



Estudio de la vía de señalización de RANK y RANKL en células de mama humanas y generación de ortoxenopacientes de cáncer de mama

Marta Palafox Sánchez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

PROGRAMA DE BIOMEDICINA

**Estudio de la vía de
señalización de RANK y RANKL
en células de mama humanas y
generación de
ortoxenopacientes de cáncer
de mama**

MARTA PALAFOX SÁNCHEZ. 2014.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE EPIGENÉTICA Y BIOLOGÍA DEL CÁNCER (PEBC)

PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOMEDICINA

**Estudio de la vía de señalización de RANK y RANKL en
células de mama humanas y generación de
ortoxenopacientes de cáncer de mama**

Memoria presentada por Marta Palafox Sánchez para optar al título de doctor por la
universidad de Barcelona

Directora: Eva González Suárez

Doctoranda: Marta Palafox Sánchez

Tutor: Esteban Ballestar Tarín

MARTA PALAFOX SÁNCHEZ. 2014.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento al Dra. Eva González Suárez, mi guía durante todos estos años en el mundo de la ciencia. Gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral. Gracias por tu dedicación, que me ha ayudado tanto en mi crecimiento profesional como personal.

Gracias al PEBC y al IDIBELL por el apoyo y el soporte prestado durante estos años de tesis doctoral.

Gracias a mis compañeros, especialmente a Jorge, Pasquale, Alex, Sergi e Irene, por los buenos ratos que hemos pasado juntos. Gracias también a Guillermo, Gonzalo, Héctor, Eva, Vicky, María, Pili, Adriá, Toni y Ari. Ya os lo he dicho muchas veces, pero creo que nunca tendré la suerte de volver a tener unos compañeros como vosotros y que por ello mis próximos trabajos serán mucho más aburridos.

Gracias a toda la gente del PEBC por su amabilidad y su hospitalidad.

Gracias a mis amigas (Elena, Marta, Loli, Lucía, Carol y Begoña) por sus visitas a Barcelona y los buenos momentos que, a pesar de que pasen los años, siempre seguiremos disfrutando juntas.

Gracias a Felipe y a Letizia por la alegría que me han transmitido cuando volvía a casa después de un largo día de trabajo.

Gracias a mi familia, sobre todo, gracias mis padres. Sin vosotros jamás hubiera llegado donde hoy me encuentro. Gracias por creer siempre en mí y por alentarme desde pequeña a ser “alguien” en la vida. Gracias estar siempre ahí y ayudarme a levantarme siempre que me he caído. Gracias por vuestro apoyo incondicional. Os quiero.

Esta tesis está dedicada a mi abuela Milagros:

Abuela, de pequeña siempre me animabas a que estudiara para que de mayor pudiera curarte cuando estuvieran enferma. Siento no haber podido hacer más por ti, pero espero que este trabajo pueda servir de ayuda para que en un futuro nadie tenga que volver a pasar por lo que tú pasaste. Te quiero y siempre siempre me servirás de motivación para seguir luchando.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	17
RESUMEN GENERAL	23
INTRODUCCIÓN	
Glándula mamaria	29
<i>Definición y función de la glándula mamaria</i>	29
<i>Anatomía de la glándula mamaria humana</i>	29
<i>Jerarquía de las células mamarias humanas adultas</i>	30
<i>Desarrollo de la glándula mamaria</i>	31
Cáncer de mama	32
<i>Definición de cáncer de mama</i>	32
<i>Incidencia</i>	33
<i>Tipos</i>	33
Según el origen anatómico	33
Según la expansión de la neoplasia	34
Clasificación clínica	34
Clasificación molecular	35
Tumores hereditarios	37
Tumores poco frecuentes	39
<i>Fases</i>	40
<i>Grados histológicos</i>	41
<i>Tratamiento y resistencia</i>	41
Quimioterapia	42
Tratamiento hormonal	43

Terapia dirigida contra Her2	44
Inhibidores de PARP	45
Cisplatino	46
Otros tratamientos en desarrollo	47
<i>Supervivencia y mortalidad</i>	47
Vía de señalización de RANK y RANKL	48
<i>Componentes de la vía</i>	48
<i>Vías de señalización activadas por la unión de RANK y RANKL</i>	49
<i>Funciones de la vía</i>	51
Metabolismo y metástasis ósea	51
Interacción del sistema inmune con el huso	53
Desarrollo y activación del sistema inmune	53
Desarrollo de la glándula mamaria en ratón	54
Tumorigénesis en glándula mamaria de ratón	56
Biología de MaSC en ratón	57
Otras funciones	58
<i>Inhibición de la vía de señalización de RANK y RANKL como diana terapéutica</i>	58
Procesos biológicos implicados en el desarrollo y progresión del cáncer de mama	59
<i>Transición epitelio-mesenquima (EMT)</i>	59
Regulación de EMT	59
Tipos de EMT	60
<i>Adquisición de características de CSCs</i>	61
CSCs humanas	62

<i>EMT y CSCs</i>	63
Vías de señalización implicadas en cáncer de mama	63
<i>Vía de señalización de TGFβ</i>	63
<i>Vía de señalización de NF-κB</i>	66
<i>Vía de señalización de MAPKs y Pi3K/Akt</i>	68
OBJETIVOS	73
RESULTADOS	77
Artículo 1	
<i>Resumen en castellano</i>	83
<i>Existencia de una correlación entre TNFRSF11A y el riesgo de cáncer de mama</i>	85
Artículo 2	
<i>Resumen en castellano</i>	99
<i>RANK induce transición epitelio mesénquima y características de células madre en células epiteliales de mama humanas y promueve la tumorigénesis y la metástasis</i>	101
Artículo 3	
<i>Resumen en castellano</i>	133
<i>Un loop autocrino de TGFβ media el fenotipo EMT estable inducido por RANK en células MCF10A mientras que el fenotipo Stem es transitorio y mediado por la vía de señalización de ERK</i>	135
Artículo 4	
<i>Resumen en castellano</i>	181

<i>Ortoxenopacientes de cáncer de mama, un paso más cerca de la medicina personalizada</i>	183
--	-----

DISCUSIÓN GENERAL 249

Función de la vía de señalización de RANK y RANKL en cáncer de mama humano 249

<i>RANK y activación constitutiva de las vías de NF-κB, MAPKs y Pi3K</i>	250
--	-----

<i>RANK y Transición epitelio mesénquima (EMT)</i>	251
--	-----

<i>Vía de señalización de TGFβ</i>	252
---	-----

<i>Vías de señalización de NF-κB, MAPKs and Pi3K/Akt</i>	254
--	-----

<i>RANK y Stemness</i>	255
------------------------	-----

<i>RANK y Transformación celular</i>	255
--------------------------------------	-----

RANK en muestras de pacientes de cáncer de mama 259

<i>Correlación de SNPs en el gen de RANK con riesgo de cáncer de mama</i>	261
---	-----

<i>Análisis de la expresión de RANK en muestras clínicas de de cáncer de mama</i>	261
---	-----

Generación de modelos ortotópicos de cáncer de mama humano 263

<i>Análisis de los modelos obtenidos y aplicación clínica</i>	263
---	-----

<i>Generación de modelos resistentes a Docetaxel y empleo en el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas en cáncer de mama</i>	266
--	-----

CONCLUSIONES 271

BIBLIOGRAFÍA 277

ABREVIATURAS

24h: 24 horas

48h: 48 horas

72h: 72 horas

ANOVA: Analisis de varianza

-APC: -Allophycocyanin

ARN: Ácido ribonucleico

BC: Breast cancer

BRCA1: Breast Cancer 1

cADN: ADN complementario

CSC: Cancer Stem Cell

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido Ethylenediaminetetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EMT: Transición Epitelio-Mesenquima

ER: Receptor de estrógeno

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares

FACS: Análisis por citometría de flujo

FBS: Suero Bovino Fetal

-FITC: Fluorescein Isothiocyanate

H&E: Hematoxilina y eosina

HEPES: Ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfónico

HER2: v-erb-b2 Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2

HP: Hiperplasia

ID2: Inhibidor de unión al DNA 2

IFN- γ : Interferon γ

IL: Interleuquina

KO: Knock-Out

MAPK: Quinasa activada por mitógeno

MaSC: Célula madre mamaria

MCF10: Michigan Cancer Foundation-10

MIN: Neoplasia intraepithelial mamaria

MPA: Medroxyprogesterona

mARN: Ácido ribonucleic mensajero

NF-κB: Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells

NK: Natural Killer

NOD: Non Obese Diabetic

OPG: Osteoprotegerin

p1, p2: Pase1, Pase 2

P4: Progesterona

p38: proteína activada por mitógenos 38

P53: Tumor Protein p53

PBS: Bafer fosfato salino

-PE: Phycoerythrin

PFA: Paraformaldehído

PI3K: Phosphoinositide-3-Kinase

PP1A: Protein Phosphatase 1

PR: Receptor de progesterona

PRL: Prolatina

PrIR: Receptor de prolactina

PTHrP: Receptor de hormona paratiroidea 1

RANK: Receptor Activador del Factor Nuclear κ B

RANKL: Ligando Receptor Activador del Factor Nuclear κ B

RAS: Rat Sarcoma Viral Oncogene

RB: Retinoblastoma 1

SCID: Severe Combined Immunodeficiency

SNP: polimorfismo de nucleotide símple

TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta

TICs: Células iniciadoras de tumores

TNF: Factor de necrosis tumoral

TRANCE: TNF-Related Activation-Induced Cytokine

Tris: Tris(Hydroxymethyl)Aminomethana

WT: Silvestre

RESUMEN GENERAL

La implicación de vía de señalización de RANK y RANKL en desarrollo de la glándula mamaria y cáncer de mama ha sido caracterizada en modelos murinos durante los últimos años, ya que se ha demostrado que RANKL es principal mediador del efecto proliferativo de la progesterona tanto durante el desarrollo fisiológico como durante la tumorigénesis. Sin embargo, la implicación de RANK y RANKL en la iniciación y desarrollo de cáncer de mama humano y las metástasis no óseas, así como los mecanismos responsables de su acción, no se conocían.

En este trabajo de tesis doctoral hemos analizado el efecto de la vía de señalización de RANK y RANKL en líneas celulares humanas no transformadas. Se observa que la sobre-expresión de RANK induce EMT, un aumento de la migración celular, y características de células madre (stemness), marcadores $CD44^+CD24^{-/low}$ y la capacidad de generar *in vivo* ductos mamarios.

El fenotipo stemness es transitorio y está mediado por la activación de la vía de señalización de ERK mientras que el fenotipo EMT se acentúa con los meses y está mediado por la activación de TGF β . Las vías NF- κ B, p38 y ERK inducen la expresión de los ligandos de TGF β , activando Smad3. La activación de TGF β regula la producción de sus propios ligandos, dándose un bucle de retro-alimentación positivo que mantiene y exacerba el fenotipo EMT.

Además, la sobre-expresión de RANK en células no tumorales induce características de transformación pero no induce la formación de tumores en ratón, mientras que su sobre-expresión en células tumorales aumenta la población de CSC $CD44^+CD24^{-/low}$ incrementando la capacidad tumorigénica y metastática de estas células.

Además hemos descrito la asociación entre un SNP en el gen RANK (*TNFRSF11A*) con el riesgo de padecer cáncer de mama en la población general y en portadores de mutaciones en el gen BRCA2. El análisis de los niveles de expresión de RANK y RANKL en muestras clínicas de pacientes indica que la expresión de RANK es mayor en tumores con peor pronóstico clínico (alto índice de proliferación, grado patológico y ausencia de receptores hormonales) y que hay una asociación entre la expresión de RANK y RANKL y tumores metastáticos.

Finalmente, se han generado cinco modelos ortotópicos de cáncer de mama los cuales mantienen las características histológicas y los patrones de metástasis del tumor de origen. Los diferentes tipos de tumores obtenidos son una fiel representación de los existentes en clínica. Además, se ha testado su sensibilidad a docetaxel y se han generado modelos resistentes a esta droga a partir de modelos inicialmente sensibles.

INTRODUCCIÓN

GLÁNDULA MAMARIA

Definición y función de la glándula mamaria

La glándula mamaria es un órgano único de la clase *Mammalia*, con la función específica de sintetizar, secretar y proporcionar leche a los recién nacidos para su óptimo cuidado, protección y desarrollo después del parto (Hassiotou F 2013).

Anatomía de la glándula mamaria humana

La mama humana adulta está formada básicamente por: tejido glandular, encargado de la producción de leche durante el período de lactancia y el estroma, que rodea a la parte glandular y le proporciona consistencia (Medina 1996).

El tejido glandular está constituido por ductos y alveolos. Los alveolos son estructuras con forma de saco donde se produce la leche. Varios alveolos se agrupan formando estructuras mayores en forma de racimo llamadas lóbulos. Los ductos o conductos galactóforos son unos tubos que unen a los alveolos entre sí y conducen la leche hacia el pezón (Stingl J 2006) (Figura 1). Histológicamente, tanto ductos como alveolos están formados por: un lumen hueco, una capa luminal de células epiteliales cuboidales polarizadas capaces de diferenciar a células productoras de leche (lactocitos) durante la fase de lactancia (Rosen 2008), una capa basal formada por células mioepiteliales contráctiles y la membrana basal (Hassiotou F 2013). En la capa basal de los ductos y alveolos también se encuentran las células madre mamarias (MaSC) (Kordon E. C 1998).

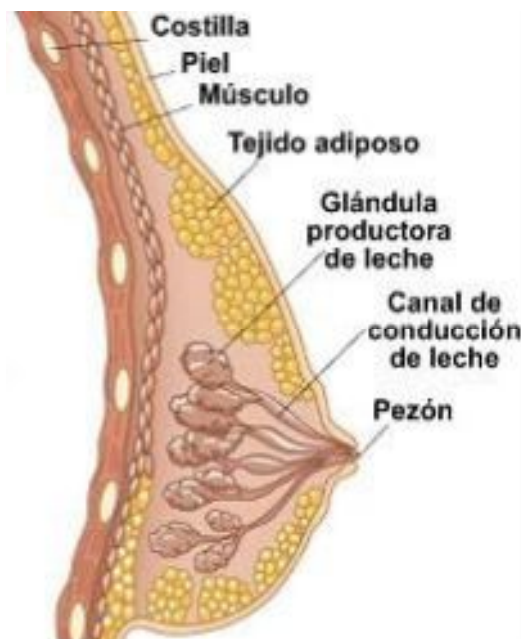


Figura 1. Estructura anatómica de una mama humana adulta. Imagen procedente de <http://www.mentorcorp.com>

El estroma está formado por tejido conectivo y tejido adiposo. Además, contiene células mesenquimales muy sensibles al ambiente hormonal que pueden interactuar con las células del epitelio mamario (Watson CJ 2008).

Jerarquía de las células mamarias humanas adultas

Igual que en el caso de las células hematopoyéticas, las células epiteliales de mama se organizan de una forma jerárquica (Figura 2). La existencia de células de mama progenitoras (MaSC) permite el mantenimiento del resto de tipos celulares de la mama. Las células diferenciadas de la capa luminal se caracterizan por ser EpCAM⁺, CD49f^{low}, CK8, CK18, CK19, GATA-3, MUC1⁺, ER⁺ y PR⁺ (Visvader 2009). Dentro del compartimento luminal también se puede diferenciar una población EpCAM⁺, CD49f⁺, c-KIT, ER^{low} y PR^{low} que son células lumbinales progenitoras ya que en cultivo pueden formar colonias de características lumbinales aunque no son capaces de reconstituir la estructura de una mama cuando son inyectadas en glándula mamaria de ratones. Estas células son las encargadas de producir las células lumbinales diferenciadas y las células alveolares durante la gestación.

Por otra parte, las células del compartimento basal se caracterizan por ser EpCAM^{-/low}, CD49f⁺, CK14, p63, Vimentina, ER⁻ y PR⁻. Dentro de este compartimento se pueden diferenciar una población celular capaz de reconstruir las estructuras típicas de una mama (ductos y alveolos) cuando son inyectadas en glándula mamaria de ratones, además de formar colonias en cultivo en las que aparecen tanto células con características basales como lumbinales (Stingl J 2001, Lim E 2009). Por ello esta población se la considera como MaSC o progenitores bipotentes con capacidad de diferenciar tanto a células lumbinales como basales. No se han descrito marcadores capaces de diferenciar entre MaSC y progenitores bipotentes, pero si se han descrito marcadores para diferenciar MaSC/progenitores bipotentes (CD24⁻, CD133⁻, CD10⁺ y Thy⁺) de progenitores lumbinales (CD24⁺, CD133⁺, CD10⁻ y Thy⁻) además de de los ensayos funcionales mencionados anteriormente (Kendrick H 2008, Raouf A 2008, Lim E 2010)

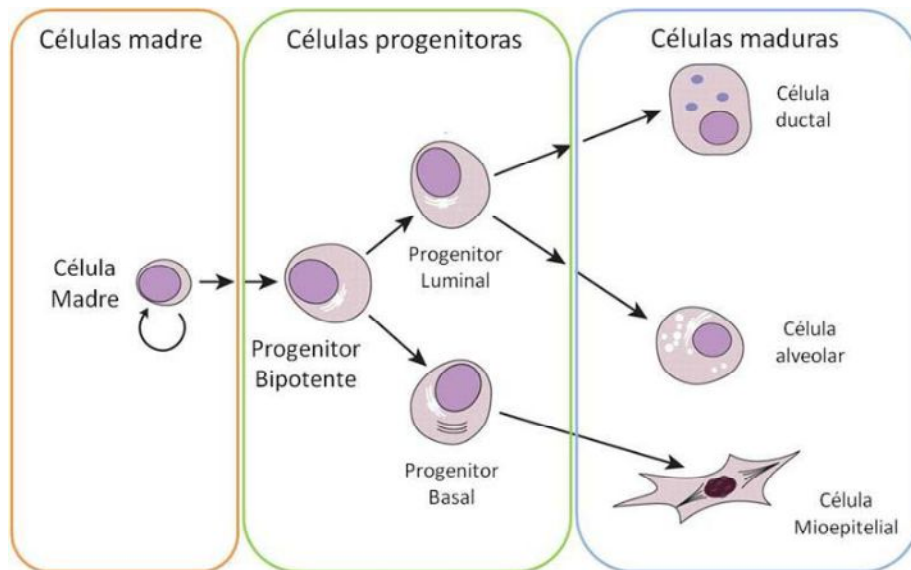


Figura 2. Jerarquía de las células epiteliales de la glándula mamaria humana. Figura adaptada de Visvader JE 2009.

Desarrollo de la glándula mamaria

La mama está expuesta a cambios drásticos de composición, arquitectura y función dirigidos por los diferentes tipos de hormonas existentes en cada etapa de la vida de una mujer. Estos cambios se agrupan en varias etapas (Watson CJ 2008):

Fetal: la mama se origina a partir la cresta mamaria procedente del ectodermo. Primero se forman los primordios, cúmulos de células que diferencian para formar los cordones mamarios. Posteriormente los cordones mamarios son sustituidos por un sistema de ductos con fondo ciego característicos de la infancia (Howard BA 2000).

Infantil: durante la infancia la glándula mamaria permanece en un estado inmaduro con un desarrollo mínimo.

Púber: durante esta etapa se produce un gran desarrollo debido al comienzo de la ovulación y al establecimiento de ciclos menstruales regulares. El estrógeno secretado por los ovarios actúa sobre las MaSC induciendo su proliferación y dándose una elongación y ramificación de los ductos, los cuales terminan en unos esbozos de alveolos (Sternlicht 2006).

Gestación: los niveles de estrógeno y progesterona aumentan en sangre induciendo proliferación de las MaSC y otras células progenitoras dándose la síntesis *de novo* de ductos, elongación y ramificación de los existentes y expansión de los alveolos a partir de los esbozos en los extremos de los ductos. Posteriormente, el aumento de los niveles de prolactina estimula la diferenciación celular haciendo que las progenitores luminales se diferencian a células alveolares (Oakes SR 2008).

Lactancia: después del parto se mantiene el aumento de los niveles de prolactina en sangre induciendo la secreción de leche y el mantenimiento del tejido secretor durante el periodo de lactancia. Además se produce un aumento de los niveles de oxitocina que actúa sobre las células mioepiteliales de los alveolos permitiendo la constricción de las células luminales alveolares para que la leche sea expulsada por el pezón a través de los ductos (Gudjonsson T 2005).

Post-lactancia: se desencadena un proceso de involución por el que disminuye el número de alveolos y la mama vuelve al estado previo a la gestación. El mecanismo exacto por el que se produce la involución no está claro, pero se divide en dos fases: activación de un proceso de apoptosis de células alveolares y expulsión de estas al lumen del alveolo para ser eliminadas (Lund LR 1996).

Menopausia: la mama sufre otro proceso de involución, pero en este caso asociada a la disminución de hormonas sexuales debido al cese de actividad de los ovarios. El tejido glandular se reduce y es reemplazado por tejido adiposo, no pudiendo volver a ser funcional.

CÁNCER DE MAMA

Definición de cáncer de mama

El cáncer de mama es un tipo de neoplasia que generalmente se desarrolla a partir de las células epiteliales de los ductos o alveolos. Estas células son especialmente

propensas al desarrollo de tumores ya que, como se ha descrito previamente, están bajo la influencia de constantes cambios hormonales.

Incidencia

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente entre las mujeres de todo el mundo tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo (a excepción de los tumores de piel no melanomas) (Weigelt B 2005), siendo en España un 30% de los tumores presentes en mujeres. Tanto el número de casos como las tasas de incidencia aumentan entre un 1-2% anual, probablemente debido al envejecimiento de la población y a un diagnóstico cada vez más precoz. Actualmente se estima que el riesgo de padecer cáncer de mama es de, aproximadamente, 1 de cada 8 mujeres. La mayoría de los casos se diagnostican entre los 35 y los 80 años, con un máximo entre los 45 y los 65.

Tipos

El cáncer de mama es una enfermedad muy heterogénea, por lo que su evolución clínica y su respuesta al tratamiento aplicado son difíciles de predecir. En un intento de agrupar a los pacientes que puedan tener una evolución y un tratamiento similares los tumores de mama se han clasificado en diferentes grupos.

Según el origen anatómico:

- Carcinoma ductal: cuando la célula o las células epiteliales que origina el tumor pertenece a un ducto.
- Carcinoma alveolar o lobulillar: cuando la célula epitelial o las células epiteliales que origina el tumor pertenece a un alveolo.

Según la expansión de la neoplasia

- Carcinoma *in situ*: las células invaden el lumen del ducto o alveolo pero no suelen traspasar la membrana basal, por lo que no hay infiltración o invasión del estroma. Es un tipo de lesión focal y multicéntrica (varias lesiones dentro de una misma mama). La incidencia de estos tipos de neoplasia ha aumentado durante los últimos años y un porcentaje muy bajo de éstos tumores pasan a ser tumores invasivos, proceso que puede que puede extenderse hasta 10 años (Adamovich TL 2003, Allred DC 2012).

- Carcinoma invasivo o infiltrante: las células invaden el lumen del ducto (carcinoma ductal) o alveolo (carcinoma lobular) y durante la evolución de la enfermedad atraviesan la membrana basal para invadir el estroma, alcanzar el torrente sanguíneo y producir metástasis en órganos distales. Los carcinomas ductales invasivos son los tumores de mama más frecuentes (50-75% de todos los cánceres de mama) mientras que los carcinomas lobulares invasivos son los segundos más frecuentes (10-15%) (Dillon DA et al., 2010).

Clasificación clínica:

Se basa en el análisis de la expresión de factores pronóstico como receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR), Her2, citoqueratinas (CKs), p53, EGFR y Ki67 analizados mediante inmunohistoquímica (IHQ) para estimar la probabilidad de recuperación de la enfermedad así como para indicar el tratamiento más adecuado contra ese tumor. Así los tumores de mama se dividen en:

- Luminales: son tumores caracterizados por ser positivos para el marcaje de ER y/o PR, CK8, CK18 y/o CK19 (Oh DS 2006). Dentro de los tumores luminales se pueden subclasificar en Luminal A y Luminal B. Los tumores Luminales A son poco proliferativos (bajos niveles de marcaje de Ki67) y se relacionan con un mejor pronóstico clínico mientras que los Luminales B tienen una tasa proliferativa mayor (alto porcentaje de

células Ki67 positivas) y se relacionan con un peor pronóstico clínico. (Cheang MC 2009). Los tumores luminales suponen el 66% de todos los cánceres de mama y son más característicos de las mujeres post-menopáusicas (Tran B 2011).

- Her2 positivos: son tumores que sobre-expresan la proteína Her2 (human epidermal growth factor receptor) debido a que tienen sobre-expresado o amplificado el gen que codifica dicha proteína. El grado de expresión de Her2 se clasifica de 0 a 3+ mediante IHQ, considerándose tumores Her2+ los que tienen niveles 3+ o niveles 2+ en los que la amplificación de Her2 es confirmada mediante FISH (Korkaya H 2013). A los tumores Her2+ que no expresan ER y/o PR se les considera clínicamente agresivos. Su incidencia estimada es del 20-30% de los tumores de mama (Slamon DJ 1987, Slamon 1990).

- Tumores triples positivos (triple+): son tumores que se caracterizan por ser positivos para ER y/o PR y sobre-expresan Her2. Su incidencia es del 12% y tienen asociado un buen pronóstico clínico (Kaklamani VG 2006).

- Triples negativos (TNBC): son tumores que no expresan ER, PR o Her2 (Rakha EA 2009). Son tumores pobremente diferenciados con una alta tasa de mitosis, necrosis central, múltiples células apoptóticas e infiltración linfocítica del estroma. Se caracterizan por un mal pronóstico clínico y su tasa de incidencia es del 10-17% (Dent R 2007).

Clasificación molecular

A pesar de todas las clasificaciones anteriores, la gran heterogeneidad celular y molecular del cáncer de mama hace que pacientes con tumores de un mismo tipo tengan una evolución y una respuesta al tratamiento diferentes. Por ello, se ha desarrollado un nuevo sistema de clasificación basado en los perfiles de expresión génica de los tumores analizados mediante micro-arrays (Perou CM 2000, Sørbye T 2001, Sotiriou C 2003, Herschkowitz JI 2007). También se ha realizado una asociación entre los distintos tipos de tumores y la progresión clínica del paciente (Sørbye T 2001,

van 't Veer LJ 2002, Weigelt B 2005). Según los perfiles genéticos se pueden diferenciar principalmente cinco tipos de tumores:

- Luminales: son tumores positivos para ER y/o PR, CK8, CK18 y negativos para Her2 con un perfil genético asociado a células epiteliales luminales ya que expresan genes como ER α , GATA3, XBP1, HNF3, TFF3 and LIV1 (Sørli T 2001). Dentro de este grupo, los tumores se pueden sub-clasificar en función del grado de expresión de genes luminales en: luminales A, tienen alto grado de expresión de genes luminales y una baja expresión de genes proliferativos (MKI67 o ciclina B1) y; luminales B, tienen un grado de expresión de genes luminales moderado o bajo y una alta expresión de genes proliferativos; luminales C tienen un grado de expresión de genes luminales moderado o bajo, una alta expresión de genes proliferativos y además expresan un grupo de genes con función no conocida (lo cual comparten con tumores basales y Her2+). Los tumores luminales A tiene un buen pronóstico clínico por su alta expresión de ER y su bajo porcentaje de mutaciones en TP53 (13%), mientras que los luminales B y especialmente los luminales C tienen un peor pronóstico clínico (aunque mejor que el de los Her2+ y basales) debido a que muestran una alta tasa de recidivas (Sørli T 2001).

- HER2 positivos: son tumores que tienen sobre-expresado o amplificado el gen ERBB2 (el cual codifica la proteína Her2). Además muestran un perfil genético independiente ya que también tienen amplificados genes que se encuentran en la misma región cromosómica que HER2 (por ejemplo GRB7), genes de la vía de Ras (GTPasa asociadas a Ras, RALB y RAB6A) (Sørli T 2001) y muestran una baja expresión de genes luminales (Perou CM 2000). Los tumores HER2+ están relacionados un mal pronóstico ya que el 71% tiene mutaciones en TP53, muestran una alta tasa de recidivas y una menor supervivencia (Sørli T 2001).

- Basales: son tumores negativos para ER, PR o Her2 y positivos para CK5, CK6 y CK17 con un perfil genético asociado a células epiteliales basales ya que expresan genes como EGFR, caveolinas 1 y 2, P-Cadherina (Abd El-Rehim DM 2004, Arnes JB 2005 , Elsheikh SE 2008), integrina β 4 y laminina (Perou CM 2000). Dentro de este grupo los

tumores se pueden sub-clasificar en basales 1 si tienen una alta expresión de genes de ciclo celular (PCNA, CDC2 y BUB1) y en basales 2 si expresan altos niveles de factores de transcripción como c-fos y ATF3 (Sotiriou C 2003). Este grupo de tumores tiene un mal pronóstico clínico asociado ya que muestra un alto índice de mutaciones en TP53 (82%), una alta frecuencia de recidivas y una baja supervivencia (Sørli T 2001).

En ocasiones se hace referencia de forma indistinta a los tumores basales y tumores TNBC. Sin embargo, en un 30% de los casos esta correlación no es correcta ya que existen tumores TNBC que no muestran un perfil genético basal (Irvin WJ Jr 2008).

- Similares a mama normal: son tumores caracterizados por una alta expresión de genes de tejido adiposo y otras células no epiteliales, alta expresión de genes de células basal y una baja expresión de genes de células luminales (Perou CM 2000).

- Bajos niveles de claudinas: son tumores que tienen una baja expresión de proteínas implicadas en uniones inter-celulares como las claudinas y la E-Cadherina y una alta expresión de marcadores endoteliales (Herschkowitz JI 2007). Su perfil genético es muy similar al de los tumores basales pero se diferencia por la expresión de genes relacionados con el sistema inmune, lo cual les caracteriza por ser tumores con una alta infiltración de células inmunes (Parker JS 2009). También se caracterizan por expresar gran cantidad de genes relacionados con el proceso de transición epitelio-mesenchima (EMT) y fenotipo de célula madre cancerígena (CSCs) (Prat A 2010).

Tumores hereditarios

Aparte de los factores mencionados anteriormente empleados en la predicción de la evolución y tratamiento del cáncer de mama, se han descrito una serie de mutaciones genéticas indicativas del riesgo de padecer cáncer de mama que son transmitidas de generación en generación. Mutaciones en los genes que codifican para las proteínas BRCA1, BRCA2, TP53 y PTEN son poco frecuentes en la población general pero están asociadas a un alto riesgo de padecer cáncer de mama (Sidransky D 1992, Wooster R 1995, FitzGerald MG 1998, Peto J 1999, Antoniou A 2003, Dite GS 2003).

Especialmente agresivos son los tumores BRCA (gen de susceptibilidad a cáncer de mama), causados por mutaciones en el gen BRCA1 y/o 2. Los genes BRCA1 y BRCA2 tienen diversas funciones, siendo la más relevante su participación en la reparación de daños de doble cadena en el DNA mediante el mecanismo denominado recombinación homóloga (RH). En este mecanismo los daños en el DNA se reparan usando la secuencia de la cromátida hermana como molde en fase S/G2 del ciclo celular (Scully R 1997, Chen J 1998). Pacientes con mutaciones en estos genes tiene un riesgo del 60-85% de desarrollar cáncer de mama y del 16-40% de desarrollar cáncer de ovario a lo largo de su vida (Malone KE 1998). La mayoría de los tumores BRCA tiene un fenotipo y un perfil molecular similar al de los tumores basales ya que en ambos se encuentran mutaciones en p53 (Liu X 2007). La incidencia de mutaciones de BRCA en tumores de desarrollo espontáneo es baja aunque se aprecia una disminución de la expresión de BRCA durante la progresión de tumores basales (Sakai W 2008).

Las mutaciones génicas solo están presentes en el 25% de los casos de cáncer de mama hereditario (Thompson D 2004). Actualmente existe la teoría de que la mayoría de los casos de cáncer de mama familiar pueden ser producidos por la acumulación de variaciones en genes (polimorfismos) asociados a un bajo riesgo de padecer cáncer de mama pero con una alta frecuencia en la población (más de un 1%) que, de forma separada, no suponen un riesgo para la aparición de esta enfermedad pero que cuando se combinan pueden influir de forma significativa (Pharoah PD 2002, Antoniou AC 2006). Así, mediante el estudio masivo de polimorfismos en pacientes con cáncer de mama hereditario respecto a pacientes control se han encontrado una serie de SNPs (polimorfismos de nucleótido simple) que muestran una asociación estadísticamente significativa con el esta enfermedad: rs8052542 en el gen *FGFR2*, rs12443621 y rs8051542 en el gen *TNRC9*, rs3817198 en el gen *MAP3K1*, rs3817198 en el gen *LSP1* y rs2107425 en el gen *H19* (Easton DF 2007, Hunter, Kraft et al. 2007, Stacey SN 2007, Gold B 2008)

Tumores poco frecuentes:

- Medular: es un tipo de cáncer de mama poco frecuente con una incidencia de 3-5%. Recibe este nombre por su apariencia de masa suave y pulposa que recuerda a la médula del cerebro. Su crecimiento es lento y por lo general no metastatiza, asociándose con un buen pronóstico clínico (Masuda 2012).

- Coloideo o mucinoso: tiene una incidencia de 2-3%. Se caracteriza por que las células tumorales están embebidas en mucina, la cual se convierte en una parte principal del tumor. Tiene poco riesgo de generar metástasis y se asocia a un buen pronóstico clínico (Harris JR 2010).

- Tubular: tiene una incidencia del 1-2%. Se denomina así porque las células que lo forman tienen forma de tubo. Tiene poco riesgo de generar metástasis y se asocia a un buen pronóstico clínico (Harris JR 2010).

- Enfermedad de Paget: afectación de la piel del pezón y/o de la areola asociado, o no, a un carcinoma subyacente intra-ductal *in situ* o invasivo. Las células superficiales del pezón y/o la areola se transforman dentro de la epidermis. Esto da lugar a una apariencia de eccema con descamación, eritema y, a veces, exudación. Con el tiempo se asocia prurito, hipersensibilidad y dolor. La incidencia es muy baja ya que menos del 1% de los cánceres de mama se manifiestan de esta forma. El pronóstico y el tratamiento de la enfermedad dependen del tipo de tumor subyacente (Tanaka VDA 2009).

- Carcinoma inflamatorio de mama: es un tipo de tumor raro pero es el más maligno. Las células tumorales infiltran los vasos linfáticos y la piel. La mama está globalmente enrojecida y caliente, como si estuviese inflamada, de ahí el nombre. La incidencia es baja, del 1 al 3% de todos los cánceres de mama (Masuda 2012).

Fases

Para poder determinar el tratamiento más adecuado del cáncer de mama es importante conocer en qué fase se encuentra el tumor. Hay varios tipos de clasificaciones de la fase de un tumor de mama según el criterio que se elija.

Clasificación TNM (estadios clínicos):

Es el sistema más empleado. Estas siglas hacen referencia a:

- La T: el tamaño del tumor o a la infiltración local del mismo. Con números adicionales, del 0 al 4, se describe este tamaño: T1 si es igual o inferior a 2 cm, T2 si está entre 2 y 5 cm, T3 si es mayor de 5 cm y T4 si hay expansión hacia la piel o la pared torácica, por debajo de la mama.
- La N: la afectación de los ganglios linfáticos. Se numera de 0 (indica ausencia de infiltración ganglionar) a 3 (N1 si están afectados de 1 a 3 ganglios; N2 si están afectados de 4 a 9 ganglios y N3 si el número es igual o superior a 10 o bien si los ganglios afectados son distantes a la mama).
- La M: la afectación o no de otros órganos. Se numera 0, en ausencia de metástasis, o 1 con metástasis.

