cámaras de Boyden con las células que migraron en ambas condiciones teñidas con cristal violeta.

De acuerdo al modelo de Células Troncales del Cáncer, las CTT son las únicas células tumorales capaces de formar tumores *in vivo*²². Para evaluar el efecto de Denosumab en la capacidad tumorigénica *in vivo* se realizaron xenotransplantes en embriones de 48 horas de pez cebra. Aproximadamente 200, 300, 400 y 700 células tratadas con o sin Denosumab fueron inyectadas en embriones de pez cebra decorionados y anestesiados con tricaina. De manera interesante el tratamiento con Denosumab disminuyó la capacidad tumorigénica de la línea MCF7 (Fig. 12) Por otra parte se realizó un análisis de dilución limitada extrema (ELDA) para obtener la frecuencia de CTT presentes en la línea celular⁶⁹. Sorprendentemente la línea celular MCF7 control tiene una frecuencia estimada de 1 célula troncal por cada 975 células y la línea MCF7 tratada con Denosumab tienen una frecuencia de 1 células troncal por cada 3274 células (Fig. 12b, c, d). Estos datos en conjunto sugieren que Denosumab logra disminuir el potencial tumorigénico y población de CTT de la línea células MCF7 en un modelo *in vivo*.

a)

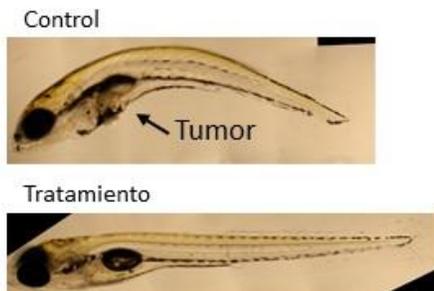
Grupo	Dosis	Número	Respuesta
Control	200	33	7
Denosumab	200	33	4
Control	300	35	14
Denosumab	300	37	16
Control	400	62	21
Denosumab	400	55	4
Control	700	19	5
Denosumab	700	17	1

b)

Intervalos de confianza
1/(frecuencia de CTT)

Grupo	Menor	Frecuencia (CTT)	Mayor	P. Value
Control	1306	975	729	0.02463 8
Denosumab	5452	3274	1966	

d)



c)

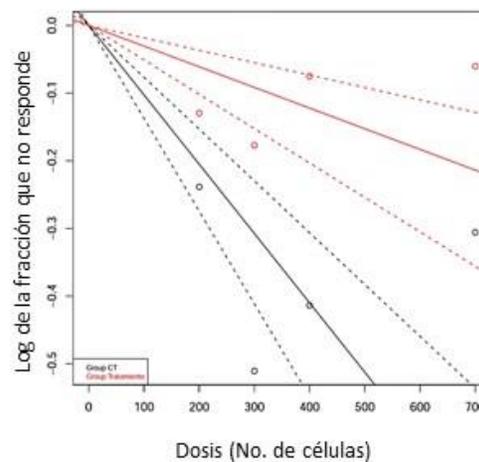


Figura 12. Denosumab disminuye la capacidad tumorigénica y la población de CTT *in vivo*. Ensayos tumorigénicos en modelos *in vivo* de pez cebra inoculados con células MCF7 control y células MCF7 tratadas con Denosumab durante 24h. (a) Aproximadamente 200, 300, 400 y 700 células fueron inoculadas en embriones de pez cebra de 48 horas. La tabla muestra el número de células inoculadas, número de peces y número de tumores formados en las dos condiciones experimentales (Respuesta). (b) La tabla representa el resultado del análisis ELDA, en donde se muestra la frecuencia de CTT en las dos condiciones. (c) La gráfica representa el análisis ELDA. El eje de las X representa el número de células inoculadas y el eje de las Y representa el logaritmo de la fracción de los peces que no formaron tumor. (d) Imágenes representativas de embriones de pez cebra inoculados con células MCF7 control y MCF7 tratadas con Denosumab por 24h. Las gráficas obtenidas son producto de tres experimentos independientes.