Según el T, N y M el cáncer de mama se agrupa en las siguientes etapas o estadios:

- Estadio 0: son los carcinomas *in situ*.
- Estadio I (T1, N0, M0): el tamaño del tumor es inferior a 2 cm. No hay afectación de ganglios linfáticos ni metástasis a distancias.
- Estadio II: tumor entre 2 y 5 cm, con o sin afectación de ganglios axilares. Se subdivide en estadio IIA (T0, N1, M0 ó T1, N1, M0 o T2 N0 M0) y en estadio IIB (T2, N1, M0 o T3, N0, M0).

- Estadio III: el tumor afecta a ganglios axilares y/o piel y pared torácica (músculos o costillas). Se subdivide en estadio IIIA (T0-2, N2, M0 o T3, N1-2, M0), estadio IIIB (T4, N0-2, M0) y estadio IIIC (T0-4, N3, M0).
- Estadio IV: el cáncer se ha diseminado, afectando a otros órganos como hueso o hígado (cualquier T, cualquier N, M1).

Esta clasificación en estadios está muy relacionada con el pronóstico de la enfermedad y la supervivencia. Así el porcentaje de supervivencia a los 5 años es del 100% en el estadio I y alrededor del 20% en el estadio IV.

Grados histológicos

Hace referencia a las características de las células tumorales. Éstas pueden ser más o menos parecidas a las células epiteliales mamarias normales, lo cual es indicativo de la velocidad de crecimiento del tumor.

- Grado 1 o bien diferenciadas: las células se parecen mucho a las células normales y son tumores que crecen despacio.
- Grado 2 o moderadamente diferenciadas: guardan cierta semejanza con las células de origen y su crecimiento es más rápido que en el grado 1.
- Grado 3 o indiferenciado: no se parecen a las células de dónde proceden y crecen rápidamente. Son los que con más frecuencia se diseminan.

Tratamiento y resistencia

En el tratamiento del cáncer de mama se sigue un protocolo establecido que se emplean de forma generalizada y tienen en cuenta factores como la edad y estado hormonal del paciente, clasificación TNM e histológica del tumor y presencia de marcadores (Her2, ER o PR).

Se utilizan diversas definiciones respecto al tratamiento:

Tratamiento local: tratamiento dirigido al tumor en su lugar de origen o en alguna localización determinada. La cirugía y la radioterapia son ejemplos de ello.

Tratamiento sistémico: se refiere al tratamiento que afecta a todo el organismo. La quimioterapia y la hormonoterapia son tratamientos sistémicos.

Tratamiento adyuvante: se llama así al tratamiento sistémico administrado tras un tratamiento local sin que exista evidencia de enfermedad. El objetivo de este tratamiento es destruir células tumorales que estén dispersas por el organismo.

Tratamiento neoadyuvante: consiste en administrar un tratamiento sistémico antes de un tratamiento local, con el objetivo de reducir el tamaño del tumor antes de la cirugía.

Los tratamientos para el cáncer de mama son: cirugía, radioterapia, quimioterapia, tratamiento hormonal y terapias dirigidas.

Quimioterapia: se aplica principalmente en tumores TNBC, ya que carecen de dianas terapéuticas específicas contra los que dirigir fármacos, o tumores de alto grado histológico de cualquier subtipo, tumores que han desarrollado resistencia y/o tumores que han metastatizado a otros órganos (Irvin WJ Jr 2008). Actualmente, los fármacos más empleados en este tipo de tratamiento son antraciclinas (ciclofosfamida, metotrexato y 5-fluoracilo, CMF) y taxanos (Joensuu H 2012). Las antraciclinas forman complejos con el ADN y las topoisomerasas, inhibiendo la función de estas enzimas y los taxanos impiden la despolimerización de los microtúbulos y por tanto la separación del huso mitótico, interfiriendo ambos con la proliferación celular. Éstos suelen tener un índice de éxito de entre el 30-70% pero los pacientes suelen sufrir recidivas y/o desarrollar resistencias a los 6-10 meses. En estos casos los fármacos quimioterapéuticos que se emplean son capecitabina, gemcitabina o vinorelbina los cuales tienen una menor tasa de éxito (20-30%) y la duración de la respuesta es

menor. Se estima que el porcentaje de supervivencia de pacientes que padecen un tumor de mama metastático es del 23% a los cinco años (Rivera 2010).

La resistencia desarrollada a la quimioterapia puede ser primaria, si existe antes de aplicar el tratamiento, o secundaria si se adquiere por la administración del fármaco (Giaccone G 1996). Pacientes tratados con antraciclinas y/o taxanos normalmente desarrollan resistencia a uno de los fármacos o a los dos. Además, existen pacientes que tras ser tratados con un fármaco adquieren resistencia a otros compuestos muy diferentes en estructura química en un proceso denominado resistencia cruzada o multi-resistencia. En estos casos, las posibilidades de tratamiento se reducen drásticamente.

Los mecanismos responsables de la resistencia a la quimioterapia pueden ser varios: alteraciones en la farmacocinética o metabolismo de la droga, compartimentalización de la droga en organelas celulares, aumento de la reparación del daño en el DNA inducido por el fármaco o aumento de la expresión de proteínas transportadoras que expulsan la droga del interior de la célula (transportadores ABC) (Rivera 2010).

Tratamiento hormonal: se aplica a pacientes con tumores ER positivos. Consiste en la inhabilitación de este receptor o en la inhibición de la síntesis de estrógenos. Se divide en tres categorías: moduladores selectivos del ER (SERMs), inhibidores de la actividad de ER (SERD) e inhibidores de aromatasa (AIs). Los SERMs, como el Tamoxifeno, se unen a ER α permitiendo su dimerización pero induciendo cambios conformacionales diferentes al inducido por el estrógeno lo cual impide su unión al DNA. Los SERDs, como el Fulvestan, son antagonistas puros de ER, inhibiendo su actividad. La unión de ésta molécula al ER inhibe su dimerización, translocación a núcleo y unión al DNA, además de acelerar su degradación. Los AIs inhiben la actividad de la aromatasa, enzima encargada de la síntesis de estrógenos, reduciendo los niveles de éstos en la sangre y por tanto en el tumor. Pueden ser inhibidores esteroideos irreversibles, como el Exemestano, ya que forman un complejo permanente con la enzima o inhibidores no esteroideos, como el Letrozol, que inhiben la acción enzimática por competición

reversible (Zhou J 2013). Se usan en el tratamiento de cáncer de mama de mujeres post-menopáusicas en las que la producción de estrógenos se produce en tejidos periféricos como el tejido adiposo y no en ovarios.

Al igual que otros tratamientos, ciertos tumores pueden poseer una resistencia primaria o adquirirla después de la administración de la droga. Los mecanismos moleculares subyacentes son varios: alteraciones directas en ER que impiden la unión de los inhibidores, activación constitutiva de su actividad tirosina quinasa, alteraciones de reguladores del ciclo celular, vías de señalización de supervivencia y apoptosis. Así, la célula puede seguir proliferando independientemente de la inhibición de ER. Actualmente se trabaja en el desarrollo de nuevos fármacos que actúen contra las células resistentes (Clarke R 2003) y en el empleo de los tratamientos existentes para la prevención de cáncer de mama (den Hollander P 2013).

Terapia dirigida contra Her2: es empleada en tumores Her2+. Se trata de una serie de fármacos diseñados específicamente para bloquear el receptor Her2 o las vías de señalización que activa (Pi3K y MAPKs, principalmente). Los dos fármacos más importantes son: Trastuzumab y Lapatinib.

El Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado diseñado contra el dominio extracelular del receptor Her2. Aunque la acción anti-tumoral del Trastuzumab no es bien conocida, existen varias hipótesis: inducción de toxicidad celular dependiente de anticuerpo, inhibición de la eliminación de la porción extracelular de Her2, inhibición de la dimerización de Her2 independiente de ligando, inhibición de la señalización de Her2, inducción de la parada de ciclo celular mediante la formación de complejos p21/Cdk2, inducción de apoptosis, inhibición de angiogénesis e inhibición de los mecanismos de reparación del DNA (Rexer BN 2012).

Lapatinib es un inhibidor de la actividad tirosina quinasa tanto de Her2 como de Her1 inhibiendo la activación de las vías de señalización inducidas por estos receptores. Su efecto es intracelular y reversible. Además, se pueden combinar ambos tratamientos.

Así, Lapatinib es capaz de potenciar el efecto de Trastuzumab por un aumento de la inducción de la apoptosis (Kümmler I 2014).

El descubrimiento y uso de estos fármacos en clínica ha supuesto un gran avance en el tratamiento del cáncer de mama ya que mediante el tratamiento con inhibidores de Her2 se ha reducido en un 50% la recurrencia de los tumores de mama (Joensuu H 2006, Smith I 2007). Sin embargo, una parte de los pacientes tratados con este tipo de terapia sufren recidivas, un tercio de los pacientes en un estadio avanzado de la enfermedad no muestran respuesta y la mayoría de los pacientes que muestran una respuesta inicial sufren una progresión de la enfermedad en un periodo de un año (Miller 2004, Seidman AD J Clin Oncol.). Estos mecanismos de resistencia consisten en la modificación de la estructura de Her2 impidiendo la unión de la droga, un aumento de la señalización por parte de otros miembros de esta familia de receptores (Her1, Her3 y Her4), activación constitutiva de las vías de señalización Pi3K y MAPKs o de sus efectores (ej. mutaciones en PTEN) o un aumento de la señalización de ER, ya que ha sido escrita una cooperación entre ambas vías. De esta forma, una disminución de la inducción de supervivencia por parte de Her2 podría ser compensada por una inducción en la supervivencia por ER (Nielsen DL 2013).

Los ensayos clínicos que se realizan actualmente en relación con este tipo de fármacos se centran en la inhibición de Her1, 3 y 4 (Pertuzumab), desarrollo de inhibidores de las vías de señalización inducidas por Her2 (Mihály Z 2013), desarrollo de vacunas contra Her2 para inducir respuestas inmunes anti-tumorales (Baxevanis CN 2010) o testar la eficacia de fármacos ya existentes, como el Trastuzumab, en la prevención del desarrollo de tumores Her2+ (Hynes NE 2005).

Inhibidores de PARP: se trata de otro tipo de terapia dirigida empleada en tumores con mutaciones en BRCA1/2. PARP (poli-(ADP ribosa) polimerasa) es una enzima implicada en la reparación de daños del DNA de doble cadena (Iglehart JD 2009). Su inhibición impide la reparación de daños en el DNA (producido por ejemplo por el tratamiento con antraciclinas) induciendo el empleo de mecanismos de recombinación homóloga y

no homologa para la reparación (Saleh-Gohari N. 2005, Shrivastav M 2008, Lobrich M 2007). Las células tumorales al carecer de la expresión de BRCA1 o 2 tampoco pueden emplear el mecanismo de recombinación homóloga para reparar la mutación, induciéndose la muerte celular (Lord C. J 2008). Los principales problemas de esta terapia es el escape de las células a la muerte celular mediante el empleo de mecanismo de reparación no homologa o que no todas las células de un tumor sean deficientes de BRCA1 y por tanto escapen el tratamiento con este tipo de terapia (Saleh-Gohari N 2005). Por ello, otros mecanismos inducción de muerte celular de una forma sintética están siendo investigados para el tratamiento de este tipo de tumores. Por otra parte se está empezando a estudiar el empleo de este tipo de terapias en tumores TNBC en los que se observa pérdida de las funciones de BRCA1/2 con la progresión tumoral (Liang H 2010).

Cisplatino: dada la eficacia del cisplatino en el tratamiento neoadyuvante de tumores de mama con mutaciones BRCA1 (Silver DP 2010) actualmente se está estudiando su empleo en el tratamiento adyuvante de este tipo de tumores que previamente han sido tratados con agentes quimioterapéuticos clásicos como las antraciclinas, ciclofosfamida o taxanos (Joensuu H 2012). El empleo del cisplatino para el tratamiento de tumores con mutaciones en BRCA1 se basa en que es un agente inductor de daños en el DNA y, como previamente se ha explicado, estos tumores no tienen capacidad de reparar estos daños induciendo apoptosis celular. Además, se ha observado que la expresión de las proteínas p63/p73 *in vitro* (miembros de la familia de p53) puede emplearse como factor pronóstico para predecir la sensibilidad de un tumor a cisplatino aunque no a otros agentes quimioterapéuticos convencionales (Leong CO 2007).

Otros tratamientos en desarrollo

- Retinoides: se emplean en la prevención de tumores TNBC. Su eficacia ha sido probada en la prevención de tumores ER- en ratones (Wu K 2002) mientras que en mujeres post-menopáusicas con tumores de mama en estadio tempranos se ha observado que reduce el porcentaje de recidivas (Veronesi U 2006).
- Inhibidores de la ciclo-oxigenasa 2 (COX2): en ratones transgénicos MMTV-ERBB2 se ha observado que el tratamiento con inhibidores de esta enzima retrasa el riesgo de aparición de tumores (Howe LR 2002). Sin embargo, en humanos no se han podido realizar ensayos clínicos debido al riesgo de infarto asociado a este tipo de inhibidores.
- Metformina: se ha observado una reducción de los niveles de proliferación después del tratamiento con metformina en mujeres con cáncer de mama en estadios tempranos (Niraula S 2012).
- Estatinas: ensayos preclínicos han demostrado que las estatinas pueden prevenir el desarrollo de tumores de mama, particularmente los TNBC, debido a una disminución de la proliferación y un aumento de la apoptosis celular (Higgins MJ 2012).
- Inhibidores de IGF y mTOR: son inhibidores de proteínas quinasas implicadas en vías de señalización con relevancia clínica en el desarrollo del cáncer de mama. Así, inhibidores de IGF1 pueden ser útiles en la prevención de tumores de mama ER- y ER+ (Litzenburger BC 2011) y el efecto de inhibidores de mTOR está siendo estudiado para la prevención de tumores Her2+ (Yardley 2013).

Supervivencia y Mortalidad

La supervivencia de pacientes con cáncer de mama ha mejorado notablemente en los últimos 20 años debido principalmente a un diagnóstico precoz y a un mejor resultado de los tratamientos. A pesar de ello, en España fallecen unas 6000 mujeres al año por cáncer de mama, lo que representa el 16,7% de todos los fallecimientos por cáncer del sexo femenino en nuestro país, y el 3,3% del total de muertes entre las mujeres. La

edad media al fallecimiento por cáncer de mama en España es de 66 años (Weigelt B 2005).

VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE RANK Y RANKL

Componentes de la vía

La vía de señalización de RANK y RANKL está formada por tres miembros: RANK, RANKL y OPG.

RANK (*TNFRSF11A*), el receptor, es una proteína transmembrana de tipo I compuesta por aproximadamente unos 620 aa con un 85% de homología entre la forma humana y la murina (Anderson D. M 1997). La región extracelular (residuos 30-194) está formada por cuatro dominios ricos en cisteínas (CDRs) que son característicos de la TNFRSF (super-familia de receptores del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)) (Marsters S. A 1992). La porción C-terminal está formada por 383 residuos y es uno de los dominios citoplasmáticos más grandes de la familia de TNFRSF. Como otros miembros de esta super-familia, la región C-terminal carece de actividad enzimática intrínseca por lo que su función con transductor de señales la ejerce mediante el reclutamiento de varios tipos de proteínas adaptadoras (Chung J. Y 2002, Boyle WJ 2003, Feng 2005). RANK se expresa en una gran variedad de tejidos (células epiteliales mamarias, células del sistema inmune, músculo esquelético, timo, hígado, colon, intestino delgado, glándula adrenal, osteoclastos, próstata y páncreas) (<http://www.genecards.org>), aunque su relevancia funcional solo se ha descrito en algunos de ellos.

RANKL (*TNFSF11A*), el único ligando conocido para RANK (Xing L 2005). Es una proteína transmembrana de tipo II formada por una pequeña región N-terminal, una región transmembrana y una región C-terminal extracelular que consiste en un tallo y tres dominios CDRs y encargada de unir al receptor. RANKL existe tanto en su forma transmembrana como en forma soluble. Estudios en ratón han mostrado que la forma soluble de RANKL se genera mediante el procesamiento proteolítico del tallo

extracelular. Para ello se necesitan metaloproteasas de la familia de las ADAM y MMP. Por ejemplo, ADAM17 (también llamada TACE) y MMP19 son capaces de procesar a RANKL *in vitro* (Schlöndorff J 2001, Chesneau V 2003). Además, mediante procesamiento alternativo del ARN mensajero también es posible obtener la forma soluble de RANKL. Ambas formas de RANKL, tanto la transmembrana como la soluble son biológicamente activas (Yasuda H 1998, Schlöndorff J 2001, Schlöndorff J 2001, Hikita A 2006). RANKL se expresa en osteoblastos, osteocitos y otras células de estroma del hueso, células epiteliales de mama y linfocitos T activados. Además se ha detectado su expresión en nódulos linfáticos, timo e hígado, bazo, médula ósea, sangre periférica, leucocitos, corazón y placenta (<http://www.genecards.org>).

OPG (*TNFRSF11B*) es un receptor soluble que actúa como inhibidor natural de la vía de RANK y RANKL ya que puede unirse a RANKL e inhibir su unión con RANK. Esta proteína solamente existe en forma soluble y está formada por una región N-terminal (residuos 22-194) con 2 dominios CDRs, mediante los cuales se une al ligando, y una región C-terminal (residuos 195-401) que permiten la formación de dímeros de OPG (Smith C. A 1994, Schreiber M 1996). OPG es expresado en hueso, pulmón, corazón, riñón, hígado, bazo, timo, próstata, ovario, intestino delgado, tiroides, nódulo linfático, tráquea, glándula adrenal, testículos y médula ósea (<http://www.genecards.org>).

Vías de señalización activadas por la unión de RANK y RANKL

La unión de RANKL a RANK induce la trimerización del receptor formándose un heterohexámero. Concretamente, RANKL se une a RANK a través de sus dominios CDRs de la región C-terminal (Liu C 2010). La unión de RANKL a RANK permite que proteínas adaptadoras se unan a la porción citoplasmática de RANK y la activación de varios tipos de vías de señalización citoplasmáticas. En osteoclastos se ha descrito que RANK es capaz de activar las vías de NF- κ B, MAPKs (p38, ERK y JNK), Pi3K y PKC (Figura 3) (Wada T 2006), mientras que en MECs se sabe que RANK y RANKL activan la vía de NF- κ B lo que induce proliferación celular a través de ciclina D1 (Cao Y 2001) así como translocación nuclear del factor de transcripción Id2 (Kim NS 2006).

La familia de factores asociados a receptor de TNF (TRAFs) son un tipo de proteínas adaptadoras con capacidad para unirse a RANK. TRAF6 es capaz de inducir la activación de la vía canónica de NF- κ B (Mizukami J 2002) mientras que TRAF2 y 5 inducen la activación tanto de la vía canónica como la no canónica de NF- κ B (Hauer J 2005). Además, mediante estas proteínas TRAF se produce la activación de la vía de las MAPKs (p38, ERK y JNK) mediante un mecanismo que todavía no ha sido del todo esclarecido (Teitelbaum SL 2003). Las funciones de las vías de ERK y p38 activados por RANK en osteoclastos no están del todo definidas mientras que la vía de JNK regula la expresión de factores de transcripción de la familia AP-1 como c-Jun, JunB, c-Fos y Fra (Wagner 2002, David JP 2002 , Kenner L 2004). Estos factores de transcripción junto con los factores de transcripción de la vía de NF- κ B promueven la expresión de otros factores de transcripción como NFATc1 (también llamado NFAT2), el cual es importante en la diferenciación de osteoclastos, osteoblastos y formación ósea, activación de linfocitos y desarrollo cardíaco (Takayanagi H 2002 , Koga T 2005).

La unión de TRAF 6 a RANK también permite la unión y activación de la quinasa c-Src (Walsh MC 2003) la cual induce la activación de Pi3K y PDK1, enzimas implicadas en el metabolismo de lípidos (Vanhaesebroeck B 2000) y que junto con las fosfatasa PTEN y PLC inducen la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares (Komarova SV 2003). El Ca^{2+} liberado es esencial para la activación del factor de transcripción NFATc1 (Takayanagi H 2002) y la de la proteína quinasa C (PKC), la cual interacciona con p62 para inducir el proceso de osteoclastogénesis (Durán A 2004).

Además de la activación de mediadores intracelulares de forma directa, se ha descrito que la vía de señalización de RANK y RANKL colabora con otras cascadas de señalización, por ejemplo el INF γ acelera la degradación de TRAF6 reduciendo la señalización a través de RANK (Takayanagi H 2000), o IL-1 y TNF- α median un efecto sinérgico con RANK ya que activan el mismo tipo de vías de señalización intracelulares (Theill LE 2002).

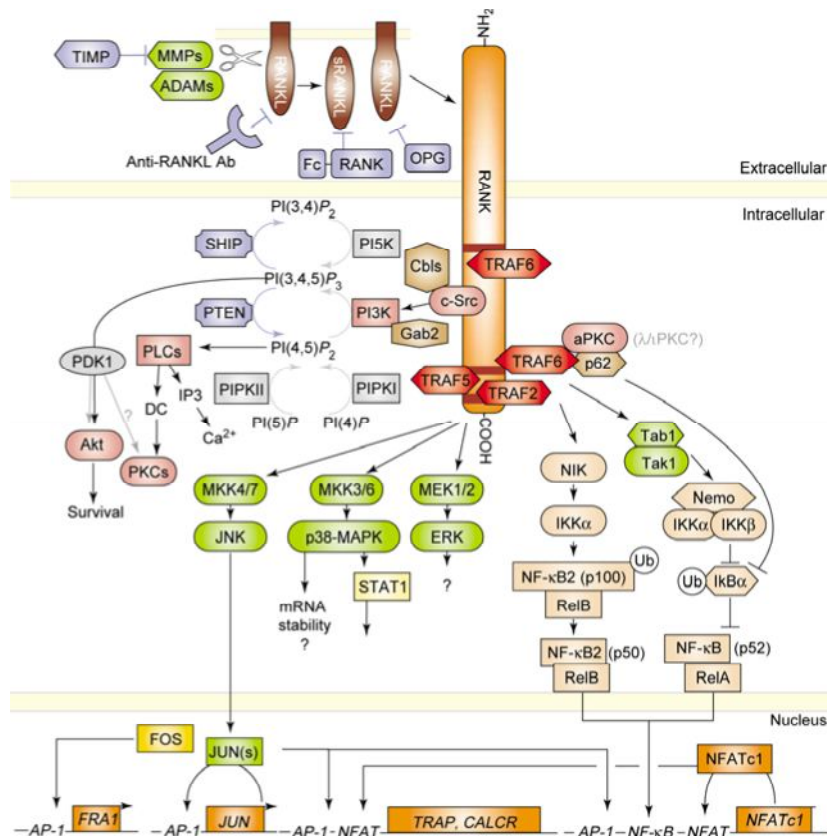


Figura 3: Vías de señalización activadas por RANK en osteoclastos (imagen procedente de Wada T. et al. 2006)

Funciones (

Metabolismo y metástasis óseas:

- Remodelación ósea: el hueso es un órgano rígido pero dinámico que continuamente está sometido a procesos de reabsorción y regeneración. La vía de de RANK y RANKL desempeña un papel fundamental en la remodelación ósea (Dougall W. C 1999, Kong Y. Y 1999, Karsenty G 2002). Varias citoquinas (IL-1, IL-11, IL-17 y TNF- α) y hormonas (PTH) son secretadas por el estroma de la médula ósea para inducir la expresión de RANKL por parte de osteoblastos (células encargadas de la síntesis de hueso) y osteocitos (células estructurales del hueso) (Nakashima T. 2011, Xiong J. 2011). El RANKL secretado se une a RANK presente en la membrana de las células precursoras de osteoclastos (células encargadas de la degradación ósea) induciendo su diferenciación a osteoclastos maduros, su supervivencia y su activación (Boyle WJ

2003). Ratones deficientes del gen de RANKL (RANKL-KO) y RANK (RANK-KO) son más pequeños y carecen de dientes, además de mostrar una alta densidad ósea (Fata JE 2000). En humanos la alteración de la vía de señalización de RANK y RANKL pueden ser causa de enfermedades óseas como la osteoporosis y enfermedad de Paget (Hughes AE 2000).

- Metástasis ósea: en el proceso de metástasis, las células del tumor primario forman tumores secundarios en órganos distales. Sin embargo, la elección del órgano donde formar una metástasis por parte de las células tumorales no parece ser al azar, ya que se ha observado que ciertos tipos de tumores tienen preferencia por metastatizar a determinados órganos. Una explicación a este fenómeno es la teoría de “seed and soil” (teoría de la semilla y la tierra) propuesta por Paget según la cual las células tumorales forman metástasis en determinados órganos y no en otros porque éstos órganos secretan factores que las atraen (Paget 1989).

Los tumores de mama, próstata y mielomas múltiples tienen una alta incidencia de metástasis en hueso. Se piensa que esto es debido a que las células del tumor primario secretan factores (como IL-11 o PTHrP) al torrente sanguíneo que alteran el micro ambiente óseo al inducir la secreción de determinados factores y citoquinas como RANKL por parte de los osteoblastos y osteocitos. RANKL actúa como quimio-atrayente de las células tumorales. *In vitro*, se ha observado que células tumorales que expresan RANK migran hacia una fuente de RANKL e *in vivo* la inyección de estas células en ratones induce la rápida formación de metástasis óseas. La inyección de OPG reduce de forma significativa la formación de metástasis óseas (Jones DH 2006, Canon JR 2008). Una vez que las células colonizan el hueso continúan secretando factores que inducen la producción de RANKL por las células óseas, incrementándose el proceso de reabsorción ósea. Esta degradación del hueso permite la liberación de factores como el TGF β , que se encuentra en reservorios óseos, que a su vez aumenta la proliferación de las células tumorales. Así se cierra un círculo vicioso que favorece la formación de metástasis óseas (Chirgwin JM 2000)(Figura 4).

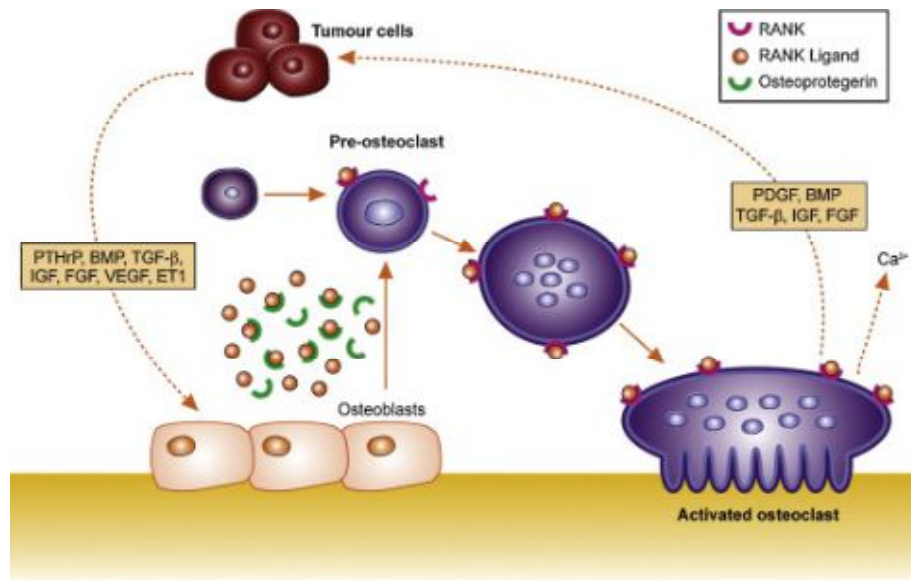


Figura 4: Círculo vicioso generado entre células tumorales y células óseas en el que participa la vía de señalización de RANK y RANKL. Figura procedente de Stenzel A. 2009.

Interacción del sistema inmune con el hueso: linfocitos T activados expresan RANKL, el cual puede unirse al RANK presente en la membrana de los osteoclastos, inducir su activación y por tanto la reabsorción del hueso. En enfermedades auto-inmunológicas en las que hay una sobre-activación de linfocitos T, tales como la artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico, existe una pérdida de masa ósea asociada debido a una sobre-activación de los osteoclastos (Kong Y. Y 1999).

Desarrollo y activación del sistema inmune:

- Formación de nódulos linfáticos: el mecanismo por el que RANK y RANKL participan en el desarrollo de nódulos linfáticos todavía no está claro pero se ha observado que ratones RANKL-KO y RANK-KO carecen de nódulos linfáticos. Una posibilidad es que actúen como un factor inductor de supervivencia de los linfocitos que se agrupan para formar la estructura primaria del nódulo linfático durante el desarrollo embrionario (Kong Y. Y 1999).

- Supervivencia de células dendríticas (DC): las células dendríticas expresan RANK en su membrana citoplasmática, el cual puede unirse al RANKL expresado por los linfocitos T

activados induciendo vías de señalización anti-apoptóticas y de supervivencia en las DCs. Esto produce un aumento del número y persistencia de las DCs en los nódulos linfáticos después de la presentación del antígeno que hace que el número de linfocitos T que responden contra el antígeno aumente y se potencie la capacidad de memoria de éstos para posteriores exposiciones (Josien R 1999).

- Control de la autoinmunidad: RANKL es secretado por las células del timo y se une a RANK presente en las células epiteliales medulares del timo (mTECs), las cuales expresan el factor de transcripción regulador de autoinmunidad (Aire). Este factor de transcripción induce la expresión del antígeno específico de tejido (TSA) en la membrana de los mTECs que es mostrado a los linfocitos T vírgenes. Los linfocitos T que reconozcan este antígeno son eliminados para evitar reacciones autoinmunes cuando sean liberados al resto del organismo (Leibbrandt A 2010).

RANK y RANKL también están implicados en el mantenimiento de la autoinmunidad periférica. Por ejemplo, queratinocitos inflamados por radiación UV secretan RANKL, el cual activa a las DCs locales de la epidermis. Estas células son las encargadas directas de controlar el número de linfocitos T reguladores (Treg) periféricos, evitando una reacción autoinmune contra los queratinocitos dañados (Loser K 2006).

Desarrollo de la glándula mamaria en ratón: la vía de señalización de RANK y RANKL es uno de los principales mediadores del efecto proliferativo de la progesterona (P4) (Beleut M 2010). Durante etapas tempranas y medias de la gestación, así como durante cada ciclo menstrual aunque en menor medida, se produce un aumento de los niveles en sangre de P4. La P4 liberada actúa sobre las MECs lumbinales de ductos mamarios (Silberstein GB 1996, Ismail PM 2002). El efecto proliferativo que ejerce sobre estas su puede dividir en dos fases: primero induce un corto efecto proliferativo autocrino en un pequeño porcentaje de células PR positivas del compartimento luminal mediante un mecanismo dependiente de Ciclina D1; posteriormente induce un efecto proliferativo paracrino más prolongado en células del compartimento basal que son PR- mediante un mecanismo mediado por RANKL (Beleut M 2010). Por tanto, las células PR- que proliferan en respuesta a la P4 son RANK+ (Figura 5). Esto se debe a

que RANKL es un gen diana del PR (Buser AC 2011). Así, los niveles de RANKL correlacionan con los niveles de progesterona, aumentando durante la gestación hasta alcanzar su máximo nivel en día 10.5 hasta día 17.5. Posteriormente en gestación tardía se produce una baja de los niveles de P4 y RANKL y un aumento de los niveles de prolactina en sangre, lo cual permite la diferenciación de las células alveolares y la producción de leche durante la lactancia (Doppler W 1990). Los niveles de expresión de RANK sufren pequeñas variaciones a lo largo de la gestación pero son mucho más constantes que los de RANKL (Gonzalez-Suarez E 2007).

Así, alteraciones en la vía de señalización de RANK y RANKL afectan al desarrollo normal de la mama durante la gestación. Tanto ratones RANK-KO y RANKL-KO como ratones transgénicos que sobre-expresan RANK (MMTV-RANK) en MECs muestran mamas similares a las de ratones silvestres vírgenes, pero durante la gestación no se produce el desarrollo de las estructuras lóbulo-alveolares responsables de la producción leche materna en la lactancia (Fata JE 2000, Gonzalez-Suarez E 2007, Fernandez-Valdivia R 2008). En mamas de ratones RANKL-KO gestantes se observa una disminución drástica de los niveles de proliferación celular y un aumento del porcentaje de células apoptóticas (Fata JE 2000) mientras que en ratones MMTV-RANK se observa un aumento del número de células en proliferación al final de la gestación y lactancia respecto a ratones silvestres (Gonzalez-Suarez E 2007). Niveles normales de proliferación y apoptosis son rescatados en animales RANKL-KO a los que se les implantan pellets de RANKL (Fernandez-Valdivia R 2008).

Las MECs *in vitro* tienen la capacidad de formar estructuras denominadas acinos similares a las que forman *in vivo* cuando son sembradas en cultivos tridimensionales (3D) en presencia de factores de diferenciación (Debnath J 2003). Al igual que *in vivo*, alteraciones en la proliferación celular de MECs aisladas de mamas de ratones MMTV-RANK pueden ser observadas cuando estas células crecen en cultivos 3D, debido a una desregulación de la vía de señalización de RANK y RANKL. Al tratar estas MECs con RANKL se produce un aumento del número de células que proliferan (Ki67+) y una deslocalización de las células apoptóticas (Caspasa 3+) asociada a una polarización

defectuosa formándose acinos aberrantes (sin lumen vacío) en comparación con los acinos de MECs procedentes de ratones silvestres (Gonzalez-Suarez E 2007).

En mamas humanas se ha observado que la distribución de las células PR+ y PR- es similar a la de las mamas de ratones. Además, recientemente se ha descrito que RANKL también media al efecto proliferativo de la P4 en glándula mamaria de humanos (Tanos T 2013.).

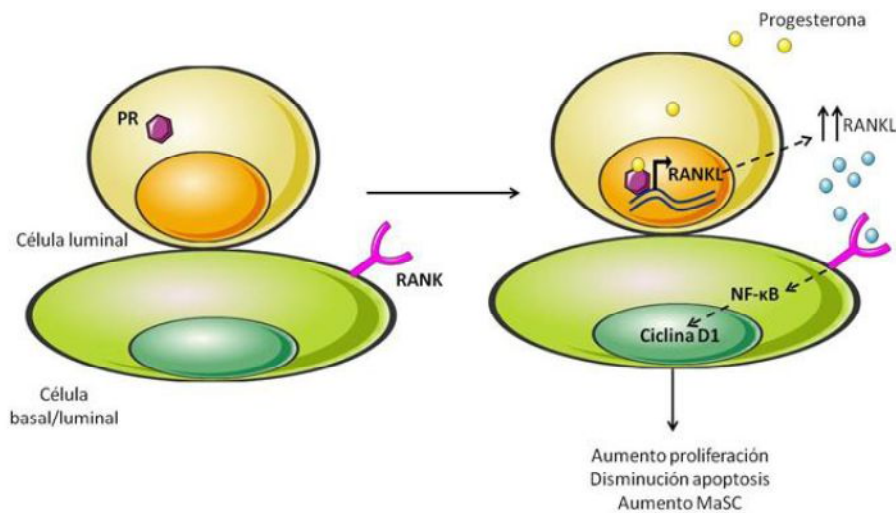


Figura 5. La acción de la progesterona en el epitelio mamario de ratones es mediado por la vía de señalización de RANK y RANKL. Imagen adaptada de Sigl V 2014.

Tumorigénesis en glándula mamaria de ratón: la vía de señalización de RANK y RANKL está implicada en el proceso de tumorigénesis en la glándula mamaria de ratones debido a que es el principal mediador del efecto pro-tumorigénico de la progesterona (Gonzalez-Suarez E 2010, Schramek D 2010). Así, en ratones MMTV-RANK vírgenes se observa una disminución en la latencia de tumores de mama respecto a los ratones silvestres después de múltiples gestaciones, o tras el tratamiento con un carcinógeno (7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA)) y un análogo de la progesterona, como la medroxiprogesterona (MPA), que también produce un aumento de los niveles de expresión de RANKL (Gonzalez-Suarez E 2010, Pasquale P 2013, Pellegrini P 2013). Por otra parte, ratones RANK-KO (MMTV-Cre *rank*^{flox/Δ}) sometidos al mismo tratamiento de MPA+DMBA muestran una menor incidencia de lesiones preneoplásicas y tumores que ratones silvestres (Schramek D 2010). Además, la inhibición farmacológica de la vía

de RANK y RANKL mediante la administración de un antagonista recombinante de RANKL formado por el dominio extracelular de RANK y la porción Fc de la inmunoglobulina humana G(1) (hIgG(1)) (RANK-Fc) (Hsu H 1999) reduce de forma significativa la incidencia tumoral en ratones MMTV-RANK y en ratones silvestres sometidos al tratamiento con MPA+DMBA. La inhibición farmacológica preventiva de RANKL en otros modelos murinos de cáncer de mama como MMTV-Neu (sobrescriben el gen NEU, ortólogo humano de HER2) también induce una reducción significativa de la incidencia de tumores y metástasis pulmonares (Gonzalez-Suarez E 2010).

En humanos, la P4 se considera como un factor de riesgo asociado a cáncer de mama. Así, un aumento de la exposición a hormonas sexuales debido a una menarquía temprana, una menopausia tardía o múltiples gestaciones son factores asociados a una mayor probabilidad a desarrollar cáncer de mama (Apter D 1989, Hankinson SE 2004). El tratamiento con análogos de la P4 también está asociado a un mayor riesgo de cáncer de mama. Dos estudios clínicos independientes (Women's Health Initiative y The Million Women Study) han demostrado que mujeres post-menopáusicas sometidas a terapia hormonal sustitutiva (HRT) en la que se combina MPA y estrógenos tienen un mayor riesgo de cáncer de mama que las que son tratadas solamente con estrógenos (Chlebowski RT 2010)

Biología de las MaSC en ratón: las células madre mamarias (MaSC) tienen la capacidad de reconstituir la estructura de una glándula mamaria (ductos y alveolos) cuando son introducidas en mamas de ratones a los que previamente se les ha eliminado su epitelio mamario, así como de formar colonias en cultivos en las que se pueden diferenciar tanto células de tipo basal como luminal (Shackleton M 2006). La P4 estimula la expansión de la población de MaSC tanto en los ciclos reproductivos como durante la gestación (Asselin-Labat M. L 2010, Joshi P. A 2010). Sin embargo, este aumento en el número de MaSC no fue observado en ratones RANK-KO (Schramek D 2010), lo que sugiere que RANKL media la expansión de la población de MaSC en glándula mamaria de ratón inducida por P4. Datos obtenidos en nuestro laboratorio

confirman que la activación constitutiva de RANK en ratones MMTV-RANK induce un aumento de MaSC, progenitores luminales y bipotentes de la glándula mamaria y un bloqueo en el proceso de diferenciación de los progenitores luminales a células alveolares maduras durante la gestación. Esta acumulación de células progenitoras susceptibles de transformación puede ser responsable de la formación de tumores espontáneos en ratones MMTV-RANK. De hecho, los tumores mamarios presentes en estos ratones muestran una gran heterogeneidad celular (Pellegrini P 2013).

Otras funciones de RANK y RANKL: se ha descrito que RANK y RANKL se expresan en sistema nervioso central y están implicados en la regulación de la temperatura corporal (Hanada R 2009). Además, RANK y RANKL controlan el crecimiento del pelo mediante la activación del crecimiento de las SC del folículo piloso (Duheron V 2011).

Inhibición de la vía de señalización de RANK y RANKL como diana terapéutica

En base al papel fundamental que la vía de señalización de RANK y RANKL en el metabolismo del hueso esta vía de señalización se ha convertido en una de las principales dianas terapéuticas en el tratamiento de enfermedades óseas. Por ello se han generado inhibidores como Denosumab, un anticuerpo monoclonal humano que se une con una gran afinidad a RANKL bloqueando su interacción con RANK y por tanto la señalización a través de esta vía.

La administración de Denosumab ha sido aprobada tanto en EE.UU como en Europa para la prevención de pérdida de masa ósea en pacientes de cáncer de próstata, mama y mieloma múltiple a los que se les administra quimioterapia así como en el tratamiento de la osteoporosis en mujeres post-menopáusicas y en hombres con alto riesgo de fracturas óseas (Lacey DL 2012).

Un reciente ensayo clínico en fase III también ha demostrado que la administración de Denosumab en pacientes con cáncer de próstata no metastásico reduce significativamente el riesgo de padecer metástasis en comparación con el placebo.

Actualmente, existe un ensayo clínico en fase III en curso para probar la eficacia del tratamiento con Denosumab en la prevención de metástasis óseas en estadios tempranos de cáncer de mama (<http://clinicaltrials.gov/show/NCT01077154>).

PROCESOS BIOLÓGICOS IMPLICADOS EN EL DESARROLLO Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE MAMA

Transición epitelio-mesénquima (EMT):

El proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso biológico por el cual células epiteliales sufren múltiples cambios bioquímicos convirtiéndose en células con fenotipo mesenquimal. El fenotipo mesenquimal se caracteriza principalmente por una mayor capacidad migratoria e invasiva, alta resistencia a la apoptosis, atenuación del ciclo celular y resistencia a quimioterapia y radioterapia. Entre los cambios moleculares que sufren las células epiteliales se encuentran: activación de factores de transcripción (Snail, Slug, Twist; ZEB1/2), expresión de marcadores de membrana específicos (CD10), reorganización y expresión de proteínas del citoesqueleto (Vimentina, Fibronectina, N-Cadherina), producción de enzimas que degradan la matriz extracelular (ej. metaloproteasas) y cambios en la expresión de ciertos miRNA (miRNA-200) (De Craene B 2013).

Existe otro proceso denominado transición mesenquima-epitelio (MET) por el que las células mesenquimales pueden adquirir o re-adquirir características epiteliales. Esta reversibilidad fenotípica a la cual se ven sometidas ciertos tipos de células es lo que se denomina plasticidad celular (Thiery JP 2009).

Regulación de EMT

El proceso de EMT está regulado fundamentalmente por cuatro mecanismos diferentes:

- Control transcripcional: el mecanismo fundamental para la inducción de EMT es la represión de la transcripción de E-Cadherina mediante la unión directa de Snail a su promotor. El resto de TFs de EMT también reprimen la expresión de E-Cadherina y el de otros genes presentes en células epiteliales implicados en uniones intercelulares (Comijn J 2001, Eger A 2005).

- ARNs no codificantes (miRNAs): los más importantes en EMT son la familia de miRNA 200 (mir-220a, mir-200b, mir-429, mir-200c y mir-141). La expresión de esta familia de miRNA está asociada a un fenotipo epitelial y están implicados en un mecanismo de regulación negativa con los TFs ZEB1 y ZEB2 (Gregory PA 2008, Park S. M 2008).

- Procesamiento alternativo de los transcritos de ARN (splicing alternativo): algunas isoformas de ciertas proteínas (por ejemplo, proto-oncogen RON) están más presentes en células con fenotipo mesenquimal (Reinke L. M. 2012).

- Regulación post-transcripcional y post-traducciona: el TF SNAIL esta sometido a control post-traducciona mediante fosforilación, oxidación de lisinas y ubiquitinación, todas ellas modificaciones que inducen degradación proteosómica (Hussey GS 2012).

Todos estos mecanismos están profundamente conectados entre sí, de forma que la modificación de uno de ellos afecta al resto. Sin embargo, todavía no se conoce el espectro completo de vías de señalización y agentes implicados en la inducción de EMT.

Tipos de EMT

El proceso de EMT se divide en tres tipos diferentes según el contexto biológico en el que ocurran.

- Tipo 1: se produce durante el desarrollo fetal para la generación de diversos tipos celulares con un fenotipo mesenquimal que posteriormente pasan por un proceso de MET para dar células diferenciadas (Acloque H 2009).

- Tipo2: se asocia con fibrosis y regeneración tisular. Se produce cuando es necesario reparar un órgano después de un proceso de trauma ó enfermedad inflamatoria como la cirrosis hepática (Xue ZF 2013).
- Tipo 3: se produce durante el proceso de tumorigénesis. Las células adquieren un fenotipo migratorio e invasivo que les permite llegar al torrente sanguíneo, diseminarse a otros órganos y formar metástasis (Kalluri R 2009).

Esta teoría no está totalmente aceptada ya que la salida de las células tumorales del tumor primario para diseminarse puede deberse a mutaciones que debiliten las interacciones entre células tumorales (Nieto 2013). Además, en esta teoría existe una contradicción y es que las células de que forman parte de las metástasis no suelen mostrar fenotipo mesenquimal sino epitelial como las del tumor primario. Una explicación para este hecho es que las células metastáticas, una vez que abandonan el tumor primario, sufren un proceso de MET que les permite formar el tumor secundario. Este proceso de MET puede ser inducido por el microambiente existente en el órgano distal y/o la falta de los estímulos existentes en el microambiente del tumor primario (Tsai JH 2013).

Adquisición de características de célula madre cancerígena (CSCs)

Una explicación para la formación y desarrollo de un tumor es la teoría de las CSCs. Las CSCs constituirían una pequeña población celular del tumor (1-5%) (Korkaya H1 2008) y se formarían a partir de SC adultas de un tejido las cuales sufren cambios genéticos y epigenéticos para adquirir capacidad tumorigénica. También existe la teoría de que las CSCs se forman a partir de células tumorales diferenciadas las cuales a través cambios en su patrón de expresión génica pueden adquirir características de célula madre (Mani SA 2008, Morel AP 2008). Múltiples evidencias demuestran que las CSCs son las células las responsables del mantenimiento del tumor primario, aparición de recidivas y adquisición de resistencia a terapias anti-cancerígenas (Pinto CA 2013).

En cada una de sus divisiones, cada CSC tendría la capacidad de formar otra CSC y una célula diferenciada que al acumularse formarían el grueso del tumor. Además, las CSCs tienen una alta resistencia a la apoptosis por lo que no se ven afectadas por las terapias que existen actualmente para el tratamiento del cáncer (Yamanaka 2008 , Velasco-Velázquez MA 2011).

CSCs humanas

La existencia de CSCs ha sido validada en tumores del sistema hematopoyético, del sistema nervioso central y de glándula mamaria, entre otros (O'Connor ML 2014). Se ha descrito que las CSCs de mama humanas se caracterizan por expresar los marcadores de superficie $CD44^+CD24^-$ ya que células aisladas de tumores humanos con estos marcadores, pero no el resto de células del tumor, son capaces de formar tumores en ratones inmunodeprimidos (modelos xenógrafos). Además, estas células $CD44^+CD24^-$ pueden formar células $CD44^+CD24^-$ aparte de otras células $CD44^+CD24^-$, lo cual indica que pueden dar células diferenciadas que forman el grueso del tumor (Al-Hajj M 2003). Las CSCs de tumores de mama humanos también se han caracterizado por tener actividad aldehído deshidrogenasa (ALDH+) (Ginestier C 2007) y la expresión, de forma no necesariamente solapante, de otros marcadores de superficie como: $CD44^+/CD49f^{hi}/CD133-2^{hi}$ (Meyer MJ 2010), $CD10^+$ (Maguer-Satta V 2011) o $EpCAM^+/CD49f^+$ (Stingl J 2005). A pesar de la gran cantidad de marcadores descritos no se puede asegurar que todas las CSCs de un tumor expresan el mismo perfil debido a la gran heterogeneidad celular existente.

Aparte de identificar a las CSCs mediante marcadores de superficie y de ensayos funcionales se ha intentado encontrar un perfil genético y epigenético que las identifique. El problema es que, al igual que con el resto de aproximaciones, no se puede atribuir una firma genética o epigenética exclusiva de CSCs que no aparezca en células diferenciadas. Actualmente, uno de los principales esfuerzos de la comunidad científica es encontrar el método por el que aislar o diferenciar las CSCs de forma

específica para poder crear terapias dirigidas específicamente contra ellas (Korkaya H 2013).

EMT y CSCs

Otra teoría para la generación de CSCs es la existencia de una conexión entre el proceso de EMT y la adquisición de un fenotipo de SC. Por lo tanto, una célula tumoral que sufra un proceso de EMT además de un fenotipo migratorio adquiere un fenotipo de SC permitiéndole migrar a órganos distales y formar un tumor secundario gracias a su capacidad de auto-renovación y generación de células diferenciadas (Mani SA 2008). Esta teoría tampoco ha sido completamente aceptada ya que existen artículos donde se describe que es el proceso de MET que sufren las células tumorales cuando abandonan el tumor primario es el que induce el fenotipo de SC (Nieto 2013).

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN CÁNCER DE MAMA

Vía de señalización de TGF β

El factor de transformación de crecimiento beta (TGF β) es un tipo de citoquina multifuncional capaz de inducir procesos celulares de muy distinta índole dependiendo del tipo y el contexto celular (Ikushima H 2010).

TGF β ejerce estas funciones mediante dos tipos diferentes de mecanismos moleculares: vía canónica y vía no canónica (Derynck R 2003). En la vía canónica están implicadas las proteínas Smads. El TGF β es producido como un complejo de alto peso molecular no activo que debe ser procesado enzimáticamente para dar la forma activa. Una vez activado, el TGF β se une al receptor de TGF β II (TGF β RII) induciendo la formación de un heterotetrámero con el receptor de TGF β I (TGF β RI). Esto permite la fosforilación del TGF β RI por parte del TGF β RII y la activación de su actividad quinasa. TGF β RI activo fosforila a Smad2 o Smad3 que, mediante la unión a Smad4, se transloca al núcleo y se une a los elementos de respuesta a Smads (SBE) presentes en los

promotores de los genes diana actuando como TF (Shi Y 2003). Las proteínas Smad 6, Smad 7 y Smurfs son inhibidores de la vía de señalización canónica de TGF β (Verrecchia F 2002). La activación de la vía no canónica también es capaz de inhibir la señalización a través de la vía canónica (Mulder 2000).

En la vía no canónica de TGF β están implicadas las proteínas MAPKs (p38, JNK y ERK1/2), Rho GTPasas, PI3K/Akt y NF- κ B. TGF β RI fosforila y activa a Ras, la cual a su vez fosforila y activa a ERK1/2, además de a las proteínas Rho-GTPasas (Rho, Rac y Cdc42) y a PI3K/Akt. La activación de p38 y JNK se produce a través de TAK1, la cual es fosforilada por TGF β RI mediante su unión al receptor a través de TRAF6 (Zhang 2009). La activación de TAK por TGF β RI también le permite formar un complejo con TAB1 y activar la vía de señalización de NF- κ B (Neil JR 2008) (Figura 6)

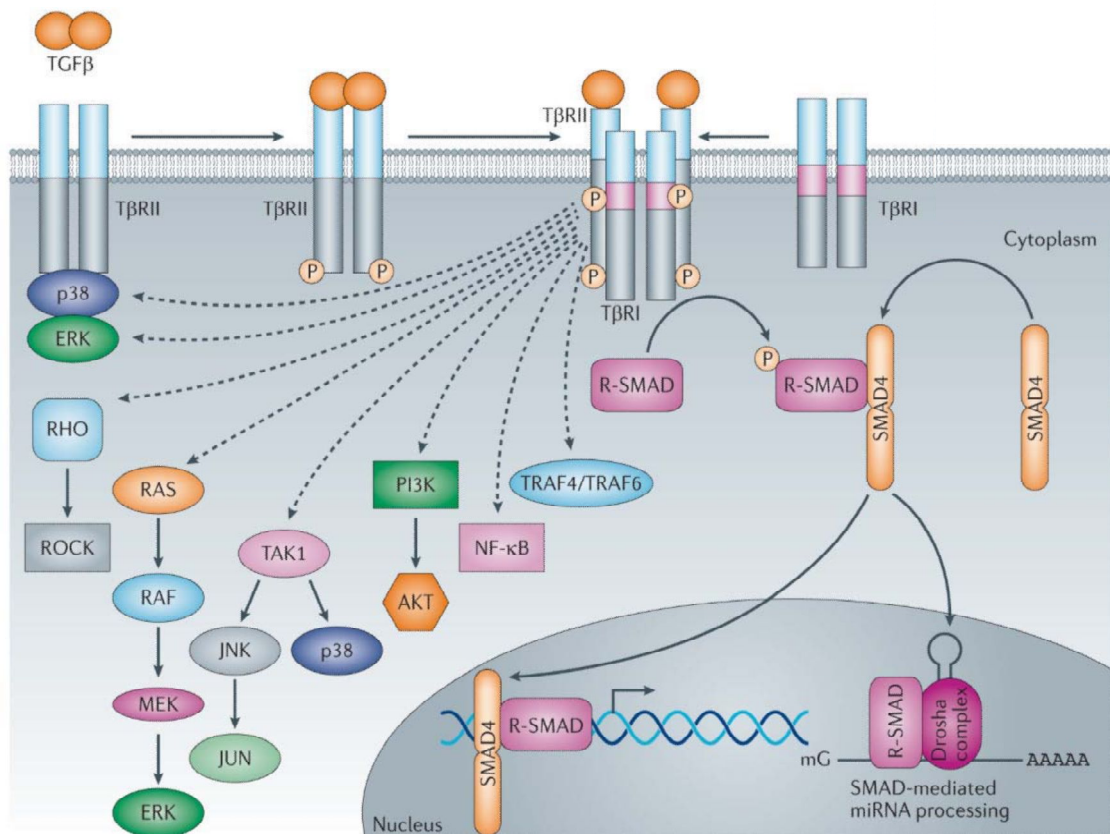


Figura 6: Vía de señalización de TGF β . Imagen adaptada de Akhurst RJ et al 2012.

Se ha descrito que TGF β tiene un papel central en tumorigénesis a través de sus efectos en diferentes procesos celulares. En tejido normal y tumores en estadios

tempranos se ha observado que la activación de la vía de TGF β controla la homeostasis celular mediante un efecto anti-tumoral debido a que: induce parada del ciclo celular y por tanto de la proliferación celular (Datto MB 1995) e induce apoptosis y/o autofagia (Ohgushi M 2005, Kiyono K 2009). Sin embargo, en tumores en estadios avanzados TGF β tiene una acción pro-tumorigénica debido a su capacidad para inducir proliferación celular (Walker RA 1992;), inhibir el proceso de apoptosis (Ehata S 2007) y modificar el micro-ambiente que rodea al tumor. Así TGF β es capaz de atenuar la respuesta del sistema inmune contra las células tumorales (Li MO 2006;) e inducir la formación de fibroblastos asociados a tumor (CAFs), los cuales a su vez secretan factores que inducen la proliferación de las células tumorales (Casey TM 2008). Este cambio en la función de TGF β se ha denominado paradoja del TGF β (Taylor MA 2011).

Aparte de su efecto sobre la proliferación de las células cancerígenas, la vía de TGF β se ha relacionado con la progresión tumoral porque es uno de los principales inductores del proceso de EMT (Moustakas A 2007). La activación de TGF β induce varios TFs como Snail, Slug o ZEB1/2 capaces de reprimir la expresión de marcadores epiteliales, como E-Cadherina, implicadas en el establecimiento de las uniones inter-celulares (Xu J 2009) e inducir la expresión de marcadores mesenquimales, como Fibronectina, Vimentina y N-Cadherina (Akhurst RJ 2012). Además, dada a su capacidad de promover EMT, se ha descrito que TGF β es importante en la inducción y el mantenimiento de un fenotipo de CSCs CD44⁺CD24^{-/low} en células epiteliales de mama tanto normales como transformadas (Mani SA 2008). Sin embargo, también existen artículos en los que se ha observado que la estimulación de la vía de TGF β induce una pérdida del fenotipo SC en células tumorales de cáncer de mama (Tang B 2007).

TGF β también induce la secreción de metaloproteasas (MMP) capaces de degradar la matriz extracelular, favoreciendo el escape de las células del tumor primario hacia el torrente sanguíneo para formar metástasis (Derynck R 2001) y la secreción de factores angiogénicos como CTGF y VEGF induciendo la formación de nuevos vasos sanguíneos en el tumor (Sánchez-Elsner T 2001). Una vez que las células tumorales han salido del tumor primario, TGF β también ayuda a la colonización de órganos distales para formar

metástasis. Un ejemplo es el caso de la formación de metástasis en hueso por parte de células tumorales de cáncer de mama. Cuando las células tumorales llegan al hueso producen su degradación, liberándose al ambiente TGF β . Este TGF β actúa sobre las células tumorales e induce la secreción de PTHrP (Yin JJ 1999), el cual a su vez induce la secreción de RANKL por parte de los osteoclastos dándose degradación ósea y permitiendo la formación de un nicho donde las células tumorales pueden crecer para producir una metástasis (Kondo H 2002).

Debido a la complejidad de los efectos inducidos por TGF β , el empleo de moduladores de su actividad en la clínica tiene que ser considerado de forma cuidadosa en cada caso. Además, también habría que evaluar los efectos adversos de la modulación de la señalización por TGF β en los tejidos sanos (Ikushima H 2010).

Vía de señalización de NF- κ B

La vía de señalización del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) tiene un papel importante en supervivencia y proliferación celular así como en inflamación e inmunidad (Hayden MS 2008). Existen dos tipos de mecanismos moleculares a través de los cuales NF- κ B es capaz de ejercer sus funciones: la vía canónica y la vía no canónica. Ambas vías se diferencian por los estímulos que las activan y por las quinasas implicadas en la transducción de la señal. La vía canónica es activada por citoquinas pro-inflamatorias como el TNF α . La unión del TNF α a su receptor produce la activación de la quinasa TAK1, la cual activa a la quinasa de I κ B α beta (IKK β) que forma parte del complejo de IKKs junto con IKK α y NEMO. IKK β activa fosforila a I κ B α , lo cual sirve como señal para su poli-ubiquitinación y degradación por el proteasoma, liberando al heterodímero formado por p65-p50 para translocarse al núcleo y actuar como TF de varios genes diana que promueven proliferación, supervivencia, inflamación e inmunidad innata (Hayden MS 2008). La vía no canónica de NF- κ B es activada por factores como CD154, el cual al unirse a su receptor de membrana promueve la activación de la quinasa inductora de NF- κ B (NIK). NIK fosforila y activa a IKK α la cual a su vez fosforila a la proteína inhibidora p100 permitiendo su procesamiento parcial para convertirse en p52 y que, junto con RelB,

se transloca al núcleo para actuar como factor de transcripción. La vía no canónica de NF- κ B está implicada en inmunidad adaptativa (Hayden MS 2008).

La vía de NF- κ B es fundamental en la proliferación, arquitectura y ramificación de la glándula mamaria durante el desarrollo post-natal (Cao Y 2001). A pesar de la heterogeneidad entre los diferentes tipos de cáncer de mama, una de las características moleculares comunes entre todos es la activación constitutiva de la vía de NF- κ B, ya que esta vía de señalización está implicada en la iniciación y progresión del cáncer de mama (Sovak MA 1999). Así, se ha descrito que la vía canónica de NF- κ B está implicada en tumorigenesis de mama por su capacidad para inducir EMT, ya que su activación induce la expresión de TFs, como ZEB1/2, que reprimen la transcripción de factores epiteliales como la E-Cadherina e inducen la expresión de factores mesenquimales como Vimentina (Chua HL 2007). Además, se ha descrito que NF- κ B es capaz de inducir la expresión de TGF β , ya que los factores de transcripción ZEB1/2 activan su expresión e inhiben la de la familia de miRNA-200, característicos del fenotipo epitelial (Xu Q 2012). Por su parte, la vía no canónica de NF- κ B también está implicada en cáncer de mama ya que la sobre-expresión de p100 en glándula mamaria de ratón causa la formación de ductos no polarizados y áreas hiperplásicas (Connelly L 2007). Además, RelB está aumentado en tumores ER- y es requerido para el mantenimiento del fenotipo mesenquimal de estos tumores (Wang X 2007).

Finalmente, la vía de NF- κ B actúa como mediadora de la adquisición de fenotipo de CSCs. Her2 puede controlar la población de CSCs de un tumor mediante la activación de la vía canónica de NF- κ B (Liu M 2010). Por otra parte, la progesterona produce una expansión de los progenitores luminales de la glándula mamaria mediante la inducción de la expresión de RANKL, el cual induce la activación de la vía no canónica de NF- κ B (Schramek D 2010).

Vía de señalización de MAPK y Pi3K/Akt

La vía de señalización de las MAPKs (mitogen activated protein kinases) actúa como mediadora molecular de la transducción de señales del exterior al interior de las células. Así, por ejemplo, la unión de EGF (epidermal growth factor) a su receptor, EGFR, induce la activación de su actividad quinasa. EGFR activo es capaz de activar a la proteína Ras, una proteína de la familia de las GTPasas. Ras une una molécula de GTP y se activa, permitiéndose el reclutamiento de proteínas citoplasmáticas, las Raf quinasas (ARAF, BRAF y CRAF) a través de las moléculas adaptadoras GRB2 y SOS. La proteína Raf activa actúa como una MAPKKK capaz de fosforilar y activar a proteínas MAPKK (MEK 1-6), que a su vez fosforilan y activan a las proteínas MAPK (p38, JNK y ERK). Las MAPK activas se translocan a núcleo y activan la transcripción de genes diana (Santarpia L 2012).

La implicación de esta familia de proteínas en cáncer se debe en parte a su función como mediadoras de procesos de EMT y Stemness inducidos por diferentes estímulos como EGF y TGFβ (Roxanis 2013). Así, en cáncer de mama se ha observado que la hiper-activación de Raf/MAPK (p38, JNK y ERK) es necesario para que las células adquieran un fenotipo EMT *in vitro* (Janda E 2002). Una mayor expresión de las MAPKs en células de cáncer de mama ha sido relacionada con una disminución de los niveles de PR, una progresión a un fenotipo más agresivo, una menor respuesta a terapias dirigidas y un peor pronóstico clínico de los tumores (Daniel AR 2007). Además, PR induce la expresión de marcadores epiteliales por lo que una disminución de su actividad puede estar implicada en la inducción de un fenotipo EMT. Tumores PR- se asocian a un fenotipo más indiferenciado y un peor pronóstico clínico (Jacobsen BM 2005).

Otra vía de señalización intracelular que es activada por factores mitogénicos es la de Pi3K/Akt. Al igual que en el caso de las MAPK, la unión de un estímulo a su receptor induce la actividad quinasa de éste, que a su vez fosforila y activa a Ras. Ras activa recluta a la membrana a Pi3K y la activa mediante fosforilación. Pi3K activa cataliza

conversión del fosfoinositol bi-fosfato (PIP2) en fosfosfoinositol tri-fosfato (PIP3). PIP3 es una molécula lipídica que une a la proteína quinasa Akt para ser fosforilada y activada mediante PDK1. Akt activa media la activación de mTOR, proteína implicada en crecimiento celular y síntesis de proteínas. PTEN es una proteína fosfatasa que antagoniza con la vía de Pi3K/Akt ya que transforma el PIP3 de nuevo a PIP2.

La vía de señalización de Pi3K/Akt se considera como una nueva diana terapéutica en el tratamiento de tumores de mama ER positivos en mujeres post-menopausicas; se ha observado que en líneas celulares de cáncer de mama que son expuestas durante largas temporadas a depleción de estrógenos se produce la activación de esta vía de señalización permitiendo la proliferación celular de una forma independiente de hormonas (Miller TW 2010). Además, pacientes de cáncer de mama que han desarrollado metástasis muestran una mejor evolución clínica cuando son tratados con inhibidores de mTOR junto con la terapia endocrina que cuando se les administra la terapia endocrina exclusivamente (Miller TW 2010 , Cavazzoni A 2012), lo cual indica que la sobre-activación de la vía de señalización de Pi3K/Akt/mTOR puede estar detrás de la adquisición de resistencia a terapia hormonal en tumores luminales Esta hipótesis tiene que ser todavía corroborada en un número mayor de muestras clínicas de este tipo de tumores (Beelen K 2014).

OBJETIVOS

Este proyecto de tesis doctoral se ha centrado en tres objetivos principales:

- 1.- Análisis de la función de la vía de señalización de RANK y RANKL en células humanas no tumorales y su posible colaboración con estímulos tumorales como mutaciones en el gen BRCA1. Efecto en transformación, tumorigénesis y metástasis
- 2.- Análisis de la expresión de RANK y RANKL en muestras de tumores de mama humanos y su posible asociación con subtipo y su valor pronóstico, así como el estudio de variantes del locus del gen que codifica RANK, *TNFRSF11A*, y su posible asociación con el riesgo a desarrollar cáncer de mama.
- 3.- Generación y caracterización de ortoxenopacientes de cáncer de mama humano en ratón que sirvan como herramienta para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas así como para testar la eficacia de nuevas drogas.

RESULTADOS

Por la presente certifico que la doctoranda **MARTA PALAFOX SÁNCHEZ** presentará la Tesis Doctoral en forma de compendio de tres artículos. Su contribución a los artículos se indica a continuación:

ARTÍCULO 1: Bonifaci N, **Palafox. M.**, Pellegrini P, Osorio A, Benítez J, Peterlongo P, Manoukian S, Peissel B, Zaffaroni D, Roversi G, Barile M, Viel A, Mariette F, Bernard L, Radice P, Kaufman B, Laitman Y, Milgrom R, Friedman E, Sáez ME, Climent F, Soler MT, Díez O, Balmaña J, Lasa A, Ramón y Cajal T, Miramar MD, de la Hoya M, Pérez-Segura P, Caldés T, Moreno V, Urruticoechea A, Brunet J, Lázaro C, Blanco I, Pujana MA, González-Suárez E

TÍTULO: "Evidence for a link between *TNFRSF11A* and risk of breast cancer."

REVISTA: Breast Cancer Res Treat (2011). 129(3): 947-54.

(Factor de impacto: 4,469)

En este artículo Marta Palafox fue responsable de realizar los ensayos de genotipación de las muestras clínicas humanas. Nuria Bonifaci, co-autora del artículo, se encargó de realizar los análisis de asociación entre el SNP y el riesgo a desarrollar cáncer de mama.

ARTÍCULO 2: **Palafox M**, F. I., Pellegrini P, Vila S, Hernandez-Ortega S, Urruticoechea A, Climent F, Soler MT, Muñoz P, Viñals F, Tometsko M, Branstetter D, Dougall WC, González-Suárez E.

TÍTULO: "RANK induces epithelial-mesenchymal transition and stemness in human mammary epithelial cells and promotes tumorigenesis and metastasis."

REVISTA: Cancer Res (2012). 72(11): 2879-88

(Factor de impacto: 8,650)

En este artículo Marta Palafox fue la responsable de la generación de los resultados así como y participó en su escritura. Pasquale Pellegrini colaboro en la realización de las inmunohistoquímicas de RANK en muestras humanas.

ARTÍCULO 3: Marta Palafox, Francesc Vinyals and Eva González-Suárez.

TÍTULO: “An autocrine TGFβ loop mediates the sustained RANK driven EMT phenotype in MCF10A whereas the Stemness phenotype is transient and mediated by ERK signalling”

REVISTA: Artículo en preparación.

En este artículo Marta Palafox fue la responsable de la generación de la totalidad resultados y participó en su escritura.

ARTÍCULO 4: Marta Palafox, Jorge Gómez, Irene Ferrer, Pasquale Pellegrini, Ander Urruticoechea, Josefina Climent, María Teresa Soler-Monso and Eva González-Suárez.

TÍTULO: “Orthoxenopatients of breast cancer, one step closer of personalized cancer medicine”

REVISTA: Artículo en preparación.

En este artículo Marta Palafox colaboró en la generación de los modelos ortotópicos en ratón de cáncer de mama humanos así como en la recogida y análisis de las muestras generadas. Marta Palafox fue la responsable de la generación de los modelos de ortotópicos resistentes a Docetaxel así como de la escritura del artículo. En este artículo también han colaborado Jorge Gomez Miragaya en la caracterización de los modelos tumorales mediante citometría de flujo e Irene Ferrer Sánchez en la compilación y análisis de los datos generados.

Y para que así conste a todos los efectos firmo la presente en L'Hospitalet de Llobregat,

Barcelona a 25 de febrero de 2014

Eva González Suárez, Ph.D.

Metastasis and Transformation Group, Leader

Cancer Epigenetics and Biology Programme (PEBC)

Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL)

Avda. Gran Via 199-203

08908 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

(p) +34 932607500 ext. 3171

(f) +34 932607219

(e) egsuarez@idibell.cat

ARTÍCULO 1

RESUMEN EN CASTELLANO

Evidencias de la conexión entre *TNFRSF11A* y el riesgo de cáncer de mama

La señalización intracelular mediada por Receptor Activator of NF- κ B (RANK, codificado por el miembro 11a de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, gen *TNFRSF11A*) es fundamental para el desarrollo de la glándula mamaria en ratones, regulando la expansión del compartimento de células madre y progenitoras. A su vez, la sobre-expresión de RANK en ratones promueve una proliferación aberrante e interfiere con la diferenciación, resultando en un aumento de la tumorigénesis. Aquí mostramos que una variante genética común cerca del extremo 5' del gen *TNFRSF11A*, rs7226991, está asociado con el riesgo de cáncer de mama en la población general y en portadoras de mutaciones en el gen BRCA2. De acuerdo con los resultados de la iniciativa "Cancer and Genetic Markers of Susceptibility" (Marcadores de susceptibilidad al Cáncer y genética), un análisis combinado de rs7226991 en dos estudios españoles de poblaciones caso-control (con un total de 1365 casos y 1323 controles) mostraron una asociación significativa con riesgo: OR=0.88, 95% intervalo de confianza (CI) 0.78-0.98, $P_{trend}=0.025$. A continuación un análisis de portadores de mutaciones BRCA1 (n=1017) y BRCA2 (n=885), reveló una asociación consistente en el segundo grupo: wHR=0.7, p95% CI 0.55-0.88; y $P_{trend}=0.003$, comparado con los portadores BRCA1: wHR=0.91, p95% CI 0.76-1.1; y $P_{trend}=0.33$. Los resultados de este estudio han de ser replicados con una colección más amplia de portadores BRCA1/2.

Evidence for a link between *TNFRSF11A* and risk of breast cancer

Núria Bonifaci · Marta Palafox · Pasquale Pellegrini · Ana Osorio · Javier Benítez · Paolo Peterlongo · Siranoush Manoukian · Bernard Peissel · Daniela Zaffaroni · Gaia Roversi · Monica Barile · Alessandra Viel · Frederique Mariette · Loris Bernard · Paolo Radice · Bella Kaufman · Yael Laitman · Roni Milgrom · Eitan Friedman · María E. Sáez · Fina Climent · María Teresa Soler · Orland Diez · Judith Balmaña · Adriana Lasa · Teresa Ramón y Cajal · María-Dolores Miramar · Miguel de la Hoya · Pedro Pérez-Segura · Trinidad Caldés · Víctor Moreno · Ander Urruticoechea · Joan Brunet · Conxi Lázaro · Ignacio Blanco · Miguel Angel Pujana · Eva González-Suárez

Received: 12 January 2011 / Accepted: 20 April 2011
© Springer Science+Business Media, LLC. 2011

Abstract Intracellular signaling mediated by the receptor activator of nuclear factor- κ B [Rank, encoded by the tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a (*Tnfrsf11a*) gene] is fundamental for mammary gland development in mice, regulating the expansion of stem and progenitor cell compartments. Conversely, Rank overexpression in mice promotes abnormal proliferation and impairs differentiation, leading to an increased incidence of tumorigenesis. Here, we show that a common genetic variant near the 5'-end of *TNFRSF11A*, rs7226991, is associated with breast cancer risk in the general population and among carriers of mutations in the *breast cancer 2, early onset (BRCA2)* gene. Akin to the results of the Cancer and Genetics Markers of Susceptibility initiative,

combined analysis of rs7226991 in two Spanish case-control studies (1,365 controls and 1,323 cases in total) revealed a significant association with risk: odds ratio (OR) = 0.88, 95% confidence interval (CI) 0.78–0.98, $P_{\text{trend}} = 0.025$. Subsequent examination of *BRCA1* ($n = 1,017$) and *BRCA2* ($n = 885$) mutation carriers revealed a consistent association in the latter group: weighted hazard ratio (w HR) = 0.70; 95% CI 0.55–0.88; and $P_{\text{trend}} = 0.003$; compared to *BRCA1* mutation carriers, w HR = 0.91; 95% CI 0.76–1.10; and $P_{\text{trend}} = 0.33$. The results of this study need to be replicated in other populations and with larger numbers of *BRCA1/2* mutation carriers.