IX. DISCUSIÓN

Con el descubrimiento de las CTT la búsqueda de blancos específicos capaces de eliminar los tumores malignos ha generado un nuevo enfoque. Las CTT son células con la capacidad

de auto-renovarse, diferenciarse en células tumorales y capaces de repoblar los tumores^{23,24}. El desarrollo de nuevos fármacos con la habilidad de eliminar a la población de CTT en los tumores promete buenos resultados en el tratamiento del cáncer.

El presente trabajo demuestra que la inhibición de RANKL mediante el anticuerpo monoclonal Denosumab disminuye la población de CTT de cáncer de mama. La administración de Denosumab durante 48h es suficiente para disminuir la población de CTT ($CD44^+CD24^{-/bajo}$). Chu *et al.*, también demostraron que Denosumab posee la capacidad de disminuir la población $CD44^+CD24^-$ de cáncer de próstata, correlacionando con los resultados obtenidos en este experimento⁶⁶. De manera similar Yoldi *et al.*, mostró que la inhibición de RANKL mediante la proteína recombinante RANK-Fc disminuye la población troncal de tumores mamarios al inducir la diferenciación celular en modelos murinos *in vivo*.

La inhibición de RANKL mediante Denosumab disminuyó la expresión de los marcadores de pluripotencia OCT4, NANOG y algunos miembros de la familia de las ALDH (ALDH8A1 y ALDH1A3). Estos resultados correlacionan con los obtenidos por Chu *et al.*, donde el tratamiento con Denosumab en líneas celulares de cáncer de próstata disminuye la expresión de diversos marcadores de pluripotencia, entre ellos OCT4 y NANOG⁶⁶. El mecanismo por el cual RANK/RANKL regula la expresión de marcadores troncales es desconocido; sin embargo, se sabe que RANK/RANKL induce la activación de la vía NF- κ B³⁹. Liu *et al.*, demostró que la vía canónica de NF- κ B puede regular genes de pluripotencia como NANOG y SOX2⁷¹. De manera similar Vázquez-Santillán *et al.*, mostró que la expresión de los genes que codifican a las enzimas ALDH puede ser regulados por la vía de NF- κ B³⁵. Estos resultados en conjunto sugieren que la inhibición de los genes OCT4, NANOG ALDH8A1 y

ALDH1A3 posiblemente se encuentra relacionada con la inhibición de la vía NF-κB a través de la neutralización de RANKL, sin embargo, se requieren más estudios para poder corroborar esta hipótesis.

A pesar de que el porcentaje de CTT ($CD44^+CD24^{-/bajo}$) de la línea celular MCF7 fue de aproximadamente 0.15%, la inhibición farmacológica de RANKL fue suficiente para reducir aproximadamente el 50% de la población. De manera interesante esta reducción de la población impactó drásticamente en las características clonogénicas, y tumorigénicas de la línea celular MCF7. Los experimentos de este trabajo demuestran que a pesar del bajo porcentaje de CTT, el tratamiento con Denosumab es suficiente para modificar la actividad de la línea celular.

De manera interesante la administración de Denosumab logró disminuir drásticamente el tamaño de las mamosferas formadas. Estos resultados demuestran que Denosumab reduce el potencial clonogénico de la línea celular MCF7 probablemente por la disminución de la población troncal la cual es capaz de formar esferas cuando son cultivadas en baja adherencia. De manera contraria Cùyas *et al.*, demostró que la administración de Denosumab no es suficiente para disminuir el tamaño de mamosferas y proponen que es necesaria la combinación con Metformina para lograr disminuir el tamaño de las mamosferas formadas por la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-436 deficiente en BRCA1 ⁶⁸ Sin embargo, esto posiblemente puede ser explicado debido a la sensibilidad a fármacos de las diferentes líneas celulares.