Keywords Breast cancer · *BRCA1/2* mutation carriers · RANK · *TNFRSF11A*

Núria Bonifaci and Marta Palafox contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10549-011-1546-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

N. Bonifaci · V. Moreno · M. A. Pujana (✉)
Biomarkers and Susceptibility Unit, and Biomedical Research Center Network for Epidemiology and Public Health, Cancer Prevention and Control Program, Catalan Institute of Oncology, Bellvitge Institute for Biomedical Research (IDIBELL), Gran Via 199, L'Hospitalet, Barcelona 08908, Spain
e-mail: mapujana@iconcologia.net

M. Palafox · P. Pellegrini · E. González-Suárez (✉)
Cancer Epigenetics and Biology Program (PEBC), Bellvitge Institute for Biomedical Research (IDIBELL), Gran Via 199, L'Hospitalet, Barcelona 08908, Spain
e-mail: eg Suarez@idibell.cat

A. Osorio · J. Benítez
Human Cancer Genetics Program and Biomedical Research Center Network for Rare Diseases, Spanish National Cancer Research Centre, Madrid, Spain

P. Peterlongo · P. Radice
Unit of Molecular Bases of Genetic Risk and Genetic Testing, Department of Preventive and Predictive Medicine, Fondazione Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico, Istituto Nazionale Tumori, and IFOM Fondazione Istituto FIRC di Oncologia Molecolare, Milan, Italy

S. Manoukian · B. Peissel · D. Zaffaroni · G. Roversi
Unit of Medical Genetics, Department of Preventive and Predictive Medicine, Fondazione Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico, Istituto Nazionale Tumori, Milan, Italy

M. Barile
Division of Cancer Prevention and Genetics, Istituto Europeo di Oncologia, Milan, Italy

Introduction

As shown in murine models, intracellular activity mediated by the Tnf family member Rankl and its receptor Rank (encoded by *Tnfrsf11* and *Tnfrsf11a* genes, respectively) is essential for mammary gland development, differentiation, and function control. Rank overexpression in mice disrupts these processes by promoting abnormal proliferation of mammary epithelial cells [1], whereas absence of endogenous Rankl compromises cell survival and proper proliferation [2]. In both scenarios, non-functional mammary glands lacking lobuloalveolar structures were observed [1, 2]. Accordingly, paracrine signaling through Rankl has recently been described as responsible for the expansion of stem and progenitor cell compartments during pregnancy and ovarian cycles [3, 4].

Consistent with the fundamental mammary processes in which they are involved, increased signaling of Rankl and Rank promotes breast carcinogenesis. Accelerated preneoplastic lesions and augmented mammary tumor formation were observed in Rank transgenic mice, both after multiparity and following treatment with carcinogen and progesterin [5, 6]. Reciprocally, selective pharmacologic inhibition of endogenous Rankl attenuated mammary tumor development in transgenic and wild-type mice treated with carcinogen or progesterin and also in Neu overexpressing mice [6]. In addition, a lower incidence of progesterin-induced mammary tumors was reported in mice lacking Rank in the mammary epithelium [5]. These observations suggest that Rankl/RANKL and Rank/RANK are principal mediators of the protumorigenic effects of progesterone and support the hypothesis that increased signaling through their pathway

promotes breast carcinogenesis. This body of evidence led us to investigate the link between *TNFRSF11A*, the human ortholog of *Tnfrsf11a*, and breast cancer risk.

Materials and methods

Study samples, genotyping, and statistical analysis

Two case-control studies of the Spanish population—one led by the Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), which had previously been used in international consortia [7, 8], and the other led by Neocodex [9, 10]—were used in this study. Both case-control studies included sporadic breast cancer cases, unselected for age or family history. Data on menopause status or osteoporosis disease were not collected. The CNIO study had recruited hospital controls and the Neocodex study population controls. The participation acceptance rates exceeded 70% in both studies. The *BRCA1/2* mutation carriers were enrolled through nine participating centers across three countries: Israel, Chaim Sheba Medical Center (CSMC); Italy, Consortium of Italian Studies on Hereditary Breast Cancer (CONSIT TEAM), which included carriers enrolled at the Centro di Riferimento Oncologico (CRO), Istituto Europeo di Oncologia (IEO), and Istituto Nazionale Tumori (INT); and Spain, including CNIO, Hospital Clínico San Carlos (HCSC), Hospital Sant Pau (HSP), Hospital Vall d'Hebron (HVH), and Catalan Institute of Oncology (ICO). Details of the number of carriers enrolled (affected or unaffected) and the number of families represented are provided in Electronic Supplementary Table S1. Eligibility to participate

A. Viel

Division of Experimental Oncology I, Centro di Riferimento Oncologico, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico, Aviano, PN, Italy

F. Mariette

Consortium for Genomics Technology (Cogentech), Milan, Italy

L. Bernard

Department of Experimental Oncology, Istituto Europeo di Oncologia, Milan, Italy

B. Kaufman

The Institute of Oncology, Chaim Sheba Medical Center, Ramat Gan, Israel

Y. Laitman · R. Milgrom · E. Friedman

The Susanne Levy Gertner Oncogenetics Unit, Institute of Human Genetics, Chaim Sheba Medical Center, Ramat Gan, Israel

E. Friedman

Sackler Faculty of Medicine, Tel Aviv University, Ramat Aviv, Israel

M. E. Sáez

Department of Structural Genomics, Neocodex, Sevilla, Spain

F. Climent · M. T. Soler

Department of Pathology, University Hospital of Bellvitge, Bellvitge Institute for Biomedical Research (IDIBELL), L'Hospitalet, Barcelona, Spain

O. Diez

Vall d'Hebron Institute of Oncology, University Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

J. Balmaña

Department of Medical Oncology, University Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

A. Lasa · T. Ramón y Cajal

Department of Medical Oncology, Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

M.-D. Miramar

Genetics Unit, Clinical Biochemistry Service, Miguel Servet, University Hospital, Zaragoza, Spain

was restricted to female carriers of *BRCA1* or *BRCA2* mutations (classified as pathogenic according to Breast Cancer Information Core criteria) who were 18-years-old or older at recruitment. Collected information included birth year; age at diagnosis of breast and/or ovarian cancer; tumor bilaterality; family history (first- and second-degree relatives with breast and/or ovarian cancer); and estrogen receptor α (ER α)-tumor status (in >60% of cases). Data on menopause status and osteoporosis disease were not collected. All participants provided written informed consent and each of the studies was approved by the corresponding local ethics committees. Genotyping was performed at the corresponding centers for the population studies (CNIO and Neocodex) and at Cogentech (for carriers enrolled by CRO, IEO, and INT), CNIO, CSMC, and ICO (for individuals enrolled by HCSC, HSP, HVH, and ICO within a Spanish Consortium for Modifiers of *BRCA1/2*). Genotypes were assessed using a pre-designed TaqMan assay (Applied Biosystems) or, for the Neocodex study, melting curve analyses with fluorescence resonance energy transfer (FRET) probes in a LightCycler[®] 480 instrument (Roche). The quality controls comprised $\geq 98\%$ genotyping calls for controls and cases in the population studies, and for unaffected and affected *BRCA1/2* mutation carriers across all centers. They also comprised 2–4% of sample replicates in all studies/centers with >98% concordance of genotypes. Data for the controls in both Spanish studies were in Hardy–Weinberg equilibrium (χ^2 goodness-of-fit test; $P > 0.05$). Hardy–Weinberg equilibrium for *BRCA1/2* mutation carrier sets from each center was evaluated by random selection of one individual from each participating family, and the results showed equilibrium in all sets. Unconditional and conditional logistic regression analyses were used to analyze data from a case–control study. Hazard ratios were estimated using Cox regression models under standard

regression analysis and under a weighted cohort approach to enable the retrospective study design and non-random sampling of affected and unaffected mutation carriers [11]. Weights were assigned separately for carriers of mutations in *BRCA1* or *BRCA2*, and by age interval, and the P values were calculated from the robust score test. Analyses were stratified by birth-year cohort (pre-1940; 1940–1949; 1950–1959; and post-1959), ethnicity, and center. A robust variance estimate was used to account for familial correlations. The time from birth to diagnosis of breast cancer was modeled by censoring at the first of the following events: bilateral prophylactic mastectomy; breast cancer diagnosis; ovarian cancer diagnosis; death; and last date known to be alive. Subjects were considered to be affected if they were censored at breast cancer diagnosis; otherwise, they were considered to be unaffected. All statistical analyses were carried out using R software [12].

Results and discussion

Association in the general population

The results of the genome-wide association study conducted by the Cancer and Genetics Markers of Susceptibility (CGEMS) initiative [13] suggested that common genetic variation near the 5'-end of *TNFRSF11A* is associated with breast cancer risk (lowest $P_{\text{trend}} = 0.004$) (Fig. 1a). The three single nucleotide polymorphisms (SNPs) that showed the highest associations at this region were in linkage disequilibrium ($r^2 > 0.80$ in HapMap Caucasian individuals) within a block encoding for an uncharacterized gene, *KIAA1468* (Fig. 1a). The SNP rs7226991 is located within an evolutionarily conserved and potential regulatory sequence located ~4 kb proximal to the 5'-exon of *TNFRSF11A* (Fig. 1a). Potential expression regulation by this sequence is suggested by the results of DNase I [14] and TAF1 chromatin immunoprecipitation [15] assays, combined with the analysis of evolutionary conservation [16] (Fig. 1a).

Based on the above observations, rs7226991 was genotyped in two case–control studies of the Spanish population (CNIO and Neocodex, see “Materials and methods” section). After quality control and Hardy–Weinberg equilibrium checks, the results from both studies showed per-allele effects consistent with the CGEMS results: for CNIO, OR = 0.84 and 95% CI 0.72–0.98; for Neocodex, OR = 0.93 and 95% CI 0.79–1.11; and for CGEMS, OR = 0.84 and 95% CI 0.74–0.95. Combined analysis of the Spanish studies (1,365 controls and 1,323 cases in total) revealed a significant association: OR = 0.88; 95% CI 0.78–0.98; and $P_{\text{trend}} = 0.025$, adjusted by age and center (Table 1). The dominant model was similarly significant: OR = 0.84; 95% CI 0.72–0.98; and $P = 0.026$. In

M. de la Hoya · T. Caldés
Molecular Oncology Laboratory, Hospital Clínico San Carlos,
Madrid, Spain

P. Pérez-Segura
Medical Oncology, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

A. Urruticoechea · M. A. Pujana
Translational Research Laboratory, Catalan Institute of
Oncology, Bellvitge Institute for Biomedical Research
(IDIBELL), L'Hospitalet, Barcelona, Spain

J. Brunet
Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology,
Girona Biomedical Research Institute, Girona, Spain

C. Lázaro · I. Blanco
Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology,
Bellvitge Institute for Biomedical Research (IDIBELL),
L'Hospitalet, Barcelona, Spain

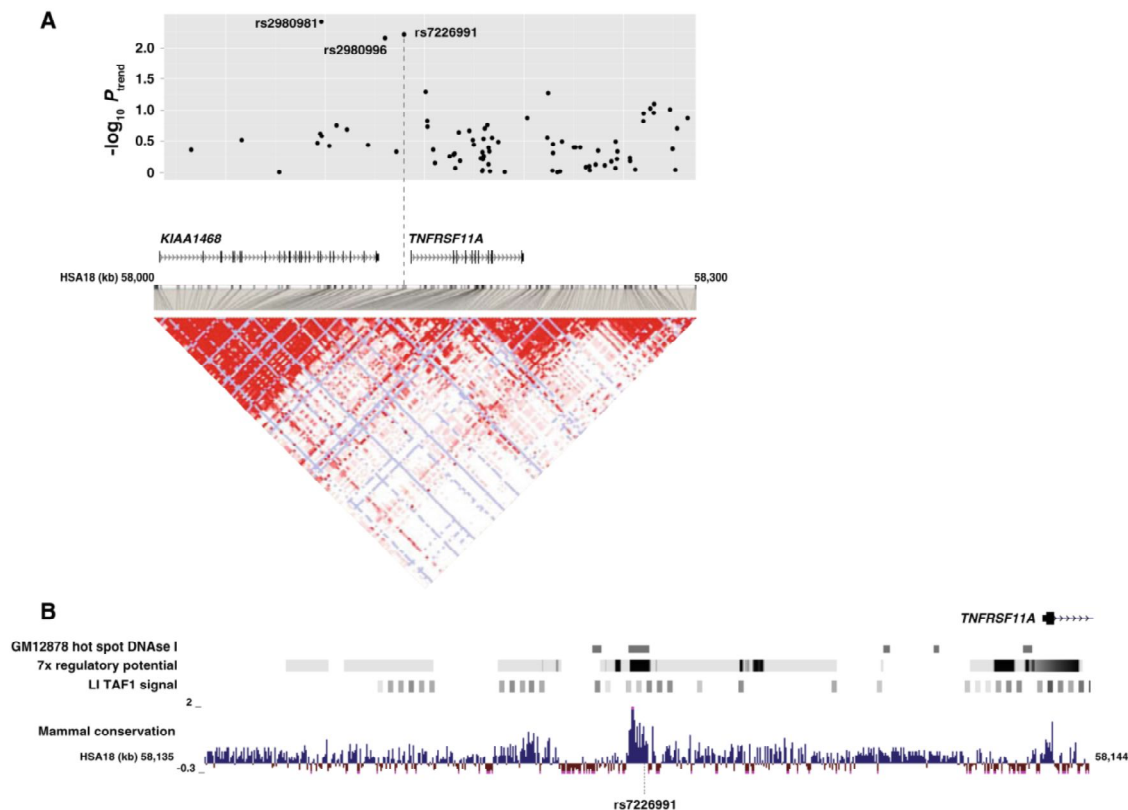


Fig. 1 Genetic variation near the 5'-end of *TNFRSF11A* and risk of breast cancer. **a** SNPs with previous evidence suggestive of association with breast cancer risk in the CGEMS study [13], genes and linkage disequilibrium structure around *KIAA1468/TNFRSF11A* in

HapMap Caucasians (data release 27). The top graph shows the $-\log_{10} P_{\text{trend}}$ values per SNPs genotyped in the CGEMS study, highlighting the strongest three signals. **b** Potential regulatory region near the 5'-end of *TNFRSF11A* and including rs7226991

addition, the effect might be similar among breast cancer patients stratified according to ER α tumor status: negative, OR = 0.85 and 95% CI 0.69–1.04; and positive, OR = 0.88 and 95% CI 0.76–1.02. The dominant model was marginally significant for ER α -positive: OR = 0.83; 95% CI 0.68–1.00; and $P = 0.049$ (Electronic Supplementary Table S2). Together, these results suggest the identification of a low-penetrance breast cancer allele located near the 5'-end of *TNFRSF11A*, influencing cancer risk in diverse populations.

Association in *BRCA2* mutation carriers

Since several common breast cancer-predisposition alleles identified through genome-wide association studies and firmly replicated across populations also associate with breast cancer risk among *BRCA1* and/or *BRCA2* mutation carriers [17], we next evaluated the effect of rs7226991 within these groups. After the data had been checked for

quality controls and Hardy–Weinberg equilibrium, Cox regression analysis revealed that rs7226991 associates with breast cancer risk in the total set of *BRCA1/2* mutation carriers consistent with the above observations: $n = 1,902$, HR = 0.85; 95% CI 0.77–0.95; and $P_{\text{trend}} = 0.003$. As observed in the general population, the dominant model was similarly significant: HR = 0.82; 95% CI 0.72–0.93; and $P = 0.002$. Next, examination of *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers independently revealed a significant association among the latter group: for 1,017 *BRCA1* mutation carriers, HR = 0.91; 95% CI 0.79–1.05; and $P_{\text{trend}} = 0.21$; whereas for 885 *BRCA2* mutation carriers, HR = 0.79; 95% CI 0.68–0.92; and $P_{\text{trend}} = 0.002$.

To assess the robustness of our results we performed several sensitivity analyses. Data were analyzed using a weighted cohort approach to enable retrospective study design and, in particular, non-random sampling of affected and unaffected mutation carriers [11]. This analysis yielded similar results to those reported above: for *BRCA1*

Table 1 rs7226991 association with breast cancer risk in Spain

Genotype	Controls		Cases		OR	95% CI
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%		
CNIO						
G/G	332	45.9	411	51.4	1.00	
G/A	310	42.8	318	39.8	0.83	0.67–1.03
A/A	82	11.3	70	8.8	0.72	0.50–1.01
Total	724		799			
Trend					0.84	0.72–0.98 <i>P</i> = 0.024 [†]
Neocodex						
G/G	290	45.2	251	47.9	1.00	
G/A	281	43.9	216	41.2	0.88	0.69–1.13
A/A	70	10.9	57	10.9	0.93	0.63–1.37
Total	641		524			
Trend					0.93	0.79–1.11 <i>P</i> = 0.45 [†]
Combined						
G/G	622	45.6	662	50.0	1.00	
G/A	591	43.3	534	40.4	0.85	0.73–1.00
A/A	152	11.1	127	9.6	0.79	0.61–1.03
Total	1,365		1,323			
Trend					0.88	0.78–0.98 <i>P</i> = 0.025*
Dominant					0.84	0.72–0.98 <i>P</i> = 0.026*

[†] Adjusted by age

* Adjusted by age and center

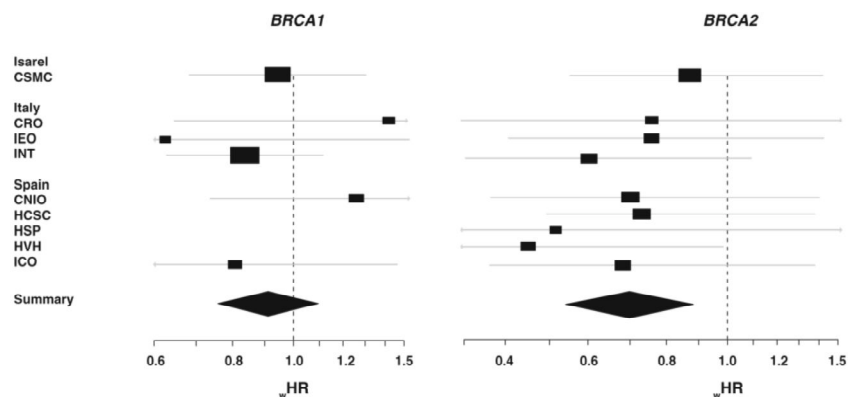
mutation carriers, weighted HR (wHR) = 0.91; 95% CI 0.76–1.10; and $P_{trend} = 0.33$; whereas for *BRCA2* mutation carriers, $wHR = 0.70$; 95% CI 0.55–0.88; and $P_{trend} = 0.003$. Again, the dominant model was similarly significant among *BRCA2* mutation carriers: $wHR = 0.65$; 95% CI 0.49–0.87; and $P = 0.004$. Importantly, the effect in the

three populations was consistent across all participating centers (Fig. 2 and Electronic Supplementary Table S3). The results were also similar when prevalent cases (defined as those diagnosed more than 5 years before recruitment) were excluded from the analyses: for $n = 746$ *BRCA2* mutation carriers, $wHR = 0.79$; 95% CI 0.65–0.95; and $P_{trend} = 0.013$; $wHR = 0.78$; 95% CI 0.62–0.98; and $P_{dominant} = 0.032$. Finally, there was no evidence of heterogeneity in the wHR s among studies under the multiplicative model ($P > 0.50$). Together, the results from CGEMS, and the results from studies of the Spanish general population and of *BRCA2* mutation carriers, support that common genetic variation near the 5'-end of *TNFRSF11A* is associated with breast cancer risk. Nevertheless, a role for *KIAA1468*—recently described as being mutated in a lobular breast tumor [18]—cannot be ruled out until the causative mutation and its functional consequences have been discovered.

Other common variants at the *TNFRSF11A* locus and/or at functionally related loci, including *TNFSF11*, have been associated with differences in age at menarche or at natural menopause [19], bone mineral density and osteoporosis [20], and Paget's disease of bone [21]. The associated variants in these studies are in low linkage disequilibrium with rs7226991 ($r^2 < 0.25$ in HapMap Caucasian individuals), which suggests that different mutations at the *TNFRSF11A* locus might lead to different phenotypes or diseases. However, our analyses were limited by the lack of information on menopause status and osteoporosis disease of the participants. Given the importance of hormonal factors in these conditions and in breast cancer, adjusted analyses would be required together with fine mapping and identification of the potential mutations of *TNFRSF11A*/RANK.

The genetic association shown here, together with the current knowledge on Rank function in mice studies, would support the idea that differentiation of stem or progenitor

Fig. 2 rs7226991 and breast cancer risk among *BRCA1/2* mutation carriers. Estimates (wHR) of association with cancer risk among *BRCA1* (left panel) and *BRCA2* (right panel) mutation carriers. The graphs show wHR s and 95% CIs. The size of the rectangles is proportional to the corresponding study precision



cells is perturbed in breast carcinogenesis, among other shared or distinct processes [22]. In line with these observations, human RANK-mediated signaling can activate several mitogen-activated protein kinases downstream [23, 24], which in turn may link with the control of differentiation and/or proliferation by other breast cancer susceptibility genes affected by low-penetrance mutations (e.g., *fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)* and *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (MAP3K1)* [7, 13, 25]). Similarly, BMP-2 (bone morphogenetic protein 2) can induce RANKL-mediated signaling [26, 27], and its receptor, BMPRII, has recently been identified as a potential breast cancer susceptibility gene product [28]. However, we did not detect significant associations between the *TNFRSF11A* expression levels and rs7226991 alleles or genotypes in a series of 70 paired tumors and peritumoral tissue samples (data not shown), and there is no evidence for a *TNFRSF11A* expression quantitative trait locus acting on cis searching in published studies (data not shown). While the potential functional alteration linked to rs7226991 might be complex [29, 30], the association results shown here should be replicated in other case-control population studies using larger numbers of *BRCA1/2* mutation carriers, as well as including the analysis of other variants highlighted by the CGEMS results in the region.

Conclusions

Taking CGEMS results as a starting point, we have shown that a common genetic variant near the 5'-end of *TNFRSF11A* may be associated with breast cancer risk in the Spanish population and among *BRCA2* mutation carriers from different populations. While both associations need to be replicated, they could enhance the knowledge of the genetic basis and altered signal pathways that influence risk of breast cancer.

Acknowledgments We wish to thank all study participants, clinicians, and centers for their valuable contributions, and the CGEMS initiative for making their genome-wide association study results available. The CONSIT TEAM thanks Marco A Pierotti, Carla B Ripamonti, and Marilena Morganti of the Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, and Bernardo Bonanni of the Istituto Europeo di Oncologia. The authors acknowledge the following grants for support of this work: a 2009 Spanish Society of Medical Oncology grant to J. Brunet; Ramón Areces Foundation XV, FIS (09/02483), and Generalitat de Catalunya 2009-SGR283 grants to MAP; the Biomedical Research Center Network for Epidemiology and Public Health Group 55 to MAP and VM; the Spanish Association Against Cancer (AECC) and FIS (08/1120) grants to J. Benítez; the RTICC 06/0020/0021 to HCSC; and MICINN (SAF2008-01975), Concern Foundation, and Scientific Foundation of the Spanish Association Against Cancer grants to EG-S. The CONSIT TEAM is supported by grants from Ministero della Salute (Extraordinary National Cancer Program 2006 "Alleanza contro il Cancro" and "Progetto Tumori

Femminili"), Ministero dell'Università e Ricerca (RBLAO3-BETH to PR), Fondazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (Special Project "Hereditary tumors") to PR, Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (4017) to PP, and by funds from Italian citizens who allocated the 5 × 1000 share of their tax payment in support of the Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Tumori, as provided for in Italian laws (INT institutional strategic projects "5 × 1000").

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

References

- González-Suárez E, Branstetter D, Armstrong A, Dinh H, Blumberg H, Dougall WC (2007) RANK overexpression in transgenic mice with mouse mammary tumor virus promoter-controlled RANK increases proliferation and impairs alveolar differentiation in the mammary epithelia and disrupts lumen formation in cultured epithelial acini. *Mol Cell Biol* 27(4):1442–1454
- Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, Elliott R, Scully S, Voura EB, Lacey DL, Boyle WJ, Khokha R, Penninger JM (2000) The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 103(1):41–50
- Asselin-Labat ML, Vaillant F, Sheridan JM, Pal B, Wu D, Simpson ER, Yasuda H, Smyth GK, Martin TJ, Lindeman GJ, Visvader JE (2010) Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature* 465(7299):798–802
- Joshi PA, Jackson HW, Beristain AG, Di Grappa MA, Mote PA, Clarke CL, Stingl J, Waterhouse PD, Khokha R (2010) Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature* 465(7299):803–807
- Schramek D, Leibbrandt A, Sigl V, Kenner L, Pospisilik JA, Lee HJ, Hanada R, Joshi PA, Aliprantis A, Glimcher L, Pasparrakis M, Khokha R, Ormandy CJ, Widschwendter M, Schett G, Penninger JM (2010) Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer. *Nature* 468(7320):98–102
- González-Suárez E, Jacob AP, Jones J, Miller R, Roudier-Meyer MP, Erwert R, Pinkas J, Branstetter D, Dougall WC (2010) RANK ligand mediates progestin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. *Nature* 468(7320):103–107
- Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, Struwing JP, Morrison J, Field H, Luben R, Wareham N, Ahmed S, Healey CS, Bowman R, Meyer KB, Haiman CA, Kolonel LK, Henderson BE, Le Marchand L, Brennan P, Sangrajrang S, Gaborieau V, Odefrey F, Shen CY, Wu PE, Wang HC, Eccles D, Evans DG, Peto J, Fletcher O, Johnson N, Seal S, Stratton MR, Rahman N, Chenevix-Trench G, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Axelsson CK, Garcia-Closas M, Brinton L, Chanock S, Lissowska J, Peplonska B, Nevanlinna H, Fagerholm R, Eerola H, Kang D, Yoo KY, Noh DY, Ahn SH, Hunter DJ, Hankinson SE, Cox DG, Hall P, Wedren S, Liu J, Low YL, Bogdanova N, Schurmann P, Dork T, Tollenaar RA, Jacobi CE, Devilee P, Klijn JG, Sigurdson AJ, Doody MM, Alexander BH, Zhang J, Cox A, Brock IW, MacPherson G, Reed MW, Couch FJ, Goode EL, Olson JE, Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Uitterlinden A, Rivadeneira F, Milne RL, Ribas G, Gonzalez-Neira A, Benitez J, Hopper JL, McCredie M, Southey M, Giles GG, Schroen C, Justenhoven C, Brauch H, Hamann U, Ko YD, Spurdle AB, Beesley J, Chen X, Mannermaa

- A, Kosma VM, Kataja V, Hartikainen J, Day NE, Cox DR, Ponder BA (2007) Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 447(7148):1087–1093
8. Milne RL, Ribas G, González-Neira A, Fagerholm R, Salas A, González E, Dopazo J, Nevanlinna H, Robledo M, Benítez J (2006) *ERCC4* associated with breast cancer risk: a two-stage case-control study using high-throughput genotyping. *Cancer Res* 66(19):9420–9427
 9. Gayán J, Galán JJ, González-Pérez A, Sáez ME, Martínez-Larrad MT, Zabena C, Rivero MC, Salinas A, Ramírez-Lorca R, Morón FJ, Royo JL, Moreno-Rey C, Velasco J, Carrasco JM, Molero E, Ochoa C, Ochoa MD, Gutiérrez M, Reina M, Pascual R, Romo-Astorga A, Susillo-González JL, Vázquez E, Real LM, Ruiz A, Serrano-Ríos M (2010) Genetic structure of the Spanish population. *BMC Genomics* 11:326
 10. Lorenzo C, Serrano-Ríos M, Martínez-Larrad MT, Gabriel R, Williams K, Gonzalez-Villalpando C, Stern MP, Hazuda HP, Haffner SM (2001) Was the historic contribution of Spain to the Mexican gene pool partially responsible for the higher prevalence of type 2 diabetes in mexican-origin populations? The Spanish Insulin Resistance Study Group, the San Antonio Heart Study, and the Mexico City Diabetes Study. *Diabetes Care* 24(12):2059–2064
 11. Antoniou AC, Goldgar DE, Andrieu N, Chang-Claude J, Brohet R, Rookus MA, Easton DF (2005) A weighted cohort approach for analysing factors modifying disease risks in carriers of high-risk susceptibility genes. *Genet Epidemiol* 29(1):1–11
 12. The R Development Core Team (2011) A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. www.r-project.org
 13. Hunter DJ, Kraft P, Jacobs KB, Cox DG, Yeager M, Hankinson SE, Wacholder S, Wang Z, Welch R, Hutchinson A, Wang J, Yu K, Chatterjee N, Orr N, Willett WC, Colditz GA, Ziegler RG, Berg CD, Buys SS, McCarty CA, Feigelson HS, Calle EE, Thun MJ, Hayes RB, Tucker M, Gerhard DS, Fraumeni JF Jr, Hoover RN, Thomas G, Chanock SJ (2007) A genome-wide association study identifies alleles in *FGFR2* associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat Genet* 39(7):870–874
 14. Sabo PJ, Hawrylycz M, Wallace JC, Humbert R, Yu M, Shafer A, Kawamoto J, Hall R, Mack J, Dorschner MO, McArthur M, Stamatoyannopoulos JA (2004) Discovery of functional non-coding elements by digital analysis of chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(48):16837–16842
 15. Kim TH, Barrera LO, Zheng M, Qu C, Singer MA, Richmond TA, Wu Y, Green RD, Ren B (2005) A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* 436(7052):876–880
 16. King DC, Taylor J, Elnitski L, Chiaromonte F, Miller W, Hardison RC (2005) Evaluation of regulatory potential and conservation scores for detecting cis-regulatory modules in aligned mammalian genome sequences. *Genome Res* 15(8):1051–1060
 17. Antoniou AC, Spurdle AB, Sinilnikova OM, Healey S, Pooley KA, Schmutzler RK, Versmold B, Engel C, Meindl A, Arnold N, Hofmann W, Sutter C, Niederacher D, Deissler H, Caldes T, Kampjarvi K, Nevanlinna H, Simard J, Beesley J, Chen X, Neuhausen SL, Rebbeck TR, Wagner T, Lynch HT, Isaacs C, Weitzel J, Ganz PA, Daly MB, Tomlinson G, Olopade OI, Blum JL, Couch FJ, Peterlongo P, Manoukian S, Barile M, Radice P, Szabo CI, Pereira LH, Greene MH, Rennert G, Lejbkiewicz F, Barnett-Griness O, Andrulis IL, Ozelik H, Gerdes AM, Caligo MA, Laitman Y, Kaufman B, Milgrom R, Friedman E, Domchek SM, Nathanson KL, Osorio A, Llorc G, Milne RL, Benítez J, Hamann U, Hogervorst FB, Manders P, Ligtenberg MJ, van den Ouweland AM, Peock S, Cook M, Platte R, Evans DG, Eeles R, Pichert G, Chu C, Eccles D, Davidson R, Douglas F, Godwin AK, Barjhoux L, Mazoyer S, Sobol H, Bourdon V, Eisinger F, Chompret A, Capoulade C, Bressac-de Paillerets B, Lenoir GM, Gauthier-Villars M, Houdayer C, Stoppa-Lyonnet D, Chenevix-Trench G, Easton DF (2008) Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. *Am J Hum Genet* 82(4):937–948
 18. Shah SP, Morin RD, Khattra J, Prentice L, Pugh T, Burleigh A, Delaney A, Gelmon K, Guliany R, Senz J, Steidl C, Holt RA, Jones S, Sun M, Leung G, Moore R, Severson T, Taylor GA, Teschendorff AE, Tse K, Turashvili G, Varhol R, Warren RL, Watson P, Zhao Y, Caldas C, Huntsman D, Hirst M, Marra MA, Aparicio S (2009) Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature* 461(7265):809–813
 19. Lu Y, Liu P, Recker RR, Deng HW, Dvornyk V (2010) *TNFRSF11A* and *TNFSF11* are associated with age at menarche and natural menopause in white women. *Menopause* 17(5):1048–1054
 20. Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K, Halldorsson BV, Hsu YH, Richards JB, Zillikens MC, Kavvoura FK, Amin N, Aulchenko YS, Cupples LA, Deloukas P, Demissie S, Grundberg E, Hofman A, Kong A, Karasik D, van Meurs JB, Oostra B, Pastinen T, Pols HA, Sigurdsson G, Soranzo N, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Williams FM, Wilson SG, Zhou Y, Ralston SH, van Duijn CM, Spector T, Kiel DP, Stefansson K, Ioannidis JP, Uitterlinden AG (2009) Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet* 41(11):1199–1206
 21. Albagha OM, Visconti MR, Alonso N, Langston AL, Cundy T, Dargie R, Dunlop MG, Fraser WD, Hooper MJ, Isala G, Nicholson GC, del Pino Montes J, Gonzalez-Sarmiento R, di Stefano M, Tenesa A, Walsh JP, Ralston SH (2010) Genome-wide association study identifies variants at *CSF1*, *OPTN* and *TNFRSF11A* as genetic risk factors for Paget's disease of bone. *Nat Genet* 42(6):520–524
 22. Foulkes WD (2004) *BRCA1* functions as a breast stem cell regulator. *J Med Genet* 41(1):1–5
 23. Matsumoto M, Sudo T, Saito T, Osada H, Tsujimoto M (2000) Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL). *J Biol Chem* 275(40):31155–31161
 24. Leibbrandt A, Penninger JM (2008) RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann NY Acad Sci* 1143:123–150
 25. Stacey SN, Manolescu A, Sulem P, Thorlacius S, Gudjonsson SA, Jonsson GF, Jakobsdottir M, Bergthorsson JT, Gudmundsson J, Aben KK, Strobbe LJ, Swinkels DW, van Engelenburg KC, Henderson BE, Kolonel LN, Le Marchand L, Millastre E, Andres R, Saez B, Lamba J, Godino J, Polo E, Tres A, Picelli S, Rantala J, Margolin S, Jonsson T, Sigurdsson H, Jonsdottir T, Hrafnkelsson J, Johannsson J, Sveinsson T, Myrdal G, Grimsdottir HN, Sveinsdottir SG, Alexiusdottir K, Saemundsdottir J, Sigurdsson A, Kostic J, Gudmundsson L, Kristjansson K, Masson G, Fackenthal JD, Adebamowo C, Ogundiran T, Olopade OI, Haiman CA, Lindblom A, Mayordomo JI, Kiemeny LA, Gulcher JR, Rafnar T, Thorsteinsdottir U, Johannsson OT, Kong A, Stefansson K (2008) Common variants on chromosome 5p12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nat Genet* 40(6):703–706
 26. Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S (1998) Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 250(3):776–781
 27. Usui M, Xing L, Drissi H, Zuscik M, O'Keefe R, Chen D, Boyce BF (2008) Murine and chicken chondrocytes regulate