La formación de mamosferas modifica la expresión de algunos marcadores de pluripotencia en células troncales tumorales. Los genes NANOG y ALDH8A1 aumentaron su expresión cuando las células fueron cultivadas en mamosferas y el gen ALDH1A3 disminuyó su expresión. Curiosamente, cuando las mamosferas fueron tratadas con Denosumab, estos mismos genes fueron regulados. La expresión de NANOG y ALDH8A1 disminuyó mientras que la expresión de ALDH1A3 se vio aumentada durante el tratamiento con Denosumab. De manera conjunta, estos resultados muestran que las células cultivadas en mamosferas expresan marcadores que favorecen la regulación de la población troncal y que la administración de Denosumab logra revertir estos efectos. Estos resultados sugieren que la vía de RANKL incide sobre la regulación de los marcadores troncales necesarios para la auto-renovación de CTT.

La administración de Denosumab logró disminuir el volumen de las mamosferas formadas durante tres pases celulares. Este experimento nos muestra que Denosumab podría disminuir el potencial clonogénico de la línea celular a través de las generaciones. De manera interesante, con respecto al número de mamosferas, no se observa ningún cambio. Estos resultados nos muestran que Denosumab logra disminuir la capacidad de formación de esferas de tres pases celulares a través de la disminución del volumen de las esferas, lo cual podría relacionarse con la capacidad auto-renovativa de las células.

La administración de Denosumab también afectó el tamaño de las mamosferas preformadas. Los resultados de estos experimentos pueden funcionar como analogía de lo que ocurre en un tumor *in vivo*. Este experimento es clave para mostrar el potencial de

Denosumab para actuar directamente sobre el tumor y disminuir el tamaño de masas celulares preexistentes.

De manera interesante, la administración de Denosumab no es suficiente para disminuir la viabilidad celular, por el contrario, las células tratadas con 1mg/ml de Denosumab presentan un aumento en la viabilidad celular. Estos resultados indican que Denosumab no ejerce ningún efecto sobre la viabilidad de las células, sin embargo, la administración de Denosumab es suficiente para reducir la población troncal tumoral. Estos resultados sugieren que Denosumab podría afectar la población de CTT a través de la inducción de diferenciación celular tal como lo demuestra Yoldi *et. al.*, en su artículo con la proteína recombinante RANK-Fc en cáncer de mama⁵⁹. Diversos estudios han demostrado que durante la diferenciación de las células troncales tumorales, las células pasan a un estadio más diferenciado de células "Tránsito-Amplificantes"^{72,73}. Las células tránsito-amplificantes son células con mayor tasa de proliferación, menor capacidad auto-renovativa y mayor grado de diferenciación que las células troncales^{74,75}. El efecto de aumento en la viabilidad de las células tratadas con Denosumab podría deberse a la diferenciación de las CTT a células tránsito-amplificante, las cuales por aumento en la proliferación generan un mayor número de células diferenciadas. No obstante, las células de tránsito-amplificante son células diferenciadas que tienen capacidad proliferativa limitada y no son tumorigénicas.

Debido a que Denosumab no afecta la viabilidad celular, se plantea que este fármaco pudiera actuar como inductor de diferenciación de células troncales tumorales. Esta característica de Denosumab hace factible la posibilidad de utilizar este fármaco como un antineoplásico dirigido hacia población troncal, el cual podría disminuir la masa tumoral sin

afectar a las células normales del paciente. Otros inhibidores de la vía de NF-κB como partenolide, pirrolidina-ditiocarbamato y dietil-ditiocarbamato son capaces de disminuir la población de CTT de cáncer de mama, sin embargo no presentan especificidad, ya que pueden alterar otras vías de señalización importantes y provocar la muerte de células normales haciendo riesgoso su uso como antineoplásico^{76,77}.

Está demostrado que las CTT presentes en los tumores tienen la capacidad de migrar e invadir tejidos distantes⁷⁰. La inhibición de RANKL con Denosumab disminuyó la capacidad de migración de la línea celular MCF7.

Está bien demostrado que la vía RANK/RANKL puede facilitar procesos de migración a hueso en diferentes tipos de cáncer, tal como en cáncer de mama⁵⁷, además de inducir el proceso de transición epitelio-mesénquima⁴⁰ y regular procesos de motilidad en cáncer⁴⁵. Estos procesos son importantes durante eventos metastásicos y de migración de células tumorales. Jones *et al.*, demostró que la estimulación con RANKL puede regular la migración de líneas celulares de cáncer de mama como MCF7⁷⁸. Estos resultados en conjunto pueden correlacionar la disminución de la población troncal en la disminución de la capacidad de migración de la línea celular.

Finalmente, el tratamiento con Denosumab logró disminuir la capacidad tumorigénica de la línea celular MCF7. Según el modelo de células troncales del cáncer solo las CTT poseen la capacidad de formar tumores *in vivo*. Los resultados muestran que Denosumab logra evitar la formación de tumores debido a la disminución de la población troncal de la línea celular. Mediante un análisis de dilución limitada extrema (ELDA) se corroboró que la

administración de Denosumab durante 24 horas es suficiente para disminuir la población de CTT de la línea celular MCF7. Estos resultados correlacionan con la disminución de la población $CD44^+, CD24^{-/bajo}$, la disminución de los marcadores de pluripotencia y la disminución en la capacidad de formación de mamosferas, demostrando así el potencial del fármaco en la disminución de las CTT.

Otros artículos sugieren que la inhibición de RANKL puede ser un posible blanco para tumores mamarios con mutación en el gen de reparación BRCA1⁵⁸. Sin embargo, esos resultados sugieren la inhibición de RANKL como medida preventiva contra el desarrollo de cáncer de mama en pacientes con mutación en BRCA1. El presente trabajo es el primero en demostrar que Denosumab es capaz de disminuir la población de CTT en una línea celular de tipo luminal⁷⁹.

X. CONCLUSIÓN

Los resultados presentados en este proyecto demuestran que Denosumab puede disminuir la población de CTT de la línea celular de cáncer de mama MCF7. Denosumab logró disminuir la expresión de marcadores de pluripotencia, la población $CD44^+, CD24^{-/bajo}$, la capacidad de formación de mamosferas, la migración y la capacidad tumorigénica *in vivo* de las células.

El tratamiento con Denosumab aumentó la viabilidad celular, sin embargo, mediante una terapia combinada con fármacos quimioterapéuticos convencionales se podría controlar este efecto y así eliminar el tumor de manera eficiente.

El presente trabajo muestra el potencial de Denosumab como posible fármaco antineoplásico dirigido contra la población troncal el cual podría disminuir masas tumorales de manera específica a través de la inhibición de la auto-renovación y/o diferenciación de la población de CTT sin afectar a las células normales.

XI. PERSPECTIVAS

El presente trabajo muestra el potencial de Denosumab para disminuir la población de CTT en la línea celular MCF7 de cáncer de mama. Sin embargo, la línea celular MCF7 es una línea con características moleculares de fenotipo Luminal A⁷⁹. Es necesario realizar experimentos en líneas celulares con fenotipos más agresivos, tales como Luminales B, HER2+, Basales y Bajos en Claudina las cuales tienen un mayor número de CTT y así corroborar el efecto de Denosumab en un mayor panorama de tumores mamarios.

Los resultados mostraron que Denosumab disminuye la expresión de los marcadores de pluripotencia, sin embargo, el mecanismo molecular por el cual Denosumab logra disminuir esta expresión no está demostrado con claridad. El estudio del mecanismo por el cual Denosumab logra disminuir la expresión de los marcadores pluripotentes y el fenotipo de CTT podría aportar información relevante al estudio aquí presentado.