- osteoclastogenesis by producing RANKL in response to BMP2. *J Bone Miner Res* 23(3):314–325
28. Saetrom P, Biesinger J, Li SM, Smith D, Thomas LF, Majzoub K, Rivas GE, Alluin J, Rossi JJ, Krontiris TG, Weitzel J, Daly MB, Benson AB, Kirkwood JM, O'Dwyer PJ, Sutphen R, Stewart JA, Johnson D, Larson GP (2009) A risk variant in an miR-125b binding site in *BMPRII* is associated with breast cancer pathogenesis. *Cancer Res* 69(18):7459–7465
 29. Pomerantz MM, Ahmadiyeh N, Jia L, Herman P, Verzi MP, Doddapaneni H, Beckwith CA, Chan JA, Hills A, Davis M, Yao K, Kehoe SM, Lenz HJ, Haiman CA, Yan C, Henderson BE, Frenkel B, Barretina J, Bass A, Taberero J, Baselga J, Regan MM, Manak JR, Shivdasani R, Coetzee GA, Freedman ML (2009) The 8q24 cancer risk variant rs6983267 shows long-range interaction with *MYC* in colorectal cancer. *Nat Genet* 41(8):882–884
 30. Tuupanen S, Turunen M, Lehtonen R, Hallikas O, Vanharanta S, Kivioja T, Bjorklund M, Wei G, Yan J, Niittymäki I, Mecklin JP, Jarvinen H, Ristimäki A, Di-Bernardo M, East P, Carvajal-Carmona L, Houlston RS, Tomlinson I, Palin K, Ukkonen E, Karhu A, Taipale J, Aaltonen LA (2009) The common colorectal cancer predisposition SNP rs6983267 at chromosome 8q24 confers potential to enhanced Wnt signaling. *Nat Genet* 41(8):885–890

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Table 1

Table S1 Number of participating *BRCA1/2* mutation carriers and families across countries and centers

Country/Center	<i>BRCA1</i> mutation carriers (<i>n</i>)			<i>BRCA2</i> mutation carriers (<i>n</i>)		
	Unaffected	Affected	Families	Unaffected	Affected	Families
Israel						
CSMC	229	169	335	82	80	137
Italy						
CRO	23	23	34	20	44	37
IEO	27	41	55	18	43	39
INT	129	160	179	45	87	90
Spain						
CNIO	61	40	60	71	61	66
HCSC	0	0	0	36	45	47
HSP	0	0	0	39	20	31
HVH	0	0	0	19	31	50
ICO	64	51	57	88	56	56

Supplemental Table 2

Table S2 rs7226991 and breast cancer risk by ER α tumor status

	Controls		ER α -negative				ER α -positive			
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	OR	95% CI	<i>n</i>	%	OR	95% CI
G/G	622	45.6	130	50.6	1.00		324	50.3	1.00	
G/A	591	43.3	104	40.5	0.84	0.63-1.11	255	39.5	0.82	0.67-1.01
A/A	152	11.1	23	8.9	0.73	0.45-1.19	66	10.2	0.84	0.61-1.16
Total	1,365		257				645			
Trend					0.85	0.69-1.04			0.88	0.76-1.02
						<i>P</i> = 0.12*				<i>P</i> = 0.085*
Dominant					0.82	0.62-1.07			0.83	0.68-1.00
						<i>P</i> = 0.14*				<i>P</i> = 0.049*

*Adjusted by age and center

Supplemental Table 3

Table S3 rs7226991 and breast cancer risk among *BRCA1/2* mutation carriers

Country	Center	<i>BRCA1</i> (n)	_w HR	95% CI	<i>BRCA2</i> (n)	_w HR	95% CI
Israel	CSMC	398	0.94	0.68-1.30	162	0.87	0.54-1.42
Italy	CRO	46	1.39	0.63-3.06	64	0.74	0.30-1.83
	IEO	68	0.61	0.25-1.50	61	0.74	0.39-1.40
	INT	289	0.82	0.61-1.10	132	0.59	0.32-1.09
Spain	CNIO	101	1.28	0.75-2.21	132	0.70	0.35-1.43
	HCSC	0	-	-	81	0.73	0.39-1.37
	HSP	0	-	-	59	0.52	0.15-1.83
	HVH	0	-	-	50	0.44	0.20-0.98
	ICO	115	0.80	0.44-1.45	144	0.68	0.37-1.39

ARTÍCULO 2

RESUMEN EN CASTELLANO

RANK induce transición epitelio mesénquima y características de células madre en células epiteliales de mama humanas y promueve la tumorigénesis y la metástasis

La señalización paracrina a través de receptor activador de NF- κ B (RANK) induce la expansión del epitelio mamario que ocurre durante la gestación además de promover la tumorigénesis en ratones. En este artículo se amplían estos datos a células humanas y se muestra que la vía de RANK promueve el desarrollo de células madre y cáncer de mama. La sobre-expresión de RANK (FL-RANK) en células tumorales y no tumorales de epitelio mamario induce la expresión de marcadores de células madre cancerosas. Altos niveles de expresión de RANK en células MCF10A no transformadas inducen cambios asociados tanto con Stemness como con transformación, incluyendo capacidad de reconstitución de la glándula mamaria, transición epitelio-mesénquima (EMT), aumento de la migración y crecimiento independiente de anclaje. Además, células que sobre-expresan RANK forman acinos aberrantes en cultivos tridimensionales debido a la ausencia de inhibición del crecimiento celular y de la polarización. La sobre-expresión de RANK en células tumorales deficientes del gen BRCA1 aumenta su capacidad de invasión en cultivo y su capacidad tumorigénica y metastática en ratones inmunodeprimidos. Se detectaron altos niveles de expresión de RANK en adenocarcinomas humanos que carecen de la expresión de receptores de hormonas, estrógeno y progesterona, y tumores con alto grado patológico y de proliferación. Una expresión elevada de RANK/RANKL se asocia de forma significativa con tumores metastáticos. En resumen, RANK promueve iniciación tumoral, progresión y metástasis en células epiteliales humanas mediante el aumento de la población CD44⁺CD24^{-/low} que induce Stemness y EMT: Estos resultados sugieren que la expresión de RANK en tumores primarios de mama está asociada a un mal pronóstico clínico.

RANK Induces Epithelial–Mesenchymal Transition and Stemness in Human Mammary Epithelial Cells and Promotes Tumorigenesis and Metastasis

Marta Palafox¹, Irene Ferrer¹, Pasquale Pellegrini¹, Sergi Vila¹, Sara Hernandez-Ortega¹, Ander Urruticoechea², Fina Climent³, Maria Teresa Soler³, Purificación Muñoz¹, Francesc Viñals⁴, Mark Tometsko⁵, Dan Branstetter⁶, William C. Dougall⁵, and Eva González-Suárez¹

Abstract

Paracrine signaling through receptor activator of NF- κ B (RANK) pathway mediates the expansion of mammary epithelia that occurs during pregnancy, and activation of RANK pathway promotes mammary tumorigenesis in mice. In this study we extend these previous data to human cells and show that the RANK pathway promotes the development of mammary stem cells and breast cancer. Overexpression of RANK (FL-RANK) in a panel of tumoral and normal human mammary cells induces the expression of breast cancer stem and basal/stem cell markers. High levels of RANK in untransformed MCF10A cells induce changes associated with both stemness and transformation, including mammary gland reconstitution, epithelial–mesenchymal transition (EMT), increased migration, and anchorage-independent growth. In addition, spheroids of RANK overexpressing MCF10A cells display disrupted acinar formation, impair growth arrest and polarization, and luminal filling. RANK overexpression in tumor cells with nonfunctional BRCA1 enhances invasiveness in acinar cultures and increases tumorigenesis and metastasis in immunodeficient mice. High levels of RANK were found in human primary breast adenocarcinomas that lack expression of the hormone receptors, estrogen and progesterone, and in tumors with high pathologic grade and proliferation index; high RANK/RANKL expression was significantly associated with metastatic tumors. Together, our findings show that RANK promotes tumor initiation, progression, and metastasis in human mammary epithelial cells by increasing the population of CD44⁺CD24[−] cells, inducing stemness and EMT. These results suggest that RANK expression in primary breast cancer associates with poor prognosis. *Cancer Res*; 72(11); 2879–88. ©2012 AACR.

Introduction

Receptor activator of NF- κ B (RANK) ligand (RANKL) and its receptor RANK, members of the TNF ligand and receptor super family, respectively, are key regulators of bone remodeling and metastasis (1), and mammary gland development (2). Impaired mammary gland development of the RANK and RANKL null mice is due to defective proliferation and increased apoptosis of mammary epithelium (2). Conversely, overexpression of RANK or RANKL in the mammary gland leads to increased

proliferation of the mammary epithelia (3, 4). It has been postulated that paracrine signaling through RANK/RANKL is responsible for the expansion of mammary stem cells observed during pregnancy and luteal cycles (5, 6).

We and others have recently shown that activation of RANK signaling promotes mammary tumorigenesis in mice (4, 7, 8). MMTV-RANK transgenic mice are prone to mammary tumors (4, 7). Reciprocally, pharmacologic inhibition of RANKL or genetic ablation of RANK attenuates mammary tumor development (7, 8).

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) involves the loss of E-cadherin–mediated cell–cell adhesion and apical–basal polarity, concomitantly with the acquisition of a motile behavior contributing to invasion and metastasis (9). Induction of EMT in immortalized human mammary epithelial cells also results in the expression of stem cell markers (10), suggesting that these 2 processes may be functionally linked. Because rodent studies have shown that activation of RANK signaling promotes tumor initiation, progression, and metastasis involving mechanisms including increased proliferation, survival (7, 8), and enhanced regenerative capacity of cancer stem cells (8), then we analyzed the contribution of the RANK pathway to human breast stem cells and EMT using a panel of normal and tumoral human mammary epithelial cells. Our

Authors' Affiliations: ¹Cancer Epigenetics and Biology Program; ²Catalan Institute of Oncology; ³University Hospital of Bellvitge; ⁴University of Barcelona, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Spain; and Departments of ⁵Hematology/Oncology Research and ⁶Pathology, Amgen Inc., Seattle, Washington

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Eva González Suárez, Cancer Epigenetics and Biology Program, PEBC, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Gran Via de L'Hospitalet, 199–203. 08908 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona. Phone: 34-932-607-253; Fax: 34-9326-0719; E-mail: egsuarez@idibell.cat

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0044

©2012 American Association for Cancer Research.

results highlight the relevance of the RANK pathway in human mammary stem cells and breast cancer.

Materials and Methods

Culture of human mammary epithelial cells

All cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC), except UACC3199, which was obtained from the Arizona Cancer Center (Tucson, AZ). ATCC provides molecular authentication in support of their collection through their genomics, immunology, and proteomic cores, as described, by using DNA barcoding and species identification, quantitative gene expression, and transcriptomic analyses (ATCC Bulletin, 2010). UACC3199 cells harbor a methylated *BRCA1* promoter suppressing gene transcription (11). UACC3199 was authenticated by its ability to reexpress *BRCA1* after DNA demethylation treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine. All lines were expanded and frozen within 2 weeks of purchase and used for a maximum of 2 months after resuscitation of frozen aliquots. MCF10A and HMECs immortalized with telomerase were cultured as described in Debnath and colleagues (12). Other cell culture conditions are described in Supplementary Methods.

Lentiviral infection

Lentiviral infection using pLV409-RANK, pLV417 control that contain a luciferase reporter, or pLenti6/V5-DEST-RANK, pLenti6/V5-DEST-tubGFP was done following the manufacturer's indications (Invitrogen) and Supplementary Methods.

Protein isolation and Western blot analysis

To evaluate activation of RANK signaling, MDA-MB-436, HCC1937, and UACC3199 cells were starved (S) with 0% FBS for 48 hours, MCF10A cells were starved in 2% serum without EGF overnight and then stimulated with hRANKL (100 ng/mL; Amgen). Proteins were isolated and analyzed following standard procedures and antibodies (Supplementary Methods).

Three-dimensional cultures and immunofluorescence analysis from human cells

Acinar structures were cultured and stained as described (12) and Supplementary Methods. Confocal analysis was carried out using a Leica confocal microscopy system equipped with argon and HeNe lasers. Images were captured using LasAF software (Leica).

Flow cytometry

Cells were seeded at 50% of confluence in growth medium. After 24 hours 100 ng/mL hRANKL (Amgen) were added. Forty-eight hours later medium was removed, MCF10A cells were washed and stained as reported in Supplementary Methods, and analyzed with the fluorescence-activated cell sorting Canto BD Flow Cytometer.

Xenograft in immunodeficient mice

FL-RANK or parental MCF10A, MDA-MB-436, or UACC 3199 (3×10^6) cells mixed with Matrigel (50%) were injected into the fat pad or (10^6) in the tail vein of severe combined immunodeficient (SCID)/Beige (Charles River) or athymic nude (Har-

lan). After 110 to 160 days, MCF10A-injected mice were injected with 150 μ g/g luciferin substrate and mammary glands and lungs were scored for bioluminescence and cell growth using (IVIS; Xenogen). Outgrowths were scored in mammary glands that were efficiently cleared. Other mice were observed for palpable tumors or health deterioration once a week. Lungs were collected at indicated times, sectioned every 100 μ m, and scored for metastasis. All mice were bred and maintained in a specific pathogen-free AAALAC International accredited facility with controlled light/dark cycle, temperature, and humidity. Cages, bedding, food, and water were all autoclaved. Experimental procedures were approved by the Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL) ethics committee and were in accordance with Spanish and European regulations.

Human tumor samples

Samples from breast cancer patients for mRNA analysis were collected from the University Hospital of Bellvitge (details in Supplementary Methods), using protocols approved by the IDIBELL ethics committee and according to Declaration of Helsinki. Samples were collected immediately after surgery and subsequently frozen or fixed for RNA extraction or immunohistochemistry (IHC).

Samples from consented breast cancer patients for immunohistochemical analysis were ethically collected and procured through various human biospecimen providers (Asterand, Ardaís, Bio-Options, Cytomx Origene, and Zoion). Samples were obtained from providers through the Amgen Tissue Bank and immunohistochemical analysis done at Amgen.

Immunohistochemistry

Anti-human RANK or vimentin IHC was carried out on sections from formalin-fixed, paraffin-embedded specimens using anti-human RANK monoclonal antibodies (N-1H8 and N-2B10; Amgen) as described in Gonzalez-Suarez and colleagues (7) or anti-human vimentin.

Statistical analyses

To evaluate whether RANK/RANKL mRNA levels discriminate metastatic tumors, we used Multivariate ANOVA (MANOVA) considering N0 = lymph node negative ($n = 25$); Ni+ = isolated tumor cells in nodes; isolated groups of epithelial cells less than 0.2 mm in diameter, only visible by IHC ($n = 7$); Nmi = lymph node metastases more than 0.2 mm but less than 2 mm in diameter ($n = 5$); N1 = lymph node positive or distant metastasis ($n = 26$). Analyses was adjusted by tumor subtype (S): ER⁺PR⁺Her2⁻ ($n = 39$); ER⁺PR⁺Her2⁺ ($n = 5$); ER⁻PR⁻Her2⁺ ($n = 8$); ER⁻PR⁻Her2⁻ ($n = 10$). Logarithmic transformation was required to avoid data heteroscedasticity.

Plasmids, antibodies, and other methods are included in Supplementary Methods.

Results

RANK overexpression induces EMT in nontransformed human mammary epithelial cells

To evaluate the impact of RANK overexpression in human mammary epithelial cells, we obtained stable MCF10A cells,

immortal but nontransformed cells (12), expressing high levels of the full-length hRANK receptor (FL-RANK) and a control vector (PARENTAL; Fig. 1A). FL-RANK expression levels were maintained during serial passages, whereas endogenous RANK in parental cells was low or undetectable by our methodology. RANKL expression was very low and similar in both genotypes (Fig. 1A, Supplementary Fig. S1A). Functionality of the protein was shown by phosphorylation of I κ B α and the p65 subunit of NF- κ B upon RANKL stimulation (Supplementary Fig. S1B). Increased basal levels of RANK downstream targets, P-I κ B α , P-p38, P-Erk, and P-Akt were observed in FL-RANK when compared with parental cells (Supplementary Fig. S1C), indicating that the pathway is constitutively active. Parental cells showed highly organized cell–cell adhesion with cobble stone–like appearance at confluence, whereas FL-RANK MCF10A cells had an elongated appearance and loss of cell–cell contacts with

a spindle-like fibroblast morphology, suggesting that the cells may be undergoing EMT (Fig. 1B). In monolayer cultures, parental MCF10A cells show high levels of the epithelial protein E-cadherin, low levels of vimentin, and no expression of fibronectin (mesenchymal proteins). In contrast, undetectable E-cadherin and strong staining of vimentin and fibronectin was observed in FL-RANK MCF10A cells, supporting an EMT phenotype (Fig. 1C). Quantitative real-time reverse transcriptase (RT-PCR) analyses confirmed changes observed for fibronectin, vimentin, and E-cadherin (73- and 25-fold increase, 13-fold decrease, respectively) and increased N-cadherin expression in FL-RANK cells (Fig. 1D). We observed a clear increase in mRNA levels of transcription factors known as repressors of E-cadherin promoter activity (13, 14), including, Snail (23-fold), Twist (3-fold), Zeb1 (6-fold), Zeb2 (10-fold), and Slug (2-fold) in FL-RANK MCF10A (Fig. 1D). The increased

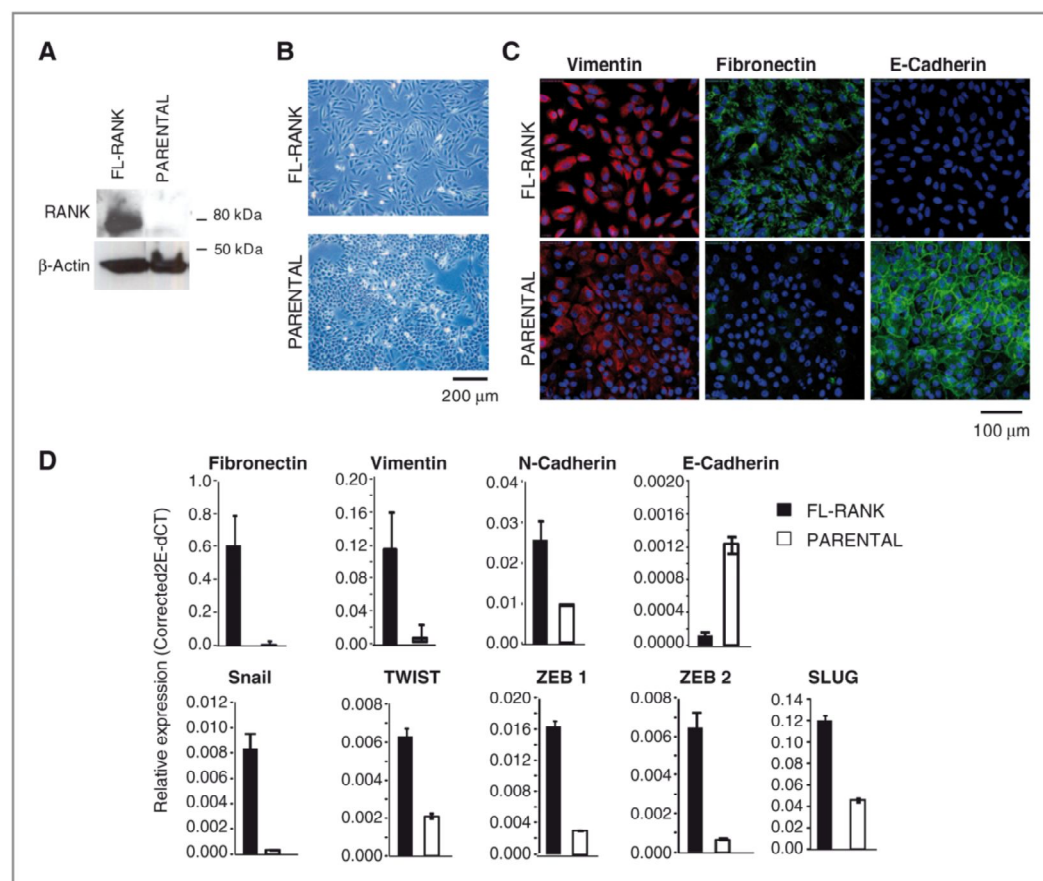


Figure 1. RANK overexpression induces EMT in MCF10A. A, Western blot showing RANK expression in MCF10A cells infected with lentivirus containing FL-RANK and control vectors (PARENTAL). Pictures showing representative morphology (B) and immunofluorescence analyses of epithelial and mesenchymal proteins (C) of FL-RANK and parental MCF10A cells. D, mRNA expression levels of EMT proteins and transcription factors in FL-RANK and parental MCF10A cells measured by qRT-PCR relative to PP1A. Determinations were done in triplicate and SDs are shown.

expression in EMT-related genes was confirmed using independently transduced pools of RANK expressing MCF10A and also in a distinct, nontransformed breast cell line, HMECS immortalized with telomerase (Supplementary Fig. S2A–C). Treatment of FL-RANK MCF10A cells with hRANKL for 48 hours led to further increases in EMT genes such as *Vimentin* (1.4 fold) or *Snail* (7-fold), suggesting that RANKL stimulation further induces the EMT characteristics of the FL-RANK cells (Supplementary Fig. S2D). In summary, analyses of morphologic and molecular changes indicated that RANK overexpression causes EMT in human mammary epithelial cells.

RANK overexpression induces stemness in nontransformed human mammary epithelial cells

It has been shown that mammary cells undergoing EMT exhibit stem cell markers and properties of stem cells (10). We therefore looked at markers that have been related to stem cells and cancer stem cells in the human breast such as CD44, CD24, EpCAM, CD10, CD49f, and CD133 (15–20). We found that most FL-RANK MCF10A cells ($82.6 \pm 2.9\%$) were CD44⁺CD24[−] (Fig. 2A, Supplementary Fig. S3A), compared with only $3.1 \pm 0.15\%$ parental cells. In correlation with their mesenchymal phenotype, most FL-RANK cells (99.6%) were negative for the

luminal marker EpCAM and 95.6% positive for the basal marker CD10, whereas parental cells were EpCAM⁺ (87.7%), CD10⁺ (64.4%); lower levels of CD49f, and a slight increase in CD133 expression was observed in FL-RANK cells (Fig. 2B and Supplementary Fig. S3A). Both phenotypes related with basal/stem-like cells (16, 17, 20, 21). RANKL stimulation for 48 hours further enhanced the changes induced by RANK, including the increased frequency of CD44⁺CD24[−] (10% more) and CD10 cells, and the decreased EpCAM and CD49f (Supplementary Fig. S3B). FL-RANK cells also show significantly higher levels of mRNA expression of SOX2, NANOG, and OCT4 (fold change 3×, 3×, and 2×, respectively), transcription factors expressed in mammary stem cells and breast tumor cells (ref. 22; Fig. 2C). To evaluate the *in vivo* stem cell activity, we used the cleared fat pad transplant assay (23, 24). FL-RANK MCF10A cells, in contrast to parental, were detected in the fat pad 4 months after injection, as revealed by bioluminescence analyses (Fig. 2D); moreover, they formed small outgrowths showing that, in correlation with their stem characteristics, FL-RANK MCF10A cells were able to repopulate the mammary epithelia *in vivo* (Fig. 2E and F; Supplementary Fig. S3C). In summary, these results showed that in human mammary cells RANK overexpression induces the expression of mammary stem cell

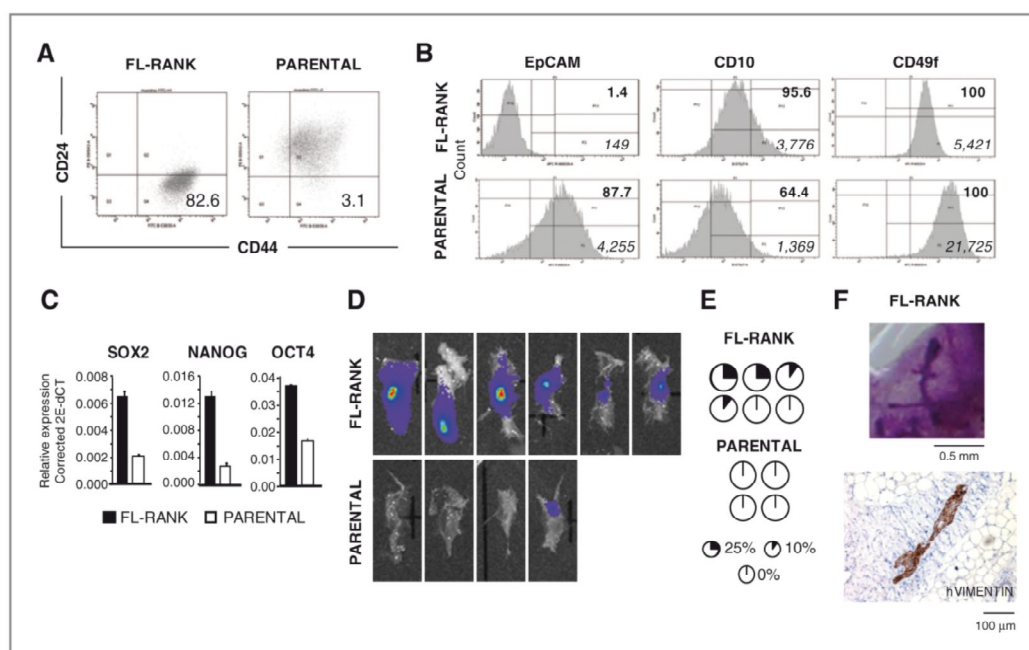


Figure 2. RANK overexpression induces stemness in MCF10A. Flow cytometry analyses (A, dot plots; B, histograms) showing expression of indicated proteins in FL-RANK and parental MCF10A. Numbers indicate the frequency of CD44⁺/CD24[−] cells (A) or the frequency of positive cells (B) based on the negative population (in bold) or the mean of the histograms (in italic). C, qRT-PCR showing the expression of Sox2, Nanog, and Oct4 relative to PP1A in FL-RANK and parental MCF10A. Determinations were done in triplicate and SDs are shown. D, bioluminescence (BLI) images of mammary glands of SCID/beige mice 4 months after injection with FL-RANK or parental MCF10A cells. E, schematic representation of engraftment. Each circle represents one mammary gland with the percentages of engraftment. F, representative image of outgrowth (top). Human-specific staining (vimentin) confirmed the human origin of the FL-RANK outgrowths (bottom).

markers and transcription factors and the ability to generate mammary outgrowths *in vivo*, a function of stem cells.

RANK overexpression increases migration and induces hallmarks of transformation in MCF10A cells

The main functional consequence of EMT is enhanced cell scattering and migration. Thus, in wound healing assays, FL-RANK MCF10A cells migrated faster than the parental cells, both in the presence or absence of EGF. RANKL significantly increased the motility of FL-RANK as compared with EGF, and the most motile cells were the FL-RANK cells treated with EGF plus RANKL (Fig. 3A).

We next asked whether RANK overexpression could induce transformation. MCF10A cells grown in Matrigel with EGF, recapitulate several features of breast epithelium *in vivo*,

including the formation of acinus-like spheroids with a hollow lumen, apicobasal polarization, and growth arrest (12, 25), whereas transformed mammary epithelial cells show a multi-acinar phenotype, filled lumen, and absence of proliferative arrest (25). In contrast to parental, FL-RANK MCF10A cells formed large and disrupted structures at 20 days of culture (Fig. 3B). RANKL treatment resulted in aberrantly elongated tubular like structures (day 2) that by day 20 looked like aggregates (Fig. 3B). Confocal cross-sections revealed in FL-RANK cultures abnormal structures often composed of cells filling the luminal space and occasionally showing protrusions into the Matrigel, characteristic of invasive cells (Fig. 3C). In FL-RANK structures E-cadherin expression was hardly detected in the cell-cell contacts and decreased expression or mislocalization of the basal marker CD49f was often observed in FL-RANK cells

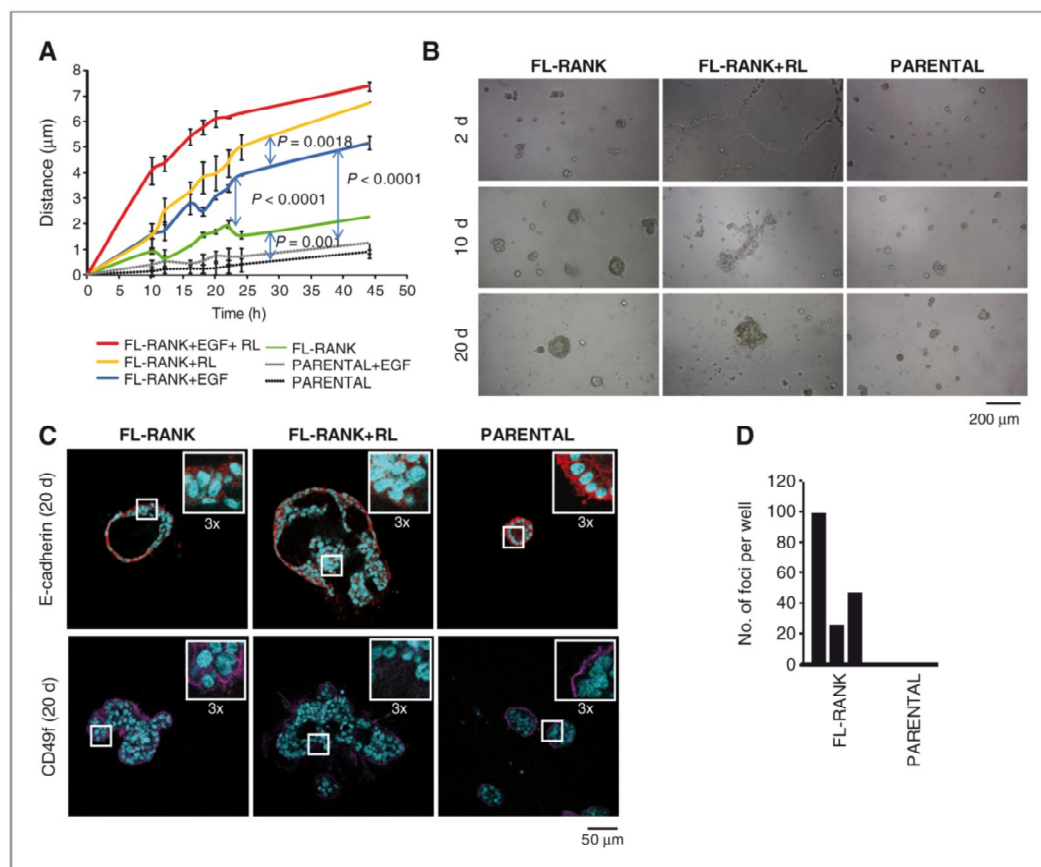


Figure 3. FL-RANK MCF10A cells show increased migration and hallmarks of transformation. **A**, wound healing assays. Parental and FL-RANK MCF10A cells were EGF-starved overnight and then stimulated with EGF (20 ng/mL), RANKL (100 ng/mL), or both. Quantification of the distance invaded at different time points is shown. Assay was done in triplicates and SD and *P* values for indicated comparisons are included. One representative experiment of 5 is shown. Representative phase contrast (**B**) and confocal pictures (**C**) with magnified insets of FL-RANK and parental acini at the indicated days (cyan, nuclei). Data are representative of 3 independent experiments. **D**, anchorage independence assay. Foci number in FL-RANK or parental cells after 4 weeks of culture in soft agar are represented for 3 independent experiments.

indicating loss of polarization (Fig. 3C). Unlike parental cells, FL-RANK acini/aggregates were not growth arrested after 20 days of culture as shown by the presence of ki67 and activated caspase 3 (Supplementary Fig. S4A). Moreover, FL-RANK overexpressing cells cultured with RANKL formed acini with filled lumens in the absence of EGF, whereas parental cells were unable to grow in these conditions (Supplementary Fig. S4B). Consistent with their nontransformed phenotype, parental MCF10A cells failed to grow in soft agar whereas FL-RANK MCF10A cells formed numerous foci (Fig. 3D), indicating that RANK expression confers the cells the ability to grow in the absence of anchorage, a characteristic of tumor or stem cells. We concluded that RANK overexpression in human mammary epithelial cells resulted in hallmarks of transformation, including, increased motility, inability to respond to growth arrest signals, impaired polarization, luminal filling, and growth in soft agar. Despite *in vitro* observations consistent with the RANK-dependent transformation of MCF10A cells, these cells although able to grow *in vivo* (Fig. 2D and E) were nontumorigenic when injected in the cleared fat pad of immunodeficient mice and did not form lung metastasis when injected in the tail vein (Supplementary Fig. S4C).

RANK overexpression increases the frequency of CD44⁺CD24⁻ cells in BRCA1-deficient cell lines

We aim to evaluate whether RANK can cooperate with other mutations relevant in breast cancer such as *BRCA1* deficiency (26) during tumorigenesis and metastasis. We therefore overexpressed RANK in breast cancer cells defective for *BRCA1*, MDA-MB-436, HCC1937, and UACC3199 cells (27) and con-

firmed its functionality (Fig. 4A and Supplementary Fig. S5A and B). RANK expression was low or undetectable by our methods; RANKL expression was low and comparable between both phenotypes (Fig. 4A, Supplementary Fig. S5A). As in MCF10A cells, RANK overexpression increased the frequency of CD44⁺CD24⁻ cells in all 3 cell lines due to reduced CD24 levels as compared with parental cell lines (Fig. 4B, Fig. S5C and D); a further reduction in CD24 expression was observed after RANKL stimulation in most cells (Supplementary Fig. S5C). Lower frequency of EpCAM⁺ (13% reduction) and CD49fhi (17% reduction) cells in FL-RANK MDA-MB-436 and higher of CD10⁺ in UACC3199-FL-RANK, as compared with the correspondent parental lines was observed (Supplementary Fig. S5C and D). Consistent with their mesenchymal morphology, MDA-MB-436 cells express fibronectin, vimentin, N-cadherin, and the transcription factors, Snail, Twist, Zeb1 and Zeb2, and even higher levels upon RANK overexpression (Fig. 4C, Supplementary Fig. S5E). In FL-RANK HCC1937 and UACC3199, the expression levels of EMT mesenchymal markers or transcription factors, and the frequency of EpCAM⁺ was similar to the corresponding parental lines (Fig. 4C, Supplementary Fig. S5D and E). These results showed that RANK induces CD44⁺CD24⁻ phenotype in breast cancer cell lines concomitantly with or separately from EMT.

RANK overexpression increases invasiveness and promotes tumorigenesis and metastasis in BRCA1-deficient cell lines

We next investigated the functional consequences of RANK overexpression in BRCA1-defective breast cancer cell lines.

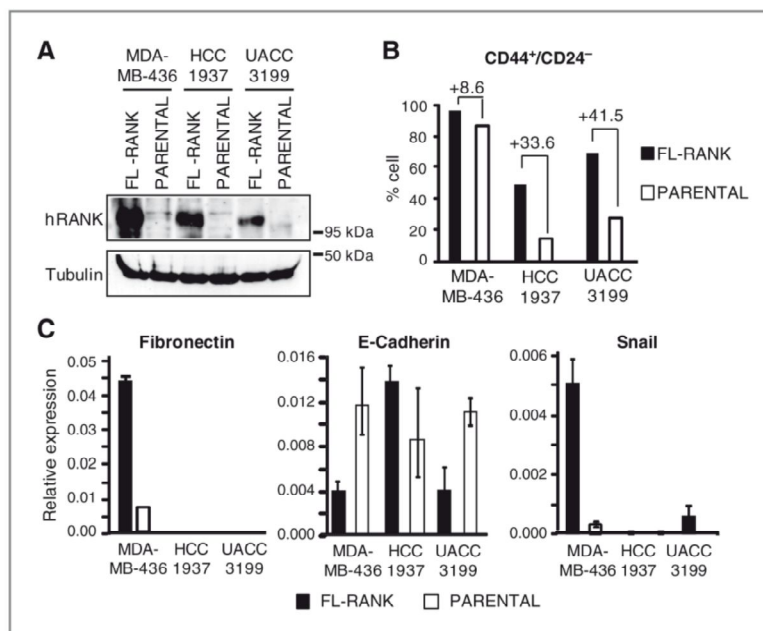


Figure 4. RANK overexpression increases the frequency of the CD44⁺CD24⁻ population in cells with nonfunctional BRCA1. **A**, Western blot showing RANK protein expression in MDA-MB-436, HCC1937, and UACC3199 cells infected with lentivirus expressing FL-RANK or a control vector (PARENTAL). **B**, frequency of CD44⁺CD24⁻ cells in parental and FL-RANK nonfunctional BRCA1 cells analyzed by flow cytometry. Values for one representative experiment of 4 are shown. **C**, qRT-PCR showing mRNA expression of the indicated genes in parental and FL-RANK cells with nonfunctional BRCA1 relative to PP1A. Determinations were done in triplicate and SDs are shown.