Estudios recientes demuestran que RANK no es el único receptor con el cual puede interactuar RANKL. El receptor LGR4 es un receptor que puede ser activado por RANKL en células de pre-osteoclastos y evitar su diferenciación a osteoclastos maduros⁸⁰. Además el receptor LGR4 a través del ligando R-spondin (RSPO) se ha visto capaz de regular el fenotipo de las CTT e involucrarse en la iniciación, progresión y metástasis tumoral en cáncer de mama⁸¹. El estudio de la activación de LGR4 por RANKL y su papel en el mantenimiento del fenotipo de las CTT de cáncer de mama podría proporcionar mayor información sobre el mecanismo molecular por el cual Denosumab disminuye la población de CTT.

Sorprendentemente, el tratamiento con Denosumab logró disminuir el tamaño, sin embargo, no disminuyó el número de las mamosferas formadas por la línea celular MCF7. Demostrar el proceso por el cual Denosumab no permite el crecimiento de las mamosferas podría brindar información útil sobre las ventajas del uso de Denosumab en pacientes con cáncer.

Ensayos que demuestren la diferenciación de las CTT a células tránsito-amplificantes son requeridos para poder relacionar este proceso con el aumento en la viabilidad. El estudio del uso de Denosumab en combinación con fármacos convencionales quimioterapéuticos podría proveer información sobre la capacidad de estas combinaciones farmacológicas para disminuir la agresividad de las células tumorales y detener la progresión tumoral.

El estudio de CTT en modelos *in vivo* proporciona información sobre el potencial tumorigénico de las células²⁶. El uso de ratones inmunodeficientes como modelo biológico es uno de los modelos más aceptados para el estudio del cáncer. El presente trabajo

muestra un ensayo *in vivo* utilizando pez cebra como modelo, sin embargo es necesario la realización de ensayos en modelos murinos para verificar los resultados observados.

El estudio en muestras de pacientes provee una información más cercana sobre el posible efecto del fármaco en un paciente. El desarrollo de organoides celulares a partir de muestras de pacientes podría proveer información sobre posibles biomarcadores de respuesta ante la administración de Denosumab^{82,83}.

Debido a que las concentraciones de Denosumab utilizadas en este proyecto son altas, el tratar de alcanzar estas concentraciones en ensayos clínicos de pacientes con tumores mamarios es un reto. La utilización de nanopartículas acopladas al anticuerpo podría permitir alcanzar estas concentraciones de manera más directa y específica.

Finalmente se deben realizar ensayos que muestren los posibles efectos citotóxicos del fármaco a la concentración propuesta. Utilizando las mismas concentraciones de Denosumab en células normales, muestras de pacientes o mediante ensayos *in vivo* se podría mostrar el posible efecto que tiene Denosumab sobre las células sanas en esas concentraciones.

XII. REFERENCIAS

1. Pecorino, L. *Molecular Biology of Cancer*. (2008).
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
3. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN. (2012). Available at: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>. (Accessed: 12th December 2017)

4. Mohar-Betancourt, A., Reynoso-Noverón, N., Armas-Texta, D., Gutiérrez-Delgado, C. & Torres-Domínguez, J. Cancer Trends in Mexico : Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies. *J. Glob. Oncol.* **3**, 740–748 (2017).
5. Weinberg, R. A. *The Biology of Cancer*. (2013).
6. Society, A. C. What Is Breast Cancer ? *Breast Cancer* **5**, 3–12 (2012).
7. Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H. & Band, V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology and Therapy* **10**, 955–960 (2010).
8. Makki, J. Diversity of Breast Carcinoma : Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin. Med. Insights Pathol.* **8**, 23–31 (2015).
9. Weigelt, B., Geyer, F. C. & Reis-filho, J. S. Histological types of breast cancer : How special are they ? *Mol. Oncol.* **4**, 192–208 (2010).
10. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
11. Sørli, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *PNAS* **100**, 8418–8423 (2003).
12. Herschkowitz, J. I. *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* **8**, 1–17 (2007).
13. Prat, A. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **12**, (2010).
14. Yersal, O. & Barutca, S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J. Clin. Oncol.* **5**, 412–24 (2014).
15. Ades, F., Zardavas, D., Bozovic-spasojevic, I., Pugliano, L. & Fumagalli, D. Luminal B Breast Cancer : Molecular Characterization , Clinical Management , and Future Perspectives. *J. Clin. Oncol.* **32**, 2794–2805 (2014).
16. Leidy, J., Khan, A. & Kandil, D. Basal-Like Breast Cancer. Update on Clinicopathologic, Immunohistochemical and Molecular Features. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **138**, 37–43 (2014).
17. Sabatier, R. *et al.* Claudin-low breast cancers: Clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. *Mol. Cancer* **13**, 1–14 (2014).
18. Eroles, P., Bosch, A., Alejandro Pérez-Fidalgo, J. & Lluch, A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat. Rev.* **38**, 698–707 (2012).
19. Geyer, F. C., Lopez-Garcia, M. A., Lambros, M. B. & Reis-Filho, J. S. Genetic characterization of breast cancer and implications for clinical management. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 4090–4103 (2009).

20. Prat, A. & Perou, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.* **5**, 5–23 (2011).
21. Visvader, J. E. & Lindeman, G. J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 755–768 (2008).
22. Campbell, L. L. & Polyak, K. Breast tumor heterogeneity: Cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* **6**, 2332–2338 (2007).
23. Fulawka, L., Donizy, P. & Halon, A. Cancer stem cells--the current status of an old concept: literature review and clinical approaches. *Biol. Res.* **47**, 66 (2014).
24. 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).
25. Koren, E. & Fuchs, Y. The bad seed: Cancer stem cells in tumor development and resistance. *Drug Resist. Updat.* **28**, 1–12 (2016).
26. Bozorgi, A., Khazaei, M. M. R. & Khazaei, M. M. R. New Findings on Breast Cancer Stem Cells: A Review. *J. Breast Cancer* **18**, 303–12 (2015).
27. Nigam, A. Breast Cancer Stem Cells, Pathways and Therapeutic Perspectives 2011. *Indian J. Surg.* **75**, 170–180 (2013).
28. Park, S. Y. *et al.* Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **16**, 876–887 (2010).
29. Liu, A., Yu, X. & Liu, S. Pluripotency transcription factors and cancer stem cells : small genes make a big difference. *Chin. J. Cancer* **32**, 483–487 (2013).
30. Spence, K. *et al.* A Detailed Mammosphere Assay Protocol for the Quantification of Breast Stem Cell Activity. *J. Mammary Glans Biol. Neoplasia* **12**, (2012).
31. Dontu, G. *et al.* In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem / progenitor cells. *Genes Dev.* 1253–1270 (2003). doi:10.1101/gad.1061803.potential
32. Lombardo, Y., de Giorgio, A., Coombes, C. R., Stebbing, J. & Castellano, L. Mammosphere Formation Assay from Human Breast Cancer Tissues and Cell Lines. *J. Vis. Exp.* 1–5 (2015). doi:10.3791/52671
33. Yang, F., Xu, J., Tang, L. & Guan, X. Breast cancer stem cell: the roles and therapeutic implications. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 951–966 (2017).
34. Yamamoto, M. *et al.* NF- κ B non-cell-autonomously regulates cancer stem cell populations in the basal-like breast cancer subtype. *Nat. Commun.* **4**, 1–13 (2013).
35. Vazquez-Santillan, K. *et al.* NF-kappaB-inducing kinase regulates stem cell phenotype in breast cancer. *Sci. Rep.* **6**, 37340 (2016).
36. Shih, V. F.-S., Tsui, R., Caldwell, A. & Hoffmann, A. A single NF κ B system for both