Monolayer cultures revealed a modest increase in growth of the 3 FL-RANK BRCA1-defective cell lines (Supplementary Fig. S6A). Protusions into the Matrigel, indicative of an invasive phenotype, were often observed in MDA-MB-436 FL-RANK acini but, not in parental, and even more prominent in the presence of RANKL (Supplementary Fig. S6B). Quantification of proliferation in acinar cultures revealed a small increase upon RANK overexpression in some cell lines. FL-RANK cells showed lower levels of apoptosis when cultured in the presence of RANKL (Supplementary Fig. S6C).

To investigate whether RANK expression in BRCA1-defective cells promotes tumorigenesis and metastasis *in vivo*, we used the MDA-MB-436 cells in which EMT was enhanced upon RANK overexpression and UACC3199 cells in which RANK increased the frequency of CD44⁺CD24⁻ cells but no EMT was observed. After injection in the mammary fat pad, FL-RANK MDA-MB-436 and UACC3199 cells gave rise to tumors with faster growth and/or a shorter latency than parental cells (Fig. 5A and B). We next determined whether RANK overexpression would enhance the metastatic properties of these cells. A total of 6.5 weeks after tail vein injection, frequency and size of lung metastasis were higher in mice inoculated with FL-RANK cells as compared with parental MDA-MB-436 cells (Fig. 5C). By 12 weeks metastatic lesions in mice injected with FL-RANK MDA-MB-436 cells colonized most of the lung area as compared with smaller metastatic foci formed by parental cells (Fig. 5D; Supplementary Fig. S6D). UACC3199 cells were poorly metastatic as compared with MDA-MB-436, in correlation with the absence of EMT in these cells. Micrometastases were observed in 50% mice injected with FL-RANK UACC3199 cells

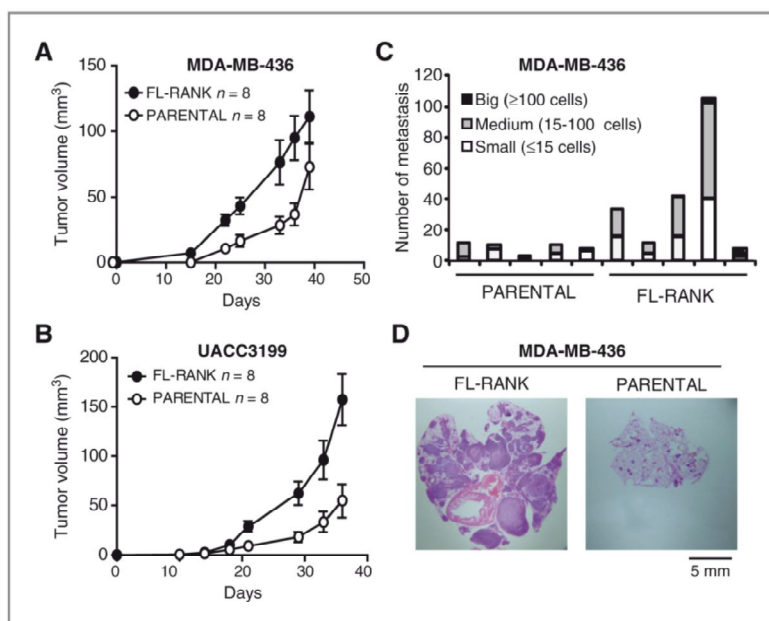
(up to 56 metastatic foci) and in 33% ($n = 6$) mice injected with the parental UACC3199 (up to 3 lesions per mouse; Supplementary Fig. S6D). In summary, RANK overexpression enhanced tumorigenesis and metastasis in BRCA1-deficient cells.

High RANK/RANKL expression levels are found in aggressive and metastatic adenocarcinomas

To investigate the potential clinical relevance of RANK pathway in human breast cancer, we analyzed RANK and RANKL mRNA expression levels in adenocarcinomas considering their pathologic characteristics. We found significantly higher levels of mRNA RANK in human tumors that lack expression of the hormonal receptors for estrogen and progesterone (ER and PR) as compared with (ER⁺PR⁺) tumors that usually bear a better prognosis, and in tumors with high proliferation index (more than 40% of ki67⁺ cells) and high pathologic grade (Fig. 6A). Similar epithelial and leucocyte content was found within all groups (Supplementary Fig. S7A). To confirm the mRNA results, we analyzed RANK protein expression by IHC in a second collection of breast carcinomas. Consistent with our previous study (7), RANK protein expression was found within the carcinoma element of some tumors and a subset of infiltrating macrophages but was not observed on stromal cells, fibroblasts, or lymphocytes (Fig. 6B). A higher incidence of RANK protein expression was observed in ER⁻/PR⁻ (50%) versus ER⁺/PR⁺ (18%) and in grade III (32%) versus grade I (13%) or grade II (18%; Fig. 6C).

Our results with cell lines indicated that activation of RANK pathway enhances migration and metastasis. In human breast

Figure 5. RANK overexpression promotes tumorigenesis and metastasis population in cells with nonfunctional BRCA1. FL-RANK and parental MDA-MB-436 (1×10^5 ; A) or UACC3199 (3×10^5) cells (B) were implanted in the fat pad of immunodeficient mice. Tumor volume $l \times w \times h$ (length $\times$ width $\times$ height) in mm³ is shown at the indicated days after implantation, SEM, and *P* values are included for one representative experiment of 2. C, number of metastatic lesions 6.5 weeks after tail vein injection of 1×10^5 FL-RANK or parental MDA-MB-436 for one representative experiment of 2. Total number of metastatic foci in 3 representative sections was quantified. Each bar represents one mouse. D, representative hematoxylin and eosin stain pictures of lung metastasis formed by FL-RANK and parental MDA-MB-436 cells 12 weeks after tail vein injection.



Palafox et al.

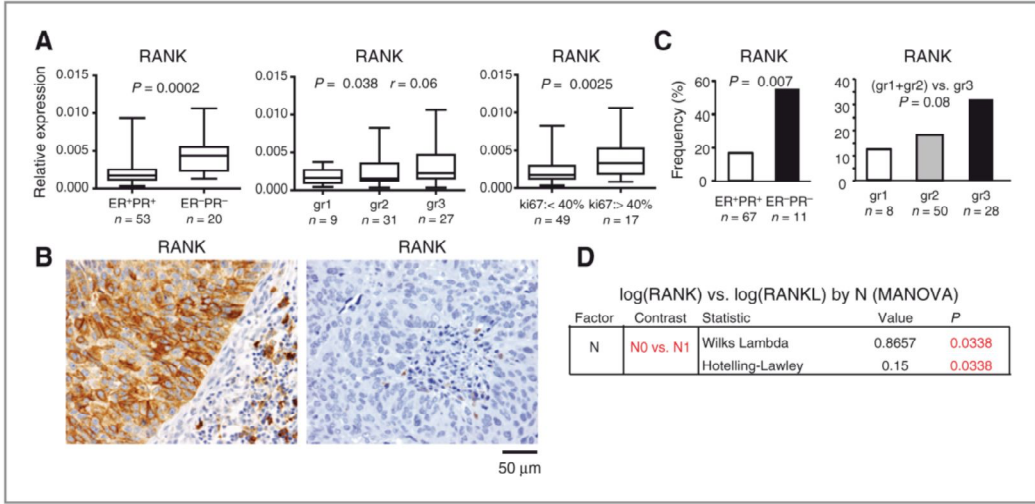


Figure 6. Aggressive and metastatic adenocarcinomas of the human breast express high levels of RANK/RANKL. A, box and whiskers graph showing expression levels of RANK mRNA relative to PP1A in clinical samples of breast cancer patients measured by qRT-PCR. Determinations for each sample were done in triplicates and means are used. Samples were classified by expression of ER, PR, ki67, and pathologic grade (P values are indicated). B, hRANK protein expression (determined by IHC) in ER⁺PR⁺ human adenocarcinomas, showing a representative tumor with RANK-positive epithelial carcinoma cells (left) and a tumor in which the epithelial carcinoma cells do not express RANK (right). RANK protein was also detected on a subset of infiltrating macrophages in both tumor types. C, frequency of RANK protein expression (determined by IHC) in epithelial carcinoma cells in tumors classified by ER, PR expression, and pathologic grade (gr). The degree of RANK-positive macrophage infiltration was not substantially different between cohorts (73% for ER⁺PR⁺ and 82% for ER⁺PR⁻). P values for χ^2 test are indicated. D, MANOVA test of logRANK/logRANKL expression and metastasis. N0, lymph node negative; N1, lymph node positive or distant metastasis.

adenocarcinomas using a multivariate ANOVA analyses, we found that RANK/RANKL mRNA expression levels were able to discriminate between nonmetastatic (N0) and metastatic tumors (N1; either to the lymph node or other sites; Fig. 6D; Supplementary Fig. S7B–E). These results indicated that high RANK expression levels correlate with tumor aggressiveness and that RANK/RANKL expression in the primary tumor may indicate its metastatic behavior.

Discussion

The RANK/RANKL signaling pathway, although dispensable for the initial development of the mammary gland in mice (2), controls the expansion of the stem cell compartment in adults (5, 6). Similarly, it has been recently shown that RANK is expressed in several stem cells of the skin, and that RANK signaling activate the hair cycle and epidermal growth (28). The mechanism responsible for this RANK-induced expansion of stem cells remains unknown. We show that RANK overexpression in human MCF10A cells results in constitutive activation of the pathway shown by the increased levels of RANK downstream targets (P-I κ B α , P-p38, P-Akt, and P-Erk). It is well established that overexpression of any TNF receptor family member leads to ligand-independent receptor oligomerization and ligand-independent activation of signal transduction pathways (29–32). RANK overexpression generates a EpCAM⁺/CD10⁺/CD49f^{lo} phenotype, markers used to identify populations enriched in mammary stem cells in the healthy breast (15–17) and provides the MCF10A with the ability to recon-

stitute the cleared fat pad of immunodeficient mice in contrast to parental MCF10A that are unable to grow *in vivo* (33). Moreover, RANK overexpression increases the frequency of CD44⁺CD24^{lo} cells, a phenotype ascribed to human breast cancer stem cells, in MCF10A and in breast cancer cell lines with nonfunctional BRCA1. Plasticity of breast cancer cells with respect to CD24, CD44, EpCAM, and CD49f has been reported (18, 34, 35). Although we cannot rule out that RANK is promoting proliferation or survival of stem cells, the rapid acquisition of stem markers by the entire MCF10A population upon RANK overexpression suggests that activation of RANK signaling may induce a dedifferentiation process.

An association between RANK expression and EMT has been reported in prostate cancer (36). Here we show that RANK overexpression directly induces a strong EMT phenotype in MCF10A cells (and HMECs). EMT induced by twist/snail generates cells with cancer stem cell properties (10), and usually CD44⁺CD24^{lo} cells have a mesenchymal phenotype as compared with the luminal phenotype of CD24⁺ cells, leading to the belief that CSC and EMT are interchangeable events. However, despite the gain in CD44⁺CD24^{lo} phenotype induced by RANK in all BRCA1-deficient cell lines, an increase in the mesenchymal markers is observed only in MDA-MB-436 cells, similar to results reported with urokinase receptor signaling (37). Thus, RANK overexpression induces CD44⁺CD24^{lo} phenotype in nontransformed mammary epithelial cells and in breast cancer cell lines that can be accompanied by EMT depending on the cell of origin.

We have previously shown that RANK overexpression promotes mammary tumorigenesis in mice (7), but the relevance of this pathway in human breast disease remained largely unknown, except for a single-nucleotide polymorphism in the locus of the TNFRSF11A gene (*RANK*) that associates with breast cancer risk (38). Now we show that in nontransformed mammary epithelial cells, RANK expression enhances migration, disrupts acinar formation, and allows growth in soft agar, a classical transformation assay. Changes observed in FL-RANK MCF10A acini are consistent with those described in mouse MMTV-RANK MECs (4, 7) and may reflect an imbalance response between proliferation and apoptosis that together with the impaired polarization results in increased organoid size and luminal filling. Despite these changes associated with transformation, FL-RANK MCF10A cells do not form tumors or metastasis when injected in immunodeficient mice. Similar results have been observed with several oncogenes, such as *ErbB2/neu*, that are able to disrupt acinus formation and transform MCF10A or HMLE *in vitro* (39) but fail to convey tumor growth as xenografts (10, 40). It has been shown that RANK signaling induces migration and bone metastasis in human breast cancer lines (41). Here, we provide a putative mechanism by which RANK promotes tumorigenesis, migration, and metastasis. The enhanced motility and ability to seed tumors in other locations provided by the CD44⁺CD24⁻ phenotype in cells with nonfunctional BRCA1, together with the EMT phenotype when existing, indicates that metastasis may not be restricted to the bone. In fact, pharmacologic inhibition of RANKL or genetic ablation of RANK significantly reduced the incidence and multiplicity of lung metastasis in MMTV-neu mice (7, 42). These findings show that RANK overexpression in human breast cancer cells increases their aggressiveness and may result in poorer clinical outcome, as recently shown (43). In fact, we observe that RANK expression progressively increases with pathologic grade and significantly associates with a high proliferative index in clinical samples of breast cancer patients. Higher levels of RANK mRNA expression were found in (ER⁻PR⁻) tumors, which were consistent with the higher incidence of RANK protein expression in these tumors. ER⁻PR⁻ tumors are more aggressive, show a higher incidence of metastasis and worse prognosis than luminal tumors, and contain a higher frequency of CD44⁺/CD24⁻ cells (21, 44). Moreover, RANK/RANKL mRNA expression levels allow discrimination between metastatic and nonmetastatic adenocarcinomas.

References

- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337–42.
- Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 2000;103:41–50.
- Fernandez-Valdivia R, Mukherjee A, Ying Y, Li J, Paquet M, DeMayo FJ, et al. The RANKL signaling axis is sufficient to elicit ductal side-branching and alveologenesis in the mammary gland of the virgin mouse. *Dev Biol* 2009;328:127–39.
- Gonzalez-Suarez E, Branstetter D, Armstrong A, Dinh H, Blumberg H, Dougall WC. RANK overexpression in transgenic mice with mouse mammary tumor virus promoter-controlled RANK increases prolifer-

ation and impairs alveolar differentiation in the mammary epithelia and disrupts lumen formation in cultured epithelial acini. *Mol Cell Biol* 2007;27:1442–54.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

M. Tometsko, D. Branstetter, and WC. Dougall are Amgen employees and stockholders. No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: W.C. Dougall, E. González-Suárez

Development of methodology: M. Palafox, I. Ferrer, P. Pellegrini, S. Hernandez-Ortega, D. Branstetter, W.C. Dougall, E. González-Suárez

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): M. Palafox, A. Urruticoechea, F. Climent, M.T. Soler, M. Tometsko, D. Branstetter, W.C. Dougall, E. González-Suárez

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): M. Palafox, I. Ferrer, P. Pellegrini, M. Tometsko, D. Branstetter, W.C. Dougall, E. González-Suárez

Writing, review, and/or revision of the manuscript: M. Palafox, I. Ferrer, P. Pellegrini, A. Urruticoechea, P. Muñoz, F. Viñals, W.C. Dougall, E. González-Suárez

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): P. Pellegrini, S. Vila

Study supervision: E. González-Suárez

Acknowledgments

The authors thank M.A. Pujana, C. Maxwell, and M. Esteller for reagents and helpful advice, K. Rohrbach, R. Soriano, and L.Y. Huang for expert technical support of the IHC procedures, the IDIBELL animal facility service, histology service, and UB-SCT for technical support; X. Sole and V. Navarro for statistic analyses; O. Casanovas, C. Muñoz Pinedo, and members of the laboratory for useful discussions.

Grant Support

This work was supported by grants to E. González-Suárez by the Spanish Ministry of Science and Innovation MICINN (SAF2008-01975), by Ramon y Cajal (EGS), by the Scientific Foundation of the AECC (Catalunya), by Concern Foundation, and by institutional funds provided by the Generalitat de Catalunya to the PEBC. M. Palafox is recipient of a FPU grant, P. Pellegrini is recipient of a FPI grant, both from the MICINN.

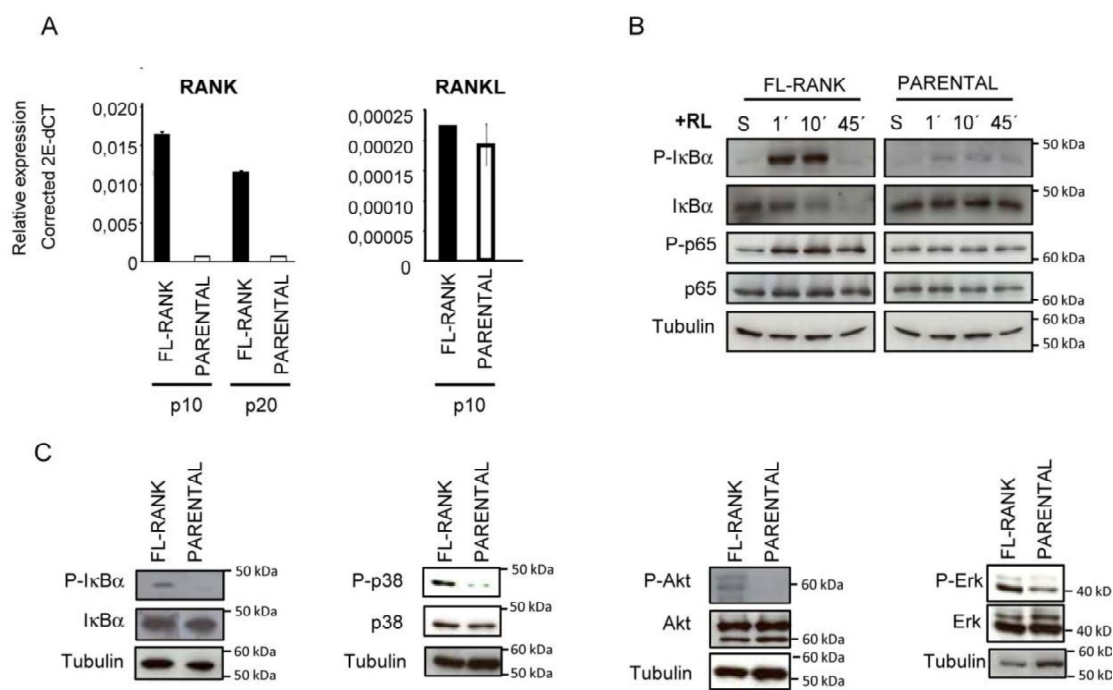
The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received January 5, 2012; revised March 23, 2012; accepted March 31, 2012; published OnlineFirst April 10, 2012.

8. Schramek D, Leibbrandt A, Sigl V, Kenner L, Pospisilik JA, Lee HJ, et al. Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progesterin-driven mammary cancer. *Nature* 2010;468:98–102.
9. Thiery JP, Cloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139:871–90.
10. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704–15.
11. Rice JC, Massey-Brown KS, Futscher BW. Aberrant methylation of the BRCA1 CpG island promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA in sporadic breast cancer cells. *Oncogene* 1998;17:1807–12.
12. Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* 2003;30:256–68.
13. Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:548–58.
14. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007;7:415–28.
15. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3983–8.
16. Bachelard-Cascales E, Chapellier M, Delay E, Pochon G, Voeltzel T, Puisieux A, et al. The CD10 enzyme is a key player to identify and regulate human mammary stem cells. *Stem Cells* 2010;28:1081–8.
17. Lim E, Vaillant F, Wu D, Forrest NC, Pal B, Hart AH, et al. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med* 2009;15:907–13.
18. Meyer MJ, Fleming JM, Ali MA, Pesesky MW, Ginsburg E, Vonderhaar BK. Dynamic regulation of CD24 and the invasive, CD44posCD24neg phenotype in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res* 2009;11:R82.
19. Meyer MJ, Fleming JM, Lin AF, Hussnain SA, Ginsburg E, Vonderhaar BK. CD44posCD49fhiCD133/2hi defines xenograft-initiating cells in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Res* 2010;70:4624–33.
20. Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, Carlson MD, Ambudkar SV, Varticovski L. Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res* 2008;10:R10.
21. Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:876–87.
22. Simoes BM, Piva M, Iriando O, Comaills V, Lopez-Ruiz JA, Zabalza I, et al. Effects of estrogen on the proportion of stem cells in the breast. *Breast Cancer Res Treat* 2011;129:23–35.
23. Deome KB, Faulkin LJ Jr, Bern HA, Blair PB. Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res* 1959;19:515–20.
24. Smith GH. Experimental mammary epithelial morphogenesis in an *in vivo* model: evidence for distinct cellular progenitors of the ductal and lobular phenotype. *Breast Cancer Res Treat* 1996;39:21–31.
25. Schmeichel KL, Bissell MJ. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *J Cell Sci* 2003;116:2377–88.
26. Friedenson B. The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. *BMC Cancer* 2007;7:152.
27. Drew Y, Mulligan EA, Vong WT, Thomas HD, Kahn S, Kyle S, et al. Therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor AG014699 in human cancers with mutated or methylated BRCA1 or BRCA2. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:334–46.
28. Duheron V, Hess E, Duval M, Decossas M, Castaneda B, Klopffer JE, et al. Receptor activator of NF-kappaB (RANK) stimulates the proliferation of epithelial cells of the epidermo-pilosebaceous unit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:5342–7.
29. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997;390:175–9.
30. Chan FK. Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. *Cytokine* 2007;37:101–7.
31. Galibert L, Tometsko ME, Anderson DM, Cosman D, Dougall WC. The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem* 1998;273:34120–7.
32. Winkles JA. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:411–25.
33. Dawson PJ, Wolman SR, Tait L, Heppner GH, Miller FR. MCF10AT: a model for the evolution of cancer from proliferative breast disease. *Am J Pathol* 1996;148:313–9.
34. Chaffer CL, Brueckmann I, Scheel C, Kaestli AJ, Wiggins PA, Rodrigues LO, et al. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:7950–5.
35. Sarrio D, Franklin CK, Mackay A, Reis-Filho JS, Isacke CM. Epithelial and mesenchymal subpopulations within normal basal breast cell lines exhibit distinct stem cell/progenitor properties. *Stem Cells* 2012;30:292–303.
36. Otero-Marrah VA, Wang R, Chu G, Zayzafoon M, Xu J, Shi C, et al. Receptor activator of NF-kappaB Ligand (RANKL) expression is associated with epithelial to mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cell Res* 2008;18:858–70.
37. Jo M, Eastman BM, Webb DL, Stoletov K, Klemke R, Gonias SL. Cell signaling by urokinase-type plasminogen activator receptor induces stem cell-like properties in breast cancer cells. *Cancer Res* 2010;70:8948–58.
38. Bonifaci N, Palafox M, Pellegrini P, Osorio A, Benitez J, Peterlongo P, et al. Evidence for a link between TNFRSF11A and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011;129:947–54.
39. Debnath J, Brugge JS. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer* 2005;5:675–88.
40. Giunciuglio D, Culty M, Fassina G, Masiello L, Melchiorri A, Pagliarunga G, et al. Invasive phenotype of MCF10A cells overexpressing c-Ha-ras and c-erbB-2 oncogenes. *Int J Cancer* 1995;63:815–22.
41. Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Kozieradzki I, Komarova SV, Sarosi I, et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 2006;440:692–6.
42. Tan W, Zhang W, Strasner A, Grivennikov S, Cheng JQ, Hoffman RM, et al. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature* 2011;470:548–53.
43. Santini D, Schiavon G, Vincenzi B, Gaeta L, Pantano F, Russo A, et al. Receptor activator of NF-kB (RANK) expression in primary tumors associates with bone metastasis occurrence in breast cancer patients. *PLoS One* 2011;6:e19234.
44. Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitao D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol* 2011;64:937–46.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Figure 1



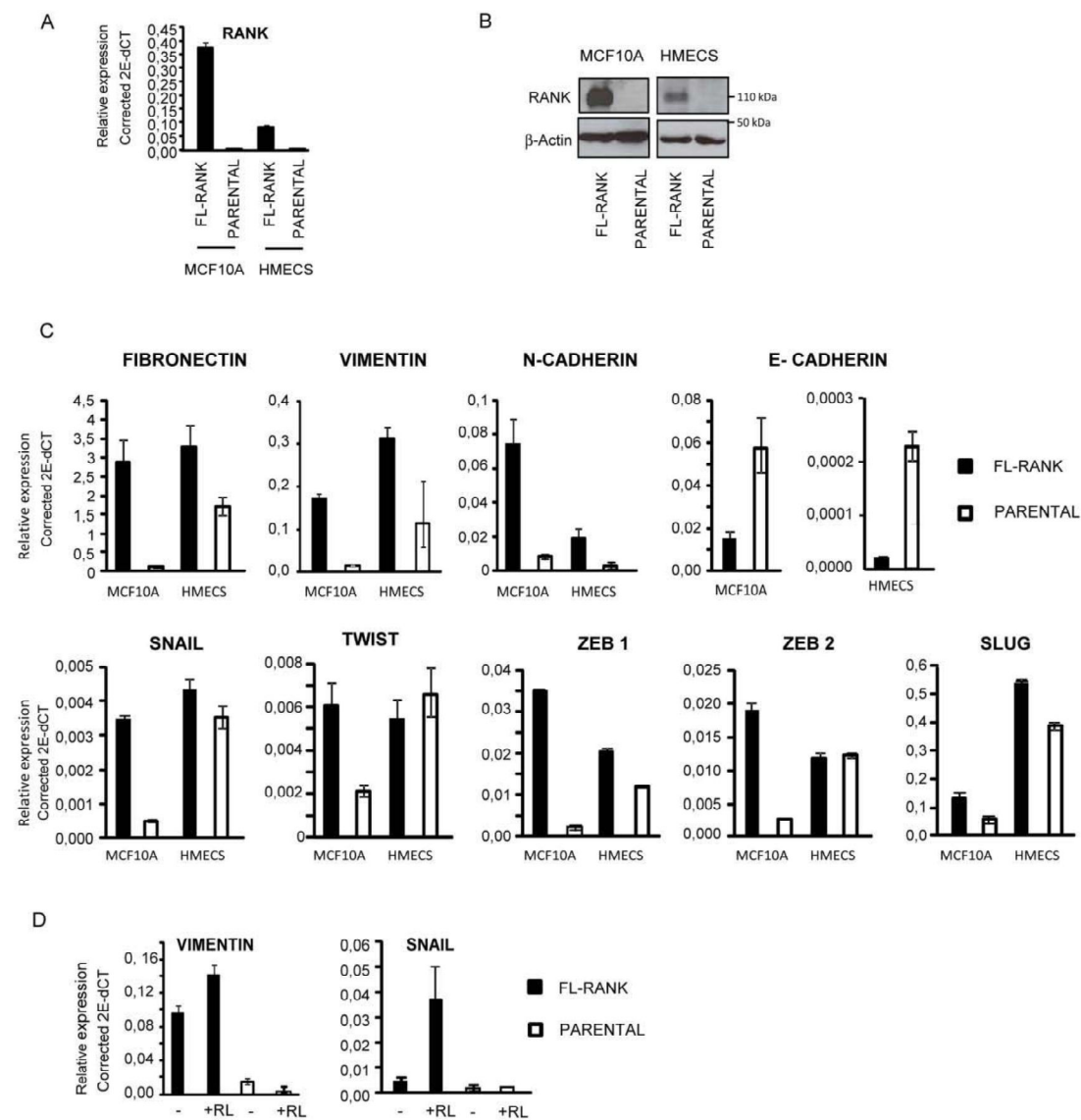
Supplemental Figure 1. RANK is active in FL-RANK MCF10A cells.

A. qRT-PCR showing the expression of hRANK and hRANKL mRNA in MCF10A cells infected with a lentivirus containing FL-RANK or control vector at passage 10 and 20 after infection as indicated.

B. Western blot showing phospho-IκBα and phospho-p65 in FL-RANK and parental cells starved (S) and treated with RANKL for the indicated times. Total IκBα, p65 and tubulin are shown as loading controls.

C. Western blot analyses of the indicated proteins in FL-RANK and parental MCF10A cells growing in complete media. Tubulin is used as a loading control.

Supplemental Figure 2



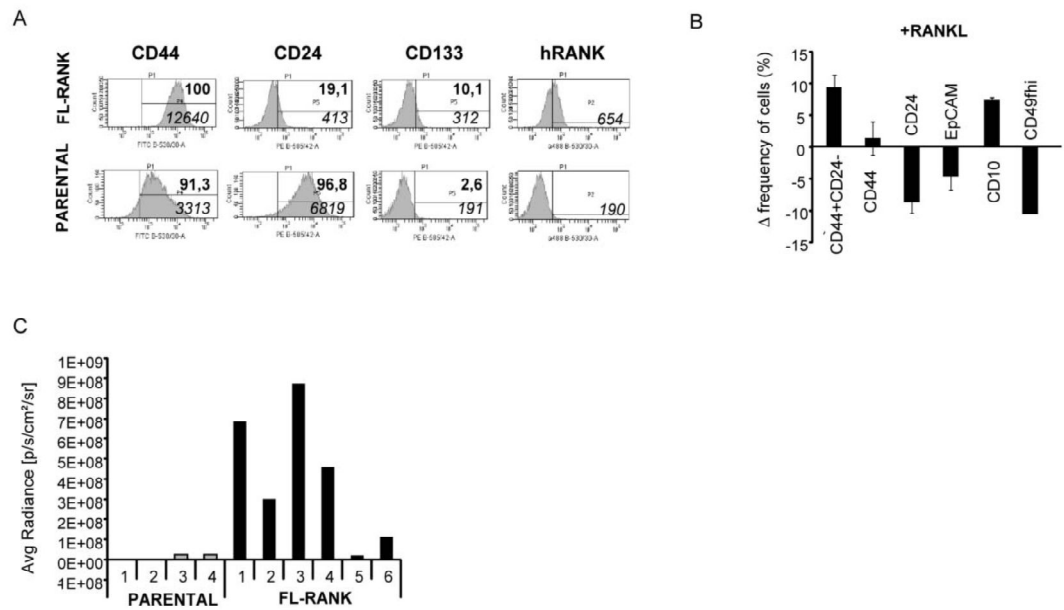
Supplemental Figure 2. RANK expression induces EMT in MCF10A using a second lentiviral construct and in HMECS immortalized with telomerase.

A-B. qRT-PCR (A) and western blotting (B) showing the expression of RANK in MCF10A and HMECs cells infected with a second lentiviral vector containing FL-RANK and a control vector (PARENTAL).

C. mRNA expression of EMT proteins and transcription factors in MCF10A and HMECs infected with a second lentiviral construct determined by qRT-PCR. In all qRT-PCR mRNA expression of the indicated genes relative to PP1A or RPL38 is shown. Determinations were done in triplicate and standard deviations are shown.

D. RANKL stimulation increases mRNA expression of vimentin and Snail in FL-RANK but not in parental MCF10A cells as measured by qRT-PC. Results are representative of 2 independent experiments. Relative expression to PP1A is shown. Untreated cells (-) or RANKL treated cells (+RL, 100 ng/ml; 48h) are indicated. Determinations were done in triplicate and standard deviations are shown.

Supplemental Figure 3



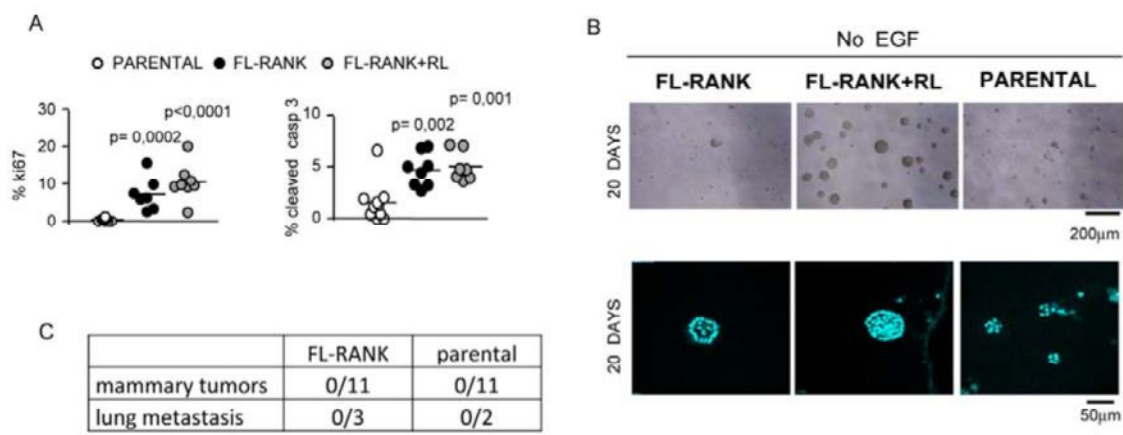
Supplemental Figure 3. RANK overexpression induces mammary stem markers.

A. Flow cytometry analyses (histograms) showing expression patterns of CD44, CD24, CD133 and RANK in FL-RANK and parental MCF10A. Numbers indicate the frequency of positive cells based on the negative population (in bold) or the mean of the histograms (in italic).

B. RANKL stimulation increases the frequency of CD44+CD24- cells in FL-RANK MCF10A. Gain or loss in the percentages of the indicated populations analyzed by flow cytometry after 48h of stimulation with RANKL (100 ng/ml) is shown for one representative experiment out of 3.

C. BLI (bioluminescence) values (Avg Radiance [p/s/cm²/sr]) in mammary glands of scid/beige mice injected with parental or FL-RANK MCF10A cells.

Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 4. FL-RANK cells grow in the absence of EGF and do not

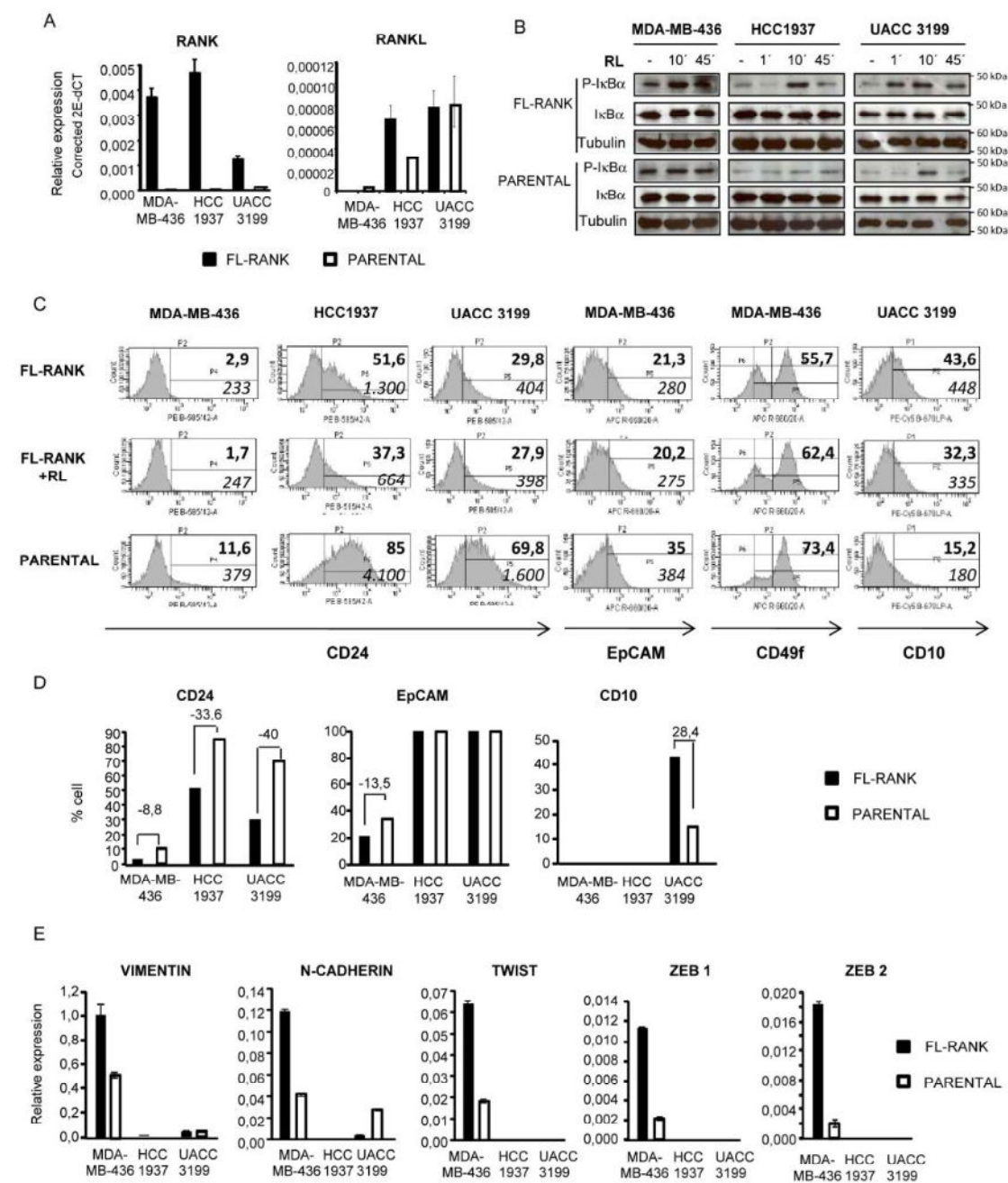
form tumors *in-vivo*.