- canonical and non-canonical signaling. *Cell Res.* **21**, 86–102 (2011).
37. Hayden, M. S. & Ghosh, S. Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell* **132**, 344–362 (2008).
 38. Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J. & Matias-Guiu, X. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* **446**, 475–482 (2005).
 39. Sun, S. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Nat. Publ. Gr.* **21**, 71–85 (2010).
 40. Palafox, M. *et al.* RANK induces epithelial-mesenchymal transition and stemness in human mammary epithelial cells and promotes tumorigenesis and metastasis. *Cancer Res.* **72**, 2879–2888 (2012).
 41. Schramek, D. *et al.* Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progesterin-driven mammary cancer. *Nature* **468**, 98–102 (2010).
 42. Akiyama, T., Shinzawa, M. & Akiyama, N. TNF receptor family signaling in the development and functions of medullary thymic epithelial cells. *Front. Immunol.* **3**, 1–9 (2012).
 43. Sigl, V. & Penninger, J. M. RANKL/RANK - From bone physiology to breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 205–214 (2014).
 44. Yoneda, T. Role of RANKL/RANK in primary and secondary breast cancer. *World J. Orthop.* **4**, 178 (2013).
 45. Renema, N., Navet, B., Heymann, M.-F., Lezot, F. & Heymann, D. RANK-RANKL signalling in cancer. *Biosci. Rep.* **36**, e00366–e00366 (2016).
 46. Bachmann, M. F. *et al.* TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation. *J. Exp. Med.* **189**, 1025–31 (1999).
 47. Josien, R. *et al.* TRANCE , a Tumor Necrosis Factor Family Member , Enhances the Longevity and Adjuvant Properties of Dendritic Cells In Vivo. *J. Exp. Med.* **191**, 495–501 (2000).
 48. Akiyama, T. RANKL-RANK interaction in immune regulatory systems. *World J. Orthop.* **3**, 142 (2012).
 49. Cheng, M. L. & Fong, L. Effects of RANKL-Targeted Therapy in Immunity and Cancer. *Front. Oncol.* **3**, 1–8 (2014).
 50. Lacey, D. L. *et al.* Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell* **93**, 165–176 (1998).
 51. Yasuda, H. *et al.* Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin—osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE—RANKL. *Cell Biol.* **95**, 3597–3602 (1998).
 52. Castellano, D. *et al.* The Role of RANK-Ligand Inhibition in Cancer: The Story of

- Denosumab. *Oncologist* **16**, 136–145 (2011).
53. Fata, J. E. *et al.* The Osteoclast Differentiation Factor Osteoprotegerin-Ligand Is Essential for Mammary Gland Development. *Cell* **103**, 41–50 (2000).
 54. Sigl, V., Jones, L. P. & Penninger, J. M. RANKL/RANK: from bone loss to the prevention of breast cancer. *Open Biol.* **6**, 160230 (2016).
 55. Pfitzner, B. M. *et al.* RANK expression as a prognostic and predictive marker in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **145**, 307–315 (2014).
 56. Mercatali, L. *et al.* Bone metastases detection by circulating biomarkers : OPG and RANK-L. *Int. J. Oncol.* **39**, 255–261 (2011).
 57. Blake, M. L., Tometsko, M., Miller, R., Jones, J. C. & Dougall, W. C. RANK expression on breast cancer cells promotes skeletal metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **31**, 233–245 (2014).
 58. Nolan, E. *et al.* RANK ligand as a potential target for breast cancer prevention in BRCA1-mutation carriers. *Nat. Med.* **22**, 933–939 (2016).
 59. Yoldi, G. *et al.* RANK signaling blockade reduces breast cancer recurrence by inducing tumor cell differentiation. *Cancer Res.* **76**, 5857–5869 (2016).
 60. Wicha, M. S. Targeting self-renewal, an Achilles' heel of cancer stem cells. *Nat. Med.* **20**, 14–15 (2014).
 61. Verastem. No Title. Available at: <http://verastem.com/research/>. (Accessed: 18th January 2018)
 62. Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, Appelbaum FR, Feusner JH, Ogden A, Shepherd L, Willman C, Bloomfield CD, Rowe JM, W. P. All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **337**, 1021–1028 (1997).
 63. Herreros-Villanueva, M., Er, T.-K. & Bujanda, L. Retinoic Acid Reduces Stem Cell-Like Features in Pancreatic Cancer Cells. *Pancreas* **44**, 918–924 (2015).
 64. El-Metwally, T. H. & Adrian, T. E. Optimization of Treatment Conditions for Studying the Anticancer Effects of Retinoids Using Pancreatic Adenocarcinoma as a Model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 596–603 (1999).
 65. Dendawate, P. R., Subramaniam, D., Jensen, R. A. & Anant, S. Targeting cancer stem cells and signaling pathways by phytochemicals: Novel approach for breast cancer therapy. *Semin. Cancer Biol.* **106**, 192–208 (2016).
 66. Chu, G. C. Y. *et al.* RANK-and c-Met-mediated signal network promotes prostate cancer metastatic colonization. *Endocr. Relat. Cancer* **21**, 311–326 (2014).
 67. Cuyàs, E. *et al.* BRCA1 haploinsufficiency cell-autonomously activates RANKL expression and generates denosumab-responsive breast cancer-initiating cells. *Oncotarget* **5**, 35019–35032 (2017).

68. Cuyàs, E., Martín-castillo, B., Bosch-barrera, J. & Javier, A. Metformin inhibits RANKL and sensitizes cancer stem cells to denosumab. *Cell Cycle* **4101**, (2017).
69. 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).
70. López-Lázaro, M. The migration ability of stem cells can explain the existence of cancer of unknown primary site. Rethinking metastasis. *Oncoscience* **2**, 467–75 (2015).
71. Liu, M. *et al.* The canonical NF-kappaB pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer Res.* **70**, 10464–73 (2010).
72. Aponte, P. M. & Caicedo, A. Stemness in cancer: Stem cells, cancer stem cells, and their microenvironment. *Stem Cells Int.* **2017**, (2017).
73. Gilbert, C. A. & Ross, A. H. Cancer Stem Cells: Cell Culture, Markers and Targets for New Therapies. *Cell* **306**, 1031–1038 (2009).
74. Rangel-Huerta, E. & Maldonado, E. Transit-Amplifying Cells in the Fast Lane from Stem Cells towards Differentiation. *Stem Cells Int.* **2017**, 1–10 (2017).
75. Díaz-Flores, L. *et al.* Adult stem and transit-amplifying cell location. *Histol. Histopathol.* **21**, 995–1027 (2006).
76. Zhou, J. *et al.* NF-κB pathway inhibitors preferentially inhibit breast cancer stem-like cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **111**, 419–427 (2008).
77. Carlisi, D. *et al.* Parthenolide and DMAPT exert cytotoxic effects on breast cancer stem-like cells by inducing oxidative stress, mitochondrial dysfunction and necrosis. *Cell Death Dis.* **7**, e2194-13 (2016).
78. Jones, D. H. *et al.* Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* **440**, 692–696 (2006).
79. Mota, A. de L. *et al.* Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical markers. *Oncol. Lett.* **13**, 4708–4712 (2017).
80. Luo, J. *et al.* LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Nat. Med.* **22**, 539–546 (2016).
81. Yue, Z. *et al.* LGR4 modulates breast cancer initiation, metastasis, and cancer stem cells. *FASEB J.* **4**, fj.201700897R (2017).
82. Weeber, F., Ooft, S. N., Dijkstra, K. K. & Voest, E. E. Tumor Organoids as a Pre-clinical Cancer Model for Drug Discovery. *Cell Chem. Biol.* **24**, 1092–1100 (2017).
83. Jabs, J. *et al.* Screening drug effects in patient-derived cancer cells links organoid responses to genome alterations. *Mol. Syst. Biol.* **13**, 955 (2017).