A. Percentage of ki67 and caspase 3 positive nuclei in parental, and FL-RANK at day 20 of culture. Note that no proliferation is detected in the parental acini, as by 20 days of culture they are fully differentiated and arrested. P-values vs parental cells are included.

B. Representative phase contrast and confocal pictures of FL-RANK and parental growing in matrigel in the absence of EGF (cyan=nuclei). Results are representative of three independent experiments.

C. Table indicates the number of intra-fat pad (3x10⁶ cells) or tail vein (1x10⁶cells) cell inoculations done with FL-RANK and parental MCF10A cells. As indicated no tumors or metastasis were observed after 110-160 days, respectively.

Supplemental Figure 5



Supplemental Figure 5. RANK expression induces a CD44⁺CD24⁻ phenotype in breast cancer cells with non functional BRCA1 and enhances the mesenchymal markers in MDA-MB-436 cells.

A. Relative expression of hRANK and hRANKL mRNA in the indicated cells infected with a hRANK expressing vector (FL-RANK) and a control vector (PARENTAL) as determined by qRT-PCR.

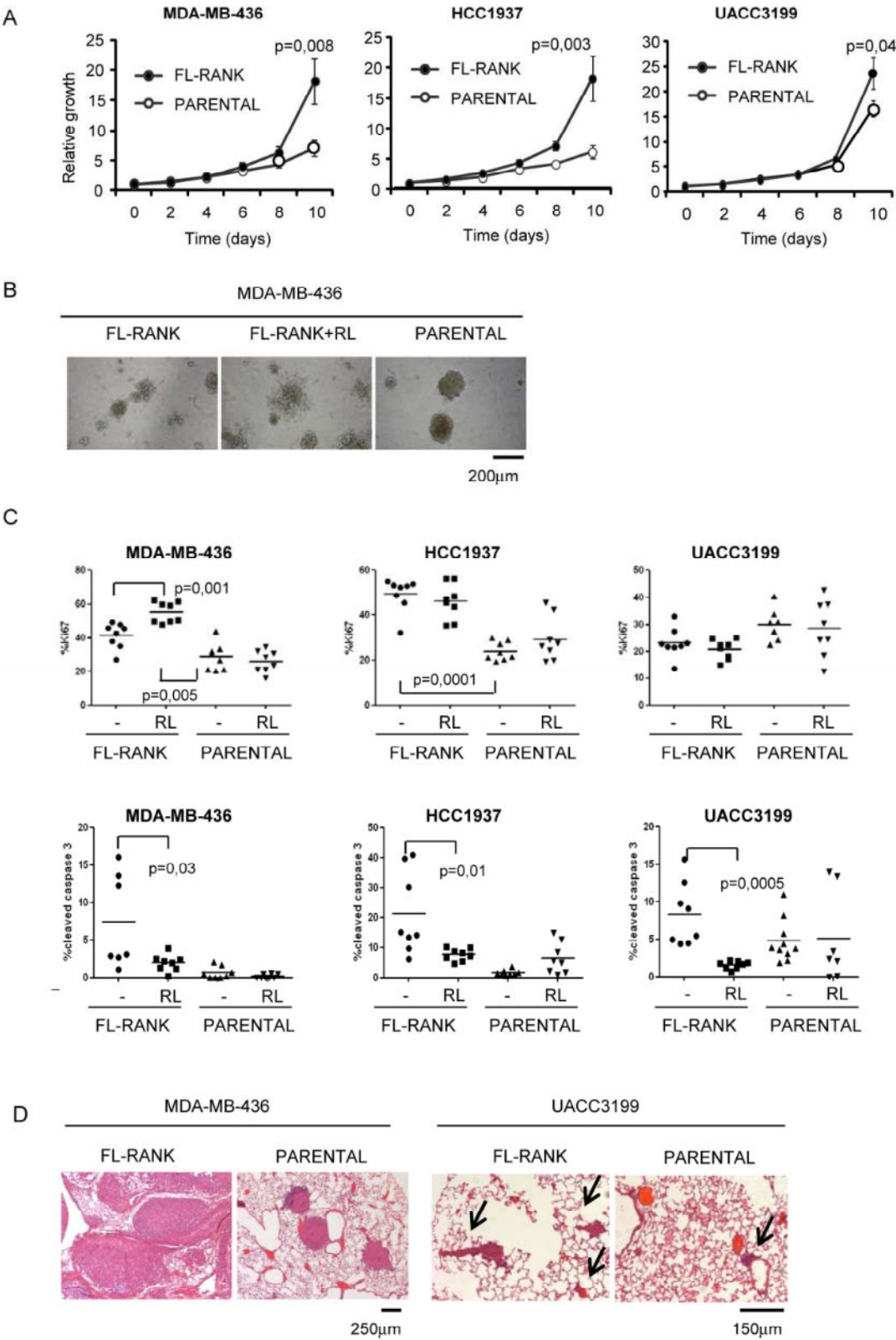
B. Western blot showing phospho-IkB α in FL-RANK, and parental cells with non-functional BRCA1 treated with RANKL for the indicated times. Total IkB α and tubulin are shown as loading controls.

C. Analyses by flow cytometry of CD24, EpCAM, CD49f and CD10 in the indicated cells cultured with or without RANKL (100 ng/ml) for 48h. Numbers indicate the frequency of positive cells based on the negative population (in bold) or the mean of the histograms (in italic).

D. Frequency of CD24, EpCAM and CD10 positive cells in parental and FL-RANK non-functional BRCA1 cells analyzed by flow cytometry. Values for one representative experiment out of 4 are shown.

E. qRT-PCR showing mRNA expression of the indicated genes relative to PP1A in parental and FL-RANK cells with non functional BRCA1. Determinations were done in triplicate and standard deviations are included. Note that the mesenchymal markers are already expressed in MDA-MB-436 cells in correlation with their mesenchymal morphology.

Supplemental Figure 6



Supplemental Figure 6. RANK overexpression promotes growth, invasive changes and metastasis in cells with non-functional BRCA1.

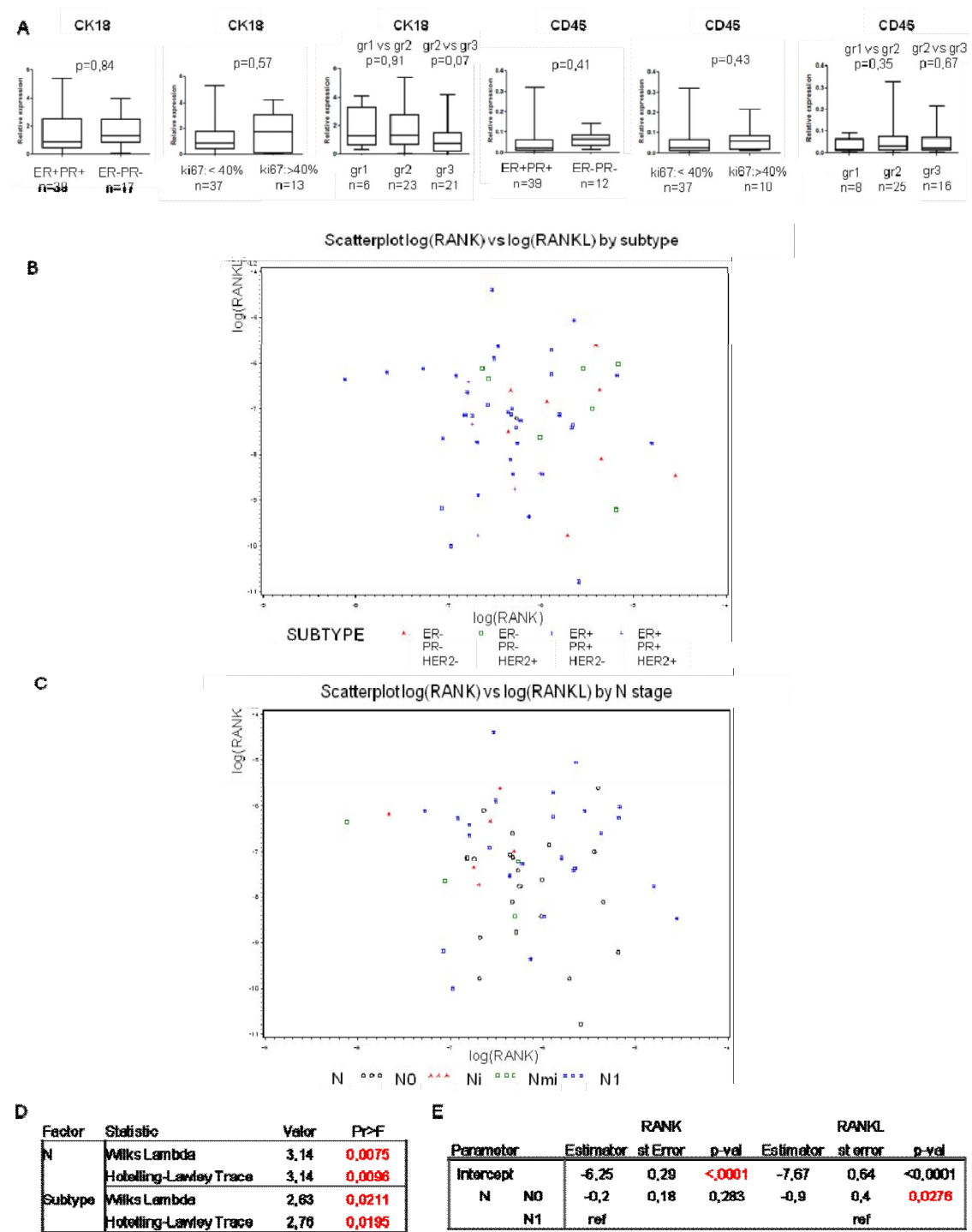
A. Growth curves of MDA-MB-436, HCC1937 and UACC3199 cells in complete media. Growth is represented as relative to day 0. p-values are shown (t-test)

B. Phase contrast images of MD-MB-436 acinar cultures with or without RANKL (day 20). Note the protrusions observed in FL-RANK cells.

C. Percentages of ki67 and cleaved caspase 3 in parental and FL-RANK MDA-MB-436, HCC1937 and UACC3199 acini cultured with or without RANKL at day 20. Significant p-values are included.

D. Representative H&E pictures of lung metastasis formed by FL-RANK and parental MDA-MB-436 (12 weeks) and UACC 3199 (9 weeks) cells injected in the tail vein. Arrows indicate metastatic foci.

Supplemental Figure 7



Supplemental Figure 7. RANK/RANKL expression significantly associates with tumor subtype and lymph node metastasis.

A. Box and whiskers graphs showing expression of CK18 (epithelia) and CD45 (lymphocytes/leukocytes) mRNA relative to PP1A in human adenocarcinomas classified by ER, PR, status, tumor grade (gr) or proliferative index. Determinations were done in triplicates and means were used.

B-C. Scatterplot log(RANK) vs log(RANKL) by subtype and N stage (see Methods). RANK and RANKL mRNA expression values measured by quantitative PCR were considered.

D-E. Multivariate analyses of variance (MANOVA). (D) RANKlog/RANKLlog expression significantly associate with the two different variables considered: lymph node metastasis (N) and tumor subtype (S). (E) MANOVA analyses considering RANK and RANKL separately and comparing N0 (no metastasis) vs N1 (metastasis). Tumor subtype was considered as a variable in the model.

SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS

Plasmids

Entry vector pENTR223.1 (Genycell) or pENTR221 (Invitrogen) containing full length human RANK was utilized to create lentiviral constructs. RANK was subcloned into the destination vectors pLV409 that contains luciferase (Amgen) or pLenti6/V5-DEST (Invitrogen) or using Gateway technology. pWPT-GFP and pLenti6/V5-DEST+lacZ were used to control the infection efficiency.

Antibodies

Western blot: hRANK (R&D AF683), phospho-I κ B α (Cell Signaling), total I κ B α (Sta Cruz), phospho-p65, total-p65, phospho-Akt Ser473, total Akt, phospho-p38 and total p38 (Cell Signaling), phospho ERK, total ERK ½, -actin and tubulin (Sigma). Immunofluorescence/IHC: Fibronectin (BD Biosciences), Vimentin (V9, invitrogen), E-cadherin (BD Biosciences), ki67 (Zymed), cleaved caspase 3 (Cell signaling). Flow cytometry: directly conjugated antibodies include, CD44-FITC (G44-26), CD44-APC (G44-26), CD24-PE (ML5), EpCAM-APC (EBA-1), EpCAM-FITC (EBA-1), CD10-PECy5 (HI10a) all from BD Biosciences, CD133-PE (AC-133, Miltenyi) and CD49f-APC (GoH3, R&D).

Culture of human mammary epithelial cells

All cells were cultured at 37° in 5% CO₂. MCF10A and HMECs immortalized with telomerase were cultured in growth media in plastic (DMEM/F12, 5% Horse serum (Invitrogen), 20ng/ml EGF (Sigma), 500ng/ml Hydrocortisone (Sigma), 10µg/ml Insulin (Sigma), 1X Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories) and L-Glutamate (Gibco). Assay media for MCF10A were as described in (12) (DMEM/F12, 2% Horse serum, 5ng/ml EGF, 500ng/ml Hydrocortisone, 10 µg/ml Insulin, 1X Penicillin/Streptomycin

and L-Glutamate). MDA-MB-436, HCC1937, UACC3199 and 293FT were cultured in DMEM high glucose containing 10% FBS (Gibco), L-Glutamate (Gibco) and Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories). H14 differentiation media as (25), was used in 3D cultures. H14 differentiation media was used for MDA-MB-436, HCC1937 and UACC3199 in 3D cultures (DMEM/F12, 1% FBS, 1X Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) cocktail, 10-10M Estradiol, 1,4x10-6M Hydrocortisone, 5ug/ml Prolactin, 1X Penicillin/Streptomycin and L-Glutamate).

Lentiviral infection

Lentiviral infection was done following the manufacturer's indications (Invitrogen). Briefly 293FT cells were used for the production of the virus. 293FT cells (5x10⁶) were transfected with lentivirus and packaging (gag-pol, vsvg, rev) plasmids (Addgene) by calcium phosphate method. Viral production was induced by adding 10mM Na Butyrate the next day. Virus was harvested 72h post transfection and concentrated by centrifugation. RANK lentiviral stocks were titered using colony forming assay (Hela cells). MCF10A or BRCA1-defective cells were transduced with pLV409-RANK (MOI:1), pLV417-control (MOI:2), or pLenti6/V5-DEST-RANK or -tubGFP with 8ug/ml of polybrene. Plates were centrifuged 1 hour at 1.000 rpm at 37°C to improve the infection. Selection started with the corresponding amount of blasticidin/puromycin antibiotic for each cell line (blasticidin: 5µg/ml for MCF10A and UACC3199 and 7,5µg/ml for HMECs, MDA-MB-436 and HCC1937; puromycin: 0,75µg/ml). The resulting stable cell lines infected were maintained with 5µg/ml of blasticidin and 0,75 µg/ml of puromycin for pLV409-MCF10A and 1 g/ml of blasticidin for MCF10A, HMECS, MDA-MB-436, HCC1937 and UACC3199.

RNA isolation and quantitative RT-PCR analysis

Total RNA was isolated with TRIzol reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. 20ng/ml of mRNA were pretreated with DNase I (Ambion), reverse

transcribed using Applied Biosystems TaqMan reverse transcriptase reagents and random hexamer priming. Amplifications were done using LightCycler 480® machine. UPL Probes were used for hRANK (probe number #25), hRANKL (probe number #17) and PP1A as a normalizer (probe number #48) (Roche). All other genes were analyzed by SYBR. Amplifications were done using LightCycler 480® machine. 95° 10s, 58° 30s, 72° 20s, for 45 cycles. All other genes were analyzed by SYBR and the, 95° 10s, 60° 20s, 72° 15s for 50 cycles.

Oligos (Sigma): For each sample amplifications were done in triplicate. Analysis was performed using LightCycler 480® Software release 1.5.0 SP4.

For UPL probes:

hRANKL: Fw: 5'- TGATTCATGTAGGAGAATTAAACAGG -3'

Rv: 5'- GATGTGCTGTGATCCAACGA -3'

hRANK: Fw: 5'- GCAGGTGGCTTTGCAGAT-3'

Rv: 5'-GCATTTAGAAGACATGTACTTTCCTG-3'

hPP1A: Fw: 5'- ATGCTGGACCCAACACAAAT-3'

Rv: 5'- TCTTTCACCTTGCCAAACACC -3'

For SYBR

hPP1A: Fw: 5'-ATGGTCAACCCACCGTGT-3'

Rv: 5'-TCTGCTGTCTTTGGGACCTTG-3'

hFIBRONECTIN: Fw: 5'- CCGCCGAATGTAGGACAAGA -3'

Rv: 5'- TGCCAACAGGATGACATGAAA -3'

hVIMENTIN: Fw: 5'- CAACCTGGCCGAGGACAT -3'

Rv: 5'- ACGCATTGTCAACATCCTGTCT -3'

hN-CADHERIN: Fw: 5' - GACGGTTCGCCATCCAGAC -3'

Rv: 5' - TCGATTGGTTTGACCACGG -3'

hE-CADHERIN: Fw: 5' - CAAGCTATCCTTGACCTCAG -3'

Rv: 5' - GCATCAAGAGAACTCCTATCTTG -3'

hSNAIL: Fw: 5' - GCTGCAGGACTCTAATCCAGAGTT -3'

Rv: 5' - GACAGAGTCCCAGATGAGCATTG -3'

hSLUG: Fw: 5' - GCGATGCCCAGTCTAGAAAA -3'

Rv: 5' - GCAGTGAGGGCAAGAAAAAG -3'

hTWIST: Fw: 5' - GGAGTCCGCAGTCTTACGAG -3'

Rv: 5' - TCTGGAGGACCTGGTAGAGG -3'

hNANOG: Fw: 5' - CAGCTGTGTGTACTCAATGATAGATT -3'

Rv: 5' - ACACCATTGCATTTCTTCGGCCAGTTG -3'

hOCT4: Fw: 5' - GACAACAATGAAAATCTTCAGGAG -3'

Rv: 5' - CTGGCGCCGGTTACAGAACCA -3'

hSOX2: Fw: 5' - GCACATGAACGGCTGGAGCAACG -3'

Rv: 5' - TGCTGCGAGTAGGACATGCTGTAGG -3'

hZEB1: Fw: 5' - GCCAATAAGCAAACGATTCTG -3'

Rv: 5' - TTTGGCTGGATCACTTTCAAG -3'

hZEB2: Fw: 5' - CCCTTCTGCGACATAAATACG -3'

Rv: 5' - TGTGATTCATGTGCTGCGAGT -3'

hRPL38: Fw: 5'- TGGGTGAGAAAGGTCCTGGTCC - 3'

Rv: 5'- CGTCGGGCTGTGAGCAGGAA - 3'

hCK18: FW: 5'-TCAGCAGATTGAGGAGAGCA-3'

Rv: 5'-GAGCTGCTCCATCTGTAGGG-3'

hCD45: Fw: 5'- AGTTATTGT TAT GCTGACAGAACTGAA -3'

Rv; 5'- TGCTTTCCTTCTCCCCAGTA-3'

Protein isolation and Western blot analysis

Cells were lysed with RIPA buffer (50 mM Tris-HCl at pH 7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Sodium deoxycholate, 0,1% SDS, 5mM EDTA plus proteases and phosphatases inhibitors) 30 min at 4°C. Proteases and phosphatases inhibitors (Roche) were added freshly to the lysis buffer. Total protein quantification was performed with BCA Protein Pierce Assay Reagent following manufacturer's instructions (Thermo Scientific). A total of 30µg of protein were separated on 10% SDS-PAGE at 30mA and transferred to nitrocellulose membranes during 1 hour at 400mA. Membranes were hybridized with primary antibodies indicated. Secondary antibodies marked with HRP (1:1000; DAKO) were used and proteins were detected with the Enhanced Chemiluminescence Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences).

Immunofluorescence in monolayer cultures

50.000 cells per well were seeded in 8 wells-chambers slides in growth medium and stimulated with RANKL for 30 min as indicated. At 80% of confluence the medium was removed and the cells were fixed with PFA 2%, 20 minutes at RT, permeabilized with Triton-X100 0.1% during 15 minutes at RT and washed three times with PBS-Glycine. Blocked with PBS-goat serum 10% during 1h at RT. Primary antibody 1,5 h at RT and

secondary antibody 45 minutes at RT. Finally, the slides were coverslipped with Prolong® Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen) and dried over-night at RT.

Culture and immunofluorescence analysis in 3D cultures from human cells

Cell organoids were seeded in matrigel (BD Biosciences) in eight-well chamber slides (LabTek) with growth medium (5.000 cells/well for MCF10A and UACC3199, 2.500 cells/well for MDA-MB-436 and 10.000 cells/well for HCC1937). After 24 h, the medium was changed to differentiation medium (Assay medium for MCF10A and HMECs as (12) and H14 for BRCA1 mutated cell lines as (25) with or without human RANKL-LZ (100 ng/ml, Amgen Inc.). Medium was changed every 3-4 days. Medium was removed and acini were fixed in 2% paraformaldehyde and permeabilized using 0.5% Triton X-100 before blocking. Cells were incubated overnight at room temperature with the primary antibodies indicated and then with Alexa-488 -568 conjugated secondary antibodies (1:500; Molecular Probes) for 45 min at room temperature and DRAQ5 (1:5000; Alexis) or DAPI for nuclear staining. Slides were mounted with Prolong Gold Antifade Reagent (Molecular Probes).

Flow cytometry

MCF10A cells were washed once with PBS 1x and twice with PBS-EDTA 2 mM, 15 minute each, prior to trypsinization. Cells (105) were re-suspended in 25ul of PBS containing 2% FBS and 2mM EDTA and blocked with human blocking reagent (2.5ul per 100.000 cells in 25 µL, Miltenyi Biotec) during 10 minutes at 4°C. Cells were then incubated with the corresponding anti-body combination during 30 minutes at 4°C in dark, washed with PBS-FBS-EDTA and in the case of hRANK (R&D, 0.1 µg /100.000 cells or 0.004 µg/µl.) or H2K-biotin (BD) incubated with the secondary antibodies alexa-488 donkey anti-goat IgG (0.2 µg g/100.000 cells or 0.01 µg /µl, Molecular probes) or SA-PECy7 (BD Biosciences) After washing, cells were re-suspended in PBS-FBS-EDTA, stained with 7AAD (1ug/ml, AnaSpect) during 10 minutes at 4°C.

Wound healing Assay

MCF10A cells were seeded in triplicates at 80% of confluence with growth medium. After 24h, a wound of approximately 20 μ m was made, cells were washed with PBS and Mitomycin C 1ng/mL and stimuli were added: growth medium, starving medium (without EGF and 5% Serum), EGF (Sigma, 20 ng/mL) and/or RANKL (Amgen, 100 ng/mL). Photographs in the same points were taken at indicated times and the average of the distance that the cells have moved in five different points of the healing was calculated. Assay was done in triplicates.

Growth in soft agar

Cells (5×10^4) were suspended in 0.35% agarose growth medium, disposed onto a solidified base of growth medium for MCF10A containing 0.5% agarose. Plates were cooled during 15 minutes at 4°C and then incubated at 37°C 5%CO₂. After 30 days the number of foci of each cell line was counted.

Growth curve

A time course curve of parental and hRANK-expressing cells was generated by seeding 3×10^4 cells in 35mm dishes in triplicate samples. After 24h (day 0) and every 2 days (for 10 days), cells were fixed with glutaraldehyde 0.5% and stored in PBS at 4°C. The culture medium was replaced every 3 days. When all samples were fixed, cells were stained with crystal violet 1%. After extensive washing, crystal violet was resolubilized in 15% acetic acid and quantified at 595 nm as a relative measure of cell number. Values were referred to cell growth of cells growing at day 0. Data presented were the mean from triplicate samples and bars: $\pm$ SD.

Whole mounts

Number 4 mammary glands were collected, imaged for luciferase activity and fixed in Carnoy's for 1-3h, stained in carmine alum overnight at 4°C and then dehydrated and stored in methyl-salicylate.

Human tumor samples

Bellvitge series included 73 patients with a median age of 59 years (range 42-78). After surgical excision of breast tumors and axillary clearance, when node metastases were detected, patients followed standard adjuvant treatment with chemotherapy in node positive patients and high risk node negative patients (mostly sequential regimens based on anthracyclines and taxanes). Estrogen and progesterone receptor positivity was defined as the presence of at least 10% of tumor cells positively stained by immunohistochemistry. Her2 positivity was defined as three plus in immunohistochemistry or amplified by FISH. Pathological tumor grade was established using Nottingham classification. All hormone receptor positive patients received state of the art endocrine therapy. All Her2 positive patients received adjuvant trastuzumab. Patients undergoing breast conserving surgery and/or presenting extensive axillary involvement received complementary radiotherapy.

The breast tumor samples for IHC analysis included 86 total patients with a median age of 61.6 (range 39-85). Estrogen and progesterone receptor positivity was defined exactly as described for the Bellvitge series above.

Human RANK and vimentin immunohistochemistry

Anti-human RANK IHC was performed on sections prepared with heat retrieval in Diva buffer (formalin fixed). The primary antibody was anti-human RANK (N-1H8 and N-2B10) followed with goat anti mouse secondary antibody. A formalin fixed giant cell tumor of the bone and transfected cell lines were used as positive controls for the anti-

RANK antibodies, as described (7). The anti-hRANK antibodies recognize distinct epitopes within the extracellular domain of RANK. There was precise concordance in the staining pattern of breast tumor samples using these two distinct anti-huRANK antibodies. A tumor was scored positive for RANK expression if IHC staining was observed at any intensity within membrane and/or cytoplasm of the epithelial component of tumors. Anti human vimentin IHC was performed on Carnoy's or formalin fixed mammary glands. After carmine staining tissues were embedded in paraffin and sectioned. Antigen retrieval was done in citrate (pH=6), the primary antibody was anti vimentin clon V9, invitrogen followed by mouse Envision (Dako) and DAB. A tumor from MDA-MB-436 cells was used as positive control and a mouse mammary gland was used as negative control.

ARTÍCULO 3

AVÍS IMPORTANT

El text d'aquest article ha estat retirat seguint instruccions de l'autora de la tesi, en existir participació d'empreses, existir conveni de confidencialitat o existeix la possibilitat de generar patents

AVISO IMPORTANTE

El texto de este artículo ha sido retirado siguiendo instrucciones de la autora, al existir participación de empresas, convenio de confidencialidad o la posibilidad de generar patentes.

IMPORTANT NOTICE

The text of this paper has been withdrawn on the instructions of the author, as there is participation of undertakings, confidentiality agreement or the ability to generate patent

ARTÍCULO 4

RESUMEN EN CASTELLANO

Ortoxenopacientes de cáncer de mama, un paso más ccerca de la medicina personalizada.

Los modelos modificados genéticamente o modelos de xenoinjertos derivados de las líneas celulares empelados en investigación no son representativos de los tumores existentes en clínica, sobre todo en términos de la metástasis y la sensibilidad a los fármacos. Con el fin de obtener modelos clínicamente representativos, hemos generado modelos ortotópicos de cáncer de mama humano en ratón, basado en la implantación de trozos frescos de tumor humano y de células cancerosas aisladas a partir de líquidos pleurales en glándula mamaria de ratones inmunodeficientes. El injerto y el mantenimiento del tumor durante los pases en serie en ratones reflejan la agresividad del tumor inicial y la fuente de origen. Morfológicamente tumores que crecen en los ratones se asemejan a los tumores humanos de origen ya que tienen patrones de recidiva y mestástasis similares a los tumores humanos originales. También se observa una disminución de la latencia y un aumento de crecimiento tumoral con los pases seriados en ratón, lo que puede reflejar una selección de una población más agresiva de las células tumorales. De hecho, la pérdida de la expresión de receptores hormonales y citoqueratinas observada en algunos modelos puede reflejar desdiferenciación tumoral. El análisis del los marcadores de superficie de cada tumor muestra la existencia de patrones diferentes entre tumores pertenecientes al mismo subtipo. Tumores triple negativo son más sensibles a docetaxel que los tumores luminales pero son capaces de adquirir resistencia después de la administración continua del fármaco, imitando el comportamiento en clínica. En resumen, este conjunto de modelos ortotópicos de cáncer de mama en ratón refleja la heterogeneidad de cáncer de mama, por lo que pueden ser de utilidad para estudiar los mecanismos biológicos de la progresión del tumor, metástasis y resistencia a drogas y para la identificación de nuevas dianas terapéuticas y validación de nuevos fármacos. Sin embargo se deben tomar en cuenta los cambios observados en los modelos durante los pases seriados sobre todo si estos se destinan a la medicina personalizada.

Orthoxenopatients of breast cancer, one step closer of personalized cancer medicine

Marta Palafox¹, Jorge Gómez¹, Irene Ferrer^{1, 2}, Pasquale Pellegrini¹, Ander Urruticoechea³, Josefina Climent⁴, María Teresa Soler-Monso⁴ and Eva González-Suárez^{1*}.

¹*Cancer Epigenetics and Biology Program (PEBC), Biomedical Research Institute of Bellvitge (IDIBELL),*

²*Current address: Biomedicine Institute of Sevilla (IBIS), Seville, Spain.*

³*Current address: Oncologic centre of kutxa (Onkologikoa), San Sebastian, Gipuzkoa, Spain.*

⁴*Pathology department, University Hospital of Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.*

*Corresponding author: Eva González Suárez.

Cancer Epigenetics and Biology Program, PEBC, Bellvitge Institute for Biomedical Research, IDIBELL. Av.Gran Via de L'Hospitalet, 199 – 203. 08908 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona.

egsuarez@idibell.cat Phone: +34 932607139 Fax: +34 932607219

ABSTRACT

Widely used mouse tumor models, genetically modified models or cell lines-derived xenograft models, do not sufficiently represent clinical cancer, especially in terms of metastasis and drug sensitivity. In order to obtain clinically accurate models, we have generated orthotopic mouse models of breast cancer based on the implantation of fresh primary human tumor pieces and cancer cells isolated from pleural effusions into the cleared fat pad of immunodeficient mice. Engraftment and tumor maintenance during serial passages in mice reflect initial tumor aggressiveness and source of origin. Morphologically tumors growing in mice resemble human tumors of origin, often relapse after surgical excision and show patterns of metastasis similar to the original human tumors. We show that latency to tumor development decreases and growth rates increase with serial passages, which may reflect a selection of a more aggressive population of tumor cells. Indeed, loss of the expression of ER, PR and CK is observed in some tumors which may reflect tumor de-differentiation. Surface marker profile of individual tumor models evidenced different patterns in tumors belonging to the same subtype. We show that triple negative tumors are more sensitive to docetaxel than luminal tumors, but they acquire resistance upon continuous administration of the drug mimicking clinical behavior. In summary, this panel of breast cancer orthotopic mouse models that recapitulates the heterogeneity of breast cancer would be useful to study biological mechanisms of tumor progression, metastasis and therapy resistance and for the identification of new therapeutic targets and validation of new drugs. However, changes observed during serial passages and the low tumor take rates should be taken into account if these models are intended to be used for personalized medicine.

INTRODUCTION

The breast epithelium is particularly sensitive to carcinogenesis because mammary glands undergo several marked changes during the life span of a reproductive female (puberty, pregnancy, lactation and menopause), which are mediated by different hormones and growth factors (Russo J 1996). Thus, breast cancer is the most common cancer in women worldwide. The disease remains a public health concern as recent evidence indicates that the breast cancer burden has increased mainly in developing and low-income countries (Al-Foheidi M 2013). Current therapies for breast cancer include local treatments (surgery and radiation) and systemic treatments, mainly chemotherapy (TNBC tumors), and directed therapies against hormones or ErbB family (EGFR/ErbB1 y ErbB2/neu) (Tinoco G 2013). Data from clinical trials has established that target therapies induce a statistically significant increase in survival for breast cancer patients in early stages of the illness (1992; 1998) but at later stages of the disease, the therapies are often not effective particularly once tumor cells have disseminated (Hellman S 2000). Intrinsic or acquired resistance is common for both targeted and systemic therapies. The need for a more robust, accurate, cost-effective, and rapid drug development mechanism is clearly evident. However, insights into the mechanisms of metastasis and drug resistance have been limited by the lack of appropriate tools and models.

Several reports describe that *in vitro* models are not the best tools for the development of new therapies to treat breast cancer. Breast cancer cell lines only partially recapitulate the genetic features and metastatic potential of tumors in individuals with breast cancer, resulting in poor predictions of how drugs will perform in a clinical setting (Ethier 1996; Jemal A 2008).

On the other hand, current available mouse models do not fully recapitulate human breast cancer disease mainly in terms of metastasis and drug response. Models include genetically modified mouse models where a limited number of well characterized genes are altered (Hennighausen 2000) and xenograft models where tumor cells that

have been cultured for decades *in vitro* are implanted subcutaneously in immunodeficient mice with the limitations cited (Price J. E 1990; Clarke 2009).

The best approach to analyze the acquisition of chemoresistance and metastasis process implies the use of tumor samples from the patients. Availability of fresh clinical samples from primary tumors and metastasis is usually scarce given the small size at which most primary tumors are surgically removed and the invasive surgery needed to obtain metastatic lesions such as bone or brain. Analyses of primary or metastatic samples collected before and after treatment would be essential to understand mechanisms of acquired resistance.

Breast cancer is a heterogeneous and evolving disease which, as opposed to other tumors, shows a long latency of tumor relapse and/or metastasis; the time between first diagnose or surgery and relapse/death can last years or decades. During this time tumors change and adapt to the environment. Even within the same tumor distinct areas are identified. Moreover, treatments themselves such as endocrine therapies or chemotherapy will further induce tumor changes that may include, heterogeneous profiles of ER/PR expression, loss of response to treatments and appearance of proximal (lymph nodes or contralateral breast) or distant metastasis.

There is increasing evidence that a variety of neoplasias including breast cancer may result from transformation of normal stem and progenitor cells. This hypothesis first described in leukemias (Bonnet D 1997), has rapidly extended to solid tumors, and it is based on the fact that only a subset of rare cancer cells are capable of reconstituting the tumor after transplantation in immunodeficient mice. These cells called cancer stem cells (CSCs), have the ability to self-renew and are able to regenerate the entire phenotypic heterogeneity found in the initial tumor. Given their unique characteristics, CSCs may be more resistant to conventional breast cancer therapies, which may ultimately result in recurrence or metastasis even when remarkable initial responses are observed clinically. It has been shown that breast cancer from patients who received neoadjuvant chemotherapy are substantially enriched for CSCs compared to untreated patients (Yu F 2007). It is postulated that anti-cancer agents kill the bulk of

the tumor consisting of more differentiated cells, but spare the tumor-initiating cells (Dean M 2005; Wicha 2006; Massard C 2006). A subpopulation of CSCs in human breast cancer has been identified based on the expression of surface markers: CD44, CD24, CD49f, CD133/2 and CD10. (Al-Hajj M 2003) first described an impact of CD24 expression on breast cancer tumorigenicity by observing that CD44⁺CD24⁻ cells were highly tumorigenic in immunocompromised mice while CD44⁺CD24⁺ were unable to initiate novel tumors. Thus, the CD44⁺CD24⁻ profile is commonly used to identify breast cancer cell lines (Kim HJ 2007; Kaiparettu BA 2008). Subsequently, it was described that in normal mouse (Stingl J 2006) and human mammary gland (Lim E 2009), only CD49f⁺ cells possess in vivo repopulating ability. In breast cancer, elevated CD49f expression is associated with reduced survival (Friedrichs K 1995). CD10 has also been used as a cell surface marker of the SC in breast normal tissues and sorting for CD10 enriches for sphere-forming cells, (Stingl J 2005; Bachelard-Cascales E 2010). Moreover, normal and cancer human MECs with increased aldehyde dehydrogenase activity (ALDH) have also been shown to have stem/progenitor properties and in breast carcinomas, high ALDH activity identifies the tumorigenic cell fraction (Ginestier C 2007). However, it is still controversial whether these markers are appropriate for all breast cancer subtypes and further studies are needed to identify the population of TICs and their functionality in each tumor.

In order to advance our knowledge in the clinical breast cancer disease, we have generated mouse models of human breast cancer based on orthotopical implantation of fresh primary human breast cancer samples (primary tumor pieces or tumor cells isolated from pleural effusions) in the mammary fat-pad of immunodeficient mice. Orthotopic models allow amplification and perpetuation of human tumors by serial passages, increase tumor cellularity, and allow an easy access to enough quantity of high quality fresh tissue. Moreover, they mimic the mammary environment despite the differences between human and mouse mammary glands. This panel of breast cancer orthotopic mouse models that recapitulates this heterogeneity will be useful for studying biological mechanisms of tumor progression, metastasis and therapy resistance and for identifying new therapeutic targets and validating novel drugs.

MATERIALS AND METHODS

Animals and establishment of orthotopic tumor models

Three strains of immunodeficient mice have been used. Nude mice (also called athymics) (Harlan) have a spontaneous deletion in the FOXP1 gene that causes a deteriorated or absent thymus and therefore the defective T-cells. The nonobese diabetic/Scid (NOD/ Scid) mouse possesses recessive mutations Scid (*Prkdc^{scid}*) which results in severe combined immunodeficiency affecting both the B and T lymphocytes and have NOD background which induces immunologic defects including low natural killer (NK) cell function and absence of circulating complement (Lock RB 2002). Scid/Beige mice are congenic mice that possess autosomal recessive mutations Scid (*Prkdc^{scid}*), therefore do not produce B and T lymphocytes, and Beige (*Lyst^{bg}*) mutation which results in defective natural killer (NK) cells (Carroll AM 1991). Mice were maintained in specific pathogen-free animal housing (IDIBELL). NOD/Scid and Scid/Beige mice were bred in our animal facility. Nod/Scid and Scid/Beige (Charles River) mice were bred in house.

Fresh primary human breast tumor fragments and cells isolated from pleural effusion were obtained from patients at time of surgery, with informed written patient consent. Fragments of 30 to 60 mm³ were implanted into cleared fat pad from 4th mammary glands of 3-weeks-old NOD/Scid or Nude females and pellets of 17 β -estrogen (0,1 mg) (Innovative Research of America) were implanted into the intraescapular fat pad; in case of tumor cells isolated from pleural effusions, 3x10⁶ tumor cells were injected in 4th mammary glands of Nude or Scid/Beige females. Pathological characteristics of implanted samples, number and strain of host mice and engraftment outcome are shown in Supplementary Table 1. Orthotopic tumors appeared at the graft site 30 to 152 days after implantation and they were subsequently transplanted from mouse to mouse without clearing epithelia. In each passage, samples were collected, frozen in DMSO-fetal bovine serum solution as stock, or directly at -80°C for gene expression analysis, and fixed in phosphate buffered saline (PBS) 10% formol, for histological studies. To evaluate the influence of hormones

ER+PR+ tumors were maintained in mice with or without 17 β -estrogen (0,1 mg) progesterone (32,5 mg) pellets (Innovative Research of America) implanted into their intraescapular fat pad. All experimental protocols were done according to Spanish regulations.

Tumor study

Each mouse of each model was monitored for tumor incidence by palpation and visual inspection and for weight variations. Mice were sacrificed when tumors reached 1 cm in size, loss 10%-20% of their initial weight or when deterioration of health was observed. Individual tumor volumes were calculated as $V = (L \times I)/100$, "L" being the largest diameter, "I" the smallest. For chemotherapy studies volume was calculated by $(L \times I \times H)$ being H, the height. Growth curves were established as a function of time. Tumor latency times were recorded for all palpated tumors and all mice of every model and passage.

Histology and immunohistochemistry

Samples from patient or mouse tumors, and mammary fat pads of host mice that did not develop tumors were fixed in formalin immediately after resection and embedded into paraffin. Lungs, brains, livers, kidneys and other samples were collected following the same protocol and bones were treated with 10% formic acid before were fixed in formalin and embedded in paraffin. For light microscopic examination 3- μ m-thick sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Selected lungs from all models and brains from Model B were sectioned every 75-100 μ m, stained with H&E and scored for metastasis. For immunohistochemical (IHC) studies 3- μ m-thick sections were embedded in paraffin and incubated with antibodies against ER (1:30; DAKO), PR (diluted; DAKO), Her2 (1:350; DAKO), CK18 (diluted; DAKO), CK5/6 (1:100; Zymed), p53 (1:50; Novocastra) and EGFR (diluted; Zymed). Pre-treatment with citrate pH6 was done on ER, PR, Her2, CK18 and p53 slides, with citrate pH9 on CK5/6 slides and with pepsin on EGFR slides. Antibodies were detected using biotin-conjugated secondary antibodies (HRP; DAKO). The antigen-antibody complexes were conjugated with streptavidin horseradish peroxidase and visualized with

diaminobenzidine (Kit DAKO LSAB). Sections were counterstained with hematoxylin and appropriate positive and negative controls were used.

Mammary Cell Isolation

Single cells were isolated from tumors as described previously (Smalley 2010). Briefly, fresh tissues were mechanically cut with McIlwain tissue chopper and enzymatically digested with appropriate medium (Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM] F-12 (PAA), 0.3% Collagenase A (Roche Diagnostics, S.L.), 2.5U/mL Dispase (Gibco), 20 mM HEPES (Sigma-Aldrich), and antibiotics) 60 minutes at 37°C. Samples were washed with Leibowitz-L15 medium 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin between each step. Erythrocytes were eliminated by treating samples with hypotonic lysis buffer (ACK lysing buffer, Lonza Iberica) and incubated over night at 4°C in Leibowitz L15 medium (Gibco) 10% FBS and penicillin/streptomycin. Next day single epithelial cells were isolated by treating with trypsin (PAA Laboratories) 5 minutes at 37°C and a mix of Dispase (Gibco life technologies, Invitrogen) DNase (Invitrogen) 10 minutes 37°C. Death cells are excluded by centrifugation with Lympholyte (Cedarlane laboratories) 800xg 20 minutes first and 250xg 10 minutes at room temperature. Cell aggregates were removed by filtering cell suspension with 40 µm filter and counted.

Flow Cytometry

Single cells were labeled with antibodies against CD24-PE (20 µg/ml; BD Pharmingen), CD44-FITC or CD44-APC (20 µg/ml; BD Pharmingen), EpCAM-APC or EpCAM-FITC (25 µg/ml; BD Pharmingen), CD133/1-PE (25 µg/ml; MACS Miltenyi Biotec), CD10-PECy5 (20 µg/ml; BD Pharmingen) and CD49f-APC (25 µg/ml; R&D systems). Mouse cells were excluded in flow cytometry using anti mouse-H2Kd-biotin (BD Pharmingen) primary antibody and streptavidin-PECy7 (BD Pharmingen) secondary antibody. A population of 10,000 live cells (no positive for DAPI staining) was captured in all fluorescence-activated cell sorting (FACS) experiments. FACS analysis was performed using FACS Gallios (Beckman Coulter, Inc) and FlowJo software package.

ALDH assay

Single cells were assessed for its ALDH activity using the ALDEFLUOR assay system (STEMCELL technologies). 4×10^5 cells were re-suspended in ALDEFLUOR buffer and activated ALDEFLUOR substrate was added. Immediately, half of them were separated in other tube with DEAB. The incubation was performed during 30 minutes at 37°C. Mouse cells were excluded in flow cytometry using biotin anti mouse-H2Kd (BD Pharmingen) primary antibody and streptavidin-PECy7 (BD Pharmingen) secondary antibody. A population of 10,000 live cells was captured in all fluorescence-activated cell sorting (FACS) experiments. FACS analysis was performed using FACS Gallios (Beckman Coulter, Inc) and FlowJo software package.

Therapeutic assays

Docetaxel (Hospira) 10 mg/kg, 20 mg/kg and 40 mg/kg diluted in its specific excipient was given by i.p route once per week to test the toxicity. The concentration of 20 mg/kg was selected because tumor volume decrease (in sensitive tumors) without toxicity until the 8 to 9 injection was observed in some models. Docetaxel 20 mg/kg and Fortecortin 0,132 mg/kg (Dexametasona, Merck Farma y Quimica, S.L) were given by the i.p. route once per week. Treatment with Fortecortin 0,132 mg/kg was repeated always 24h after docetaxel treatment. Human tumors growing orthotopically in mice for at least five passages were implanted into number 4th mammary glands of 4 or 5-week-old NOD/Scid females, as described above, one tumor being transplanted into inguinal glands of eight recipients. Treatment scheme is represented in Supp. Fig. 1 and a representative example of an initially sensitive tumor is shown in Supp. Fig. 2. Treatment started in mice bearing tumors that reached a volume of 200 mm^3 ($v = \text{height} \times \text{width} \times \text{lengthy}$). Tumor growth and weight was evaluated twice weekly. When tumor volume decreased below 30 mm^3 , treatment was interrupted, and reinitiated again when tumors re-grew over 200 mm^3 . Mice were ethically sacrificed after 8 to 9 doses of Docetaxel, when the tumor volume reached more than 2000 mm^3 of volume or mouse weight decreased 10-20%; tumors were excised and tumor pieces reimplanted into new host mice (passage 2) and docetaxel treatment was reinitiated following the same criteria. Cycles of docetaxel treatment and serial passages of

docetaxel treated tumors were repeated until resistant tumors were obtained in all models.

Statistical Analyses

All data are expressed as mean $\pm$ SD. Statistical comparisons were performed by Student's *t* test using GraphPad Prism Version 5.04. $P \leq 0.05$ was considered statistically significant. The statistical significance of difference between groups was expressed by asterisks (*, $0.01 < P < 0.05$; **, $0.001 < P < 0.01$; ***, $0.001 < P < 0.0001$; ****, $P < 0.0001$).

RESULTS AND DISCUSSION

Generation of human in mouse models of breast cancer

We transplanted a total of 61 samples from breast cancer patients, 54 from fresh primary tumor pieces obtained directly after surgery and 7 from cancer cells isolated from pleural effusions, into the fat pad of 90 immunodeficient mice. Clinical characteristics, number and strain of recipient mice and outcome of the implant are indicated in Supplementary Table 1. Mice that died within 60 days after tumor implantation without developing tumor or samples without pathological data available were excluded from the analyses (15 samples, in red in Supp. Table 1). Causes of death included lymphomas, cystic kidneys and post-surgery complications. Tumor growth (engraftment) was analyzed for 46 samples from patients (40 from fresh pieces and 6 from pleural effusion) and 71 immunodeficient mice.

As shown in Fig. 1A, independently of tumor subtype (luminal or TNBC) tumor engraftment was higher when samples derived from pleural effusions than from tumor pieces: 4 out of 40 (10%) palpable tumors grew from fresh pieces and 3 out of 6 (50%) tumors grew from pleural effusions. The success of tumor engraftment was analyzed within each tumor subtype depending on sample origin. The results showed that: from 40 samples implanted isolated from tumor pieces 27 were Luminal and 2 gave tumor (7,4%), 6 were TNBC and 1 gave tumor (17%) and 7 were Her2+ and 1 gave tumor (14%). On the other hand, from 6 samples implanted isolated from pleural effusion 3 were Luminal and 1 gave tumor (33%) and 3 were TNBC and 2 gave tumor (67%). These results confirm that tumor engraftment increases when samples derived from TNBC, or in samples isolated from pleural effusion as compared to fresh tumor pieces. In the first passage palpable tumors from 7 patients growing in mice were obtained. All of them originated from grade 3 invasive ductal carcinomas (IDC) despite 16 grade 2 and 6 grade 1 tumors were implanted (Fig. 1B).

Significant differences in latency to tumor formation were also observed depending on the source of origin: $151 \text{ days} \pm 54 \text{ days}$ for fresh tumor pieces and $44 \pm 12 \text{ days}$ for cancer cells derived from pleural effusions ($P < 0,0001$) (Fig. 1C).

These results confirm that tumor engraftment is related with tumor aggressiveness and prognosis as only grade 3 samples gave rise to palpable tumors, take rates were higher for TNBC as compared to luminal tumors, and metastatic cells (pleural effusions) compared to cells from primary tumors (tumor pieces).

In order to investigate survival capacity of human cells implanted in mice that did not produce tumors, the mammary glands of the majority of host mice were evaluated by H&E (Supp. Table 1). A 48,3% of mammary glands were devoid of viable human cells and in several extensive necrotic areas were observed indicating that most tumor cells did not survive after implantation (Supp. Fig. 3A, B and Supp. Table 1). However, 36,7% of the host mammary structures (survival of at least 60 days) ($n=60$) contained normal human mammary gland, 30% contained atypical ductal hyperplasia (ADH) or DCIS, and 18.3% contained (IDC) or viable tumor cells despite no palpable tumor where detected suggesting that normal or preneoplastic cells survive better in the mouse microenvironment than tumor cells (Supp. Fig. 3B and Supp. Table 1).

We have been able to successfully maintain 5 tumor lines by consecutive rounds of transplantation (yellow in Supp. Table 1). Two of the initial palpable lesions were not able to give rise to novel tumors when transplanted into new host mice or did not reach a size big enough to be transplanted. Two tumor grafts (model A and B) derived from triple negative pleural effusions (TNBC, ER-PR-Her2-); two models derived from luminal tumors (ER+, PR+, Her2-), model C (from a tumor piece) and model D (from a pleural effusion), and one (model E) derived from a tumor piece of a triple positive (ER+PR+Her+) breast cancer (Table 1).

Tumor latency decreases with serial passages in mice

Latency to tumor formation in models derived from metastatic cells isolated from human pleural effusions (models A, B, D) was 56, 60 and 38 days, respectively, whereas latency in tumor models derived from human tumor pieces was 85 days for model C and 152 days for model E (Fig. 2A). Tumor latency during the next passages was reduced in all tumor models except for model D (Fig. 2A). Regarding growth rates, tumors grew faster after consecutive passages in mice in all models except model B (Model A initial slope=0,092; final slope=0,31; $p=0,00047$; Model B initial slope=0,099; final slope=0,043; Model C initial slope=0,21; final slope=0,58; Model D initial slope=0,047; final slope=0,12; $p<0,0001$; Model E initial slope=0,024; final slope=0,3; $p=0,014$) (Fig. 2B). These results may reflect the loss of human stroma and enrichment in tumor cells during consecutive passages in mice, or the selection of a more aggressive population of tumor cells.

The microenvironment is determinant for the ability of tumor cells to engraft and proliferate (Quintana E 2008). Thus, we aimed to evaluate whether host mice strain may impact latency to tumor development and/or growth rates. Tumors from model B (passage 2) showed a tendency (although not significant; $p=0,52$) to grow faster in a more immunocompromised strain, such as NOD/Scid than in Nude mice. In contrast, no different tendencies in growth rates were observed in the luminal model C when tumor pieces were implanted in Nude or Scid/Beige mice or in model D when tumors were implanted in NOD/Scid or Scid/Beige mice at passage 5 to 8 (Fig. 3 and Supp. Fig. 4). These results indicate that some tumors will grow better in a more immunodeficient background whereas others are equally aggressive in both.

Analysis of estrogen dependency of ER positive orthotopic mouse models.

Estrogen (E) is the main hormone that mediates the initiation and progression of breast tumors. The most important evidence of that fact is the temporary regression of metastatic disease following oophorectomy (Love R.R 2002). Endocrine therapies that

abrogate estrogenic signaling are employed in breast cancer. However, some laboratory models of resistance to selective oestrogen receptor modulators (SERMs) and aromatase inhibitors, demonstrate that after oestrogen deprivation the ER positive cancer cell can reconfigure the survival signal transduction pathways so oestrogen now becomes an apoptotic trigger rather than a survival signal (Maximov PY 2009). Unfortunately, these women cannot be identified at front because the markers of this resistance are unknown. Elucidating the mechanisms through which tumor cells escape from endocrine therapies is incompletely understood and remains an important research challenge.

In order to address hormone dependency of the ER+PR+ tumors, tumor incidence and growth curves were analyzed in the presence or absence of hormones (Fig. 4 and Supp. Fig. 5). Results vary greatly between models: whereas model C tumors shows similar incidence (72% with pellet and 63% without pellet) and growth rates in the presence or absence of hormonal stimuli (slope without hormones=0,4; slope with hormones=0,3; $p=0,26$), tumors from model E only grow when external hormonal pellets were implanted (slope without pellet=0,0022; slope with pellet=0,13; $p<0,0001$). In contrast, in model D, hormone exposure significantly decrease tumor incidence from 88% to 43%, and tumors tend to grow slower in the presence of estrogen and progesterone pellets (slope without pellet=0,12; slope with pellet=0,075; $p=0,18$) (Fig. 4B and Supp Fig. 5). Altogether our results may be predictive of patient response to endocrine treatment. Model C is no longer hormone dependent and therefore the patient will not benefit from endocrine treatment. In contrast, as tumors in model E required exogenous hormonal exposure to grow we can expect a strong clinical response to endocrine treatment in this patient. Importantly, estrogen and progesterone exposure impaired tumor growth in Model D, and therefore the patient should not receive endocrine treatment, as it may promote tumor growth. These results demonstrate the utility of these preclinical models to predict response to common therapies and importantly suggest that endocrine treatments may have deleterious effects is a subgroup of patients with luminal tumors.

Tumor grafts resemble human tumors from which they derive in early passages but tumors evolve during serial passages in mice.

We next asked whether tumors growing in mice retain the histological characteristics from original human tumors. Samples from original human tumors and from tumors serially transplanted in mice at early (0 or 1) or late passages (4 to 8) were stained with antibodies against histological markers (ER, PR, Her2, CK5/6, CK18 and p53) commonly used in the clinic for tumor classification and selection of treatment. The results are shown in Figure 5 (Model B, C, D and E) and Supplementary Figure 4 (Model A).

In TNBC models, A and B mouse grafts resemble human tumors of origin although a decrease in the expression of CK18 is observed in both models at late passages. Models C, D and E, express high levels of CK18 (luminal marker), whereas CK5/6 is low or undetectable in correlation with their luminal identity (Fig. 5). Again, lower levels of CK18 in later passages as compared with early passages or original human tumors were observed in some models (Fig. 5). To confirm these results we analyze the mRNA expression levels of CK18 and CK5 at early and late passages in most models. As shown in Figure 6, a decrease in CK18 mRNA expression was observed in all models analyzed, although changes did not reach significance. CK5 is only expressed in TNBC models A and B, but not in luminal models, and a slight decrease is observed between early and late passages in model B. This loss in CK expression may indicate a loss in epithelial characteristics and increased tumor aggressiveness during serial passages.

Previous published data (Anderson W.F 2002) describe that although the majority (approximately 70%) of newly diagnosed breast cancer are positive for ER, this tumor is unrepresented in mouse models because of loss of ER expression or lack of estrogen dependence. We previously showed that only model E retains hormone dependency. In correlation, ER+ and PR+ cells are detected in all passages from model E as evidenced by immunohistochemistry and qRT-PCR (Fig. 5 and Fig. 6). Model D, where hormone exposure decreases tumor incidence and growth, retains high levels of ER and PR expression during serial passages (Fig. 5). RT-PCR analyses confirmed that

model E and model D show similar mRNA expression levels of ER and PR, despite the different response to hormone exposure (Fig. 6).

The loss of estrogen dependence observed in model D over the passages mimics the clinical behavior of breast cancer patients that acquire resistance mechanisms to endocrine therapy (Massarweh S 2007). Although some of these tumors maintain ER expression, endocrine treatments became ineffective or could have negative effects resulting in relapses and/or distal metastasis. For these reason, we suggest that Model D could be a good orthotopic mouse model of breast cancer to investigate these resistance mechanism at the molecular lever and/or test new drugs against these mechanisms in this kind of tumors.

Model C showed the most dramatic changes during serial passages. Neither ER, nor PR was detected in any of the consecutive passages even though strong CK18 staining during consecutive passages confirmed the luminal identity of this tumor (Fig. 5). RT-PCR analyses confirmed these results as ER and PR mRNA levels were undetectable in model C, with levels similar to TNBC model A, and in contrast with ER and PR expression detected in luminal models D and E (Fig. 5 and Fig. 6). Interestingly, in model C the human tumor of origin contained a focal area of p53 positive cells that is expanded during the passages. The loss of ER and PR in this model will explain the absence of response to estrogen and progesterone stimulation and, together with the presence of the p53 positive population, could be related with an increase in tumor aggressiveness; model C is highly angiogenic (not shown), show the shortest latency to tumor formation (18 days at passage 5) as compared with other models and the fastest growth rate, in 2 weeks tumors grow over 1000 mm² (Fig. 2, Table 1).

Model E, which can only grow in the presence of exogenous estrogen and progesterone (Fig. 4A), retains not only ER+ and PR+ cells, but also Her2 expression, as confirmed by immunohistochemistry and qRT-PCR analyses (Fig. 5 and Fig. 6). The fact that Model E retains the expression of ER, PR and Her2 is a great achievement because these types of tumors are poorly represented in mouse models. For this reason, Model E could be a very useful tool to investigate triple positive tumors and the effects of

new drugs. Altogether these results demonstrate that mouse grafts retain most human characteristics in the early passages but, they are not static and tumors evolve during serial passages in mice. Changes may depend on the clonal evolution of the tumors, or their chromosomal instability. Importantly, evolution of the disease is also observed in patients: differences have been detected between primary tumor and relapse, or primary tumor and metastasis suggesting an independent progression and reflecting plasticity of tumor cells or clonal diversity. Tumors that initially respond to therapies become resistant suggesting that also in patients tumors change during time.

Analysis of the molecular profile of orthotopic mouse models by FACs.

It has been postulated that only a small subpopulation of CSCs is responsible for tumor initiation, growth, and recurrence due to its capability of self-renewal and differentiation (Reya T 2001; Gangemi R 2009).

Expression profile of markers previously used to identify cell populations with increased tumor initiating ability (CSC) such as CD44, CD24, CD49f, CD133/2 and CD10 were analyzed by FACs in established tumors (late passages) (Fig. 7 and Supp. Fig. 7). Luminal tumors contain the highest percentages of the luminal markers EpCAM and CD49f. In fact, the EpCAM⁺CD49f⁺ population is enriched in luminal progenitors in the healthy mammary gland (Shehata M 2012). Luminal cells also express CD24 and, in accordance, most cells were CD24⁺ in luminal tumors, but also 95% of cells were CD24⁺ in model A which is a TNBC. Model C contains the highest percentage of CD44⁺ cells (64%) whereas in the rest of the models the percentage of CD44⁺ cells was below 20%. CD44 is the most widely used marker for identification of breast CSCs (O'Brien CA 2007). CD10, a marker of myoepithelial cells (Leccia F 2012), is expressed exclusively in model C, and not in any of the other luminal or TNBC models analyzed. Interestingly model C is also the model with highest percentage of cells with ALDH activity, which have been shown to have higher tumor initiating ability and cancer stem cell properties than ALDH negative cells (Ginestier C 2007). The aggressive behavior of Model C may be related with high expression of ALDH, CD44 and CD10.

It is widely accepted that the $CD44^+CD24^{-/low}$ population identifies breast cancer stem cells. However, this population is very rare in our models. Model B contains $1,5 \pm 0,54\%$ $CD44^+CD24^{-/low}$ cells and in the remaining models this population is even scarcer (Model A 0,025%, Model C 0,2%, Model D 0,03% and Model E 0,1%). This data contrast with the aggressiveness of our models and their perpetuation over time and suggest that other cell population and not the $CD44^+CD24^{-/low}$ is responsible of the tumor initiation ability in these models.

CD133 has been shown to label a population with enhanced cancer stem cell ability in other epithelial tumors such as colon, but also breast. We found higher levels of CD133 (72%) in the TNBC model A, with lower frequencies in model B (10%), also TNBC, and model E (15,67%) which is a Her2+ tumor, but much lower in the luminal tumors C (3,7%) and D (0,23%).

Altogether our results highlight the high variability of surface markers detected between tumors analyzed even within the same molecular subtype, such models A and B, and questions the universality of current markers to identify cancer stem cells.

Human in mouse tumors show a high incidence of relapse and metastasis

Breast surgery to remove the primary tumor is the most common procedure in oncologic patients. In human patients metastasis and local relapses often appear months or years after the primary tumor is diagnosed and surgically excised. As we wanted our models to emulate the clinical disease, when tumors reached 0,8-1,5 cm they were surgically removed and mice were left alive to investigate incidence of relapse and metastasis. Interestingly model B tumors, which originated from metastatic cells, grew in a compacted way and were easily removed, whereas tumors from model C were very angiogenic and locally invasive, usually invading the peritoneum, probably reflecting different mechanisms of invasion and metastasis (data not shown). Local relapses were common in most models (around 20% per mammary gland) except for model B and E which were less than 10% (Table 2A).

Metastasis are usually scarce in GEM models (and generally limited to the lungs) and xenograft models derived from cell lines. In contrast, metastases to clinical relevant sites, such as brain and bone, were often observed in our models (Table 2B and Supp. Fig. 8).

To calculate the frequency of metastasis we randomly sectioned the axilar MG, LN and lungs of mice that survived longer than 60 days after primary tumor excision (Table 2B). All models analyzed showed metastasis in the axilar mammary glands and corresponding lymph nodes, with model C showing the highest frequency (around 40-45%). Frequency of lung metastasis varied between 10-20% in all models. In addition, in model B, a TNBC model, macroscopic metastases were observed subcutaneously, and importantly, in the brain (Supp. Fig. 8). Macroscopic bone metastasis in the jaw were observed in the luminal model C, as well as metastasis in the kidney (Supp. Fig. 8). In Model D liver metastases were detected. The presence of spontaneous metastasis in our models constitute a valuable source of fresh tissue to study differences between primary tumor and metastasis evolution, which are complicated in the clinics due to the low accessibility of some metastatic sites, such as bone or brain.

Response to Docetaxel of orthotopic mouse models.

Many patients with advanced or metastatic breast cancer show primary resistance to chemotherapy (ie. anthracyclines and taxanes) and even patients that initially respond develop resistance during treatment which presents a major obstacle to therapy and leaves few effective treatment options. Consequently, there is a significant need to define biomarkers of response to common chemotherapy treatments on the one hand, and identify the functional mechanisms responsible of chemotherapy resistance on the other, in order to identify novel targets and offer alternative therapeutic options to patients that no longer respond to current available treatments. The sensitivity of orthotopic mouse models to docetaxel, one of the most commonly used chemotherapy not only in breast but also in other cancer types, was tested, and

putative changes in tumor response after continued exposure to the drug were analyzed (Supp. Fig. 1).

Tumors from each model at late passages were treated with Docetaxel as described in materials and methods (Supp. Fig. 1 and Supp. Fig. 2). Tumor growth is represented in Figure 8 (for tumors that started to be treated when they were bigger than 200 mm³) and Supplementary Figure 9 (tumors that started to be treated when they were below 200 mm³).

Three categories of orthotopic tumors model responders were defined: completely sensitive, in which the treatment induced complete regressions (size smaller than 30mm³); partially sensitive, in which the treatment induce complete regression in some tumors but not in others, and resistant, in which tumors continued growing despite docetaxel treatment.

After 3/4 doses of docetaxel all tumors from model A (TNBC) regressed (passage 1), and thus this tumor was sensitive to docetaxel. However, after treatment was interrupted all tumors started growing again (30-60 days). In the second round of treatment more doses of docetaxel were required to eliminate tumors and a more heterogeneous response between individual tumors was observed (partially sensitive tumors). This behavior was accentuated in the consecutive doses of docetaxel, and the tumors became resistant to docetaxel in passage 3 (Fig. 8 and Supp. Fig. 10).

In model B (TNBC) an already heterogeneous response was observed in passage 1 after first treatments. Acquisition of resistance may have started in the patient as she was treated with docetaxel prior to orthotopic implantation (table 1). In passage 1 model B was only partially sensitive to docetaxel, and docetaxel treatment could not be interrupted in most mice. Tumors start growing very fast after interruption of the treatment and tumors became resistant in passage 2. A third passage and additional treatments with docetaxel did not change tumor growth demonstrating that tumors have acquired resistance to docetaxel (Fig. 8 and Supp. Fig. 10).

In contrast, Luminal tumors from model C and D kept growing despite docetaxel treatment and no sensitivity was observed after 6 or 9 doses, respectively. Thus, Model C and D were resistant to docetaxel (Fig. 8 and Supp. Fig. 10). Model C derived from a naïve treated sample, this is, the patient was not treated before tumor sample was implanted and therefore, model C shows intrinsic resistance to docetaxel. In case of model D, the patient was treated with paclitaxel before sample was obtained and therefore resistance could be primary or acquired in the patient.

No significant differences were observed in tumors treated when they were under 200mm³ as compared to bigger tumors (Supp. Fig. 9) evidencing that the response is not dependent on initial tumor size.

These results demonstrate that triple negative tumors are more sensitive to docetaxel than luminal tumors as observed in the clinics (Kim SI 2010). Moreover, tumors initially sensitive to docetaxel (A and B) acquired resistance after continuous exposure to the drug mimicking the clinical scenario. Tumors gradually became less responsive to docetaxel evidencing the selection of a resistant population (Fig. 8 and Supp. Fig. 2, 89 and 10). Thus, these models constitute valuable tools to identify the mechanisms responsible of the acquisition of docetaxel resistance.

In summary, we can conclude that the orthotopic mouse models or orthoxenopatiens of breast cancer generated constitute valuable preclinical models as they mimic breast cancer disease in the patient.

TABLES

HUMAN	Subtype	TNBC Grade 3		Luminal Grade 3		Luminal Grade 3		Her2+ Grade 3	
	IHC	ER-PR-HER2-CK5/6+CK18+p53-	ER-PR-HER2-CK5/6+CK18+p53-	ER+PR+HER2-CK5/6-CK18+p53+	ER+PR+HER2-CK5/6-CK18+p53-	ER+PR+HER2-CK5/6-CK18+p53-	ER+PR+HER2+CK5/6-CK18+p53-		
MOUSE	Source	Pleural	Pleural	Tumor Pieces	Tumor Pieces	Pleural	Tumor Pieces		
	Treatment	FEC, docetaxel, capecitabina	FEC, docetaxel	Not treated	Not treated	paclitaxel, trastuzumab,	Not treated		
	Model	A	B	C	C	D	E		
	Phenotype early passage	ER-PR-HER2-CK5/6+CK18+p53-	ER-PR-HER2-CK5/6+CK18+p53-	ER+PR+HER2-CK5/6-CK18+p53+	ER+PR+HER2-CK5/6-CK18+p53+	ER+PR+HER2-CK5/6-CK18+p53-	ER+PR+HER2+CK5/6-CK18+p53-		
	Phenotype late passage	ER-PR-HER2-CK5/6+CK18+p53-	ER-PR-HER2-CK5/6+CK18+p53-	ER-PR-HER2-CK5/6-CK18+p53+	ER-PR-HER2-CK5/6-CK18+p53-	ER+PR+HER2-CK5/6-CK18+p53-	ER+PR+HER2+CK5/6-CK18+p53-		
	Passage	13	8	16	16	7	9		
	Latency (p5)	19 days	42 days	18 days	18 days	63 days	27 days		
	Hormone dependency	-	-	no	no	no	yes		

Table 1

Table 1. Main characteristics of orthotopic mouse models generated.

Main characteristics of human tumor of origin and mouse grafts in established models.

ER = estrogen receptor; PR = progesterone receptor; CK = cytokeratin, FEC = triple treatment composed by 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide.

Table 2

A

Model	Type	per MG	
		% Relapse	n
A	TNBC	17,24	116
B	TNBC	6,94	144
C	Luminal	20,79	178
D	Luminal	23,40	94
E	Her2+	8,51	94

B

		TNBC		Luminal		Her2+
		Model A	Model B	Model C	Model D	Model E
MicroMETs and MacroMETs	Mammary gland (2 nd or 3 rd)	10%	10%	46%	0%	8%
	Lymph node (axilar)	14%	33%	41,2%	0%	50%
	Lung	20%	20%	10%	0%	20%
	Brain	n.d.	20%	n.d.	n.d.	n.d.
MacroMETs	Bone	n.d.	n.d.	yes	n.d.	n.d.
	Liver	n.d.	n.d.	n.d.	yes	n.d.
	Kidney	n.d.	n.d.	yes	n.d.	n.d.
	Subcutaneous	n.d.	yes	n.d.	n.d.	n.d.

Table 2. Summary of relapses and metastasis in orthoxenopatients.

A.- Percentage of tumor relapse per mammary gland in each model. Total number (n) of mammary glands (MG) is indicated. Only mice that survived for at least 60 days after primary tumors excision without showing relapse were considered as relapse free.

B.- Frequency of metastases (macroMETs and microMETs) observed in axilar mammary gland (axilar MG), axilar lymph node, lungs or brain in each model. The total number of mammary glands/lymph nodes/lungs/brains analyzed is shown. Presence of macroscopic metastases (macroMETs) detected at necropsy in bone, liver, kidney and subcutaneous for each model is indicated (yes). Only mice that survived for at least 60

days after primary tumors excision without showing metastases were considered as metastasis free. All metastases were confirmed by pathologists. (n.d = no determined).

REFERENCES

- (1992). "Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group." Lancet **339**(8785): 71-85.
- (1998). "Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group." Lancet **352**(9132): 930-42.
- Al-Foheidi M, A.-M. M. M., Ibrahim E. M (2013). "Breast cancer screening: review of benefits and harms, and recommendations for developing and low-income countries." Med Oncol **30**(2): 471.
- Al-Hajj M, W. M., Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3983-8.
- Anderson W.F, C. N., Ershler W.B, Brawley O.W. (2002). "Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the surveillance, epidemiology, and end results database." Breast Cancer Research and Treatment **76** (1): 27–36.
- Bachelard-Cascales E, C. M., Delay E, Pochon G, Voeltzel T, Puisieux A, Caron de Fromentel C, Maguer-Satta V. (2010). "The CD10 enzyme is a key player to identify and regulate human mammary stem cells." Stem Cells **28**(6): 1081-8.
- Bonnet D, D. J. E. (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nat Med **3**(7): 730-7.
- Carroll AM, B. M. (1991). "T-lymphocyte development in scid mice is arrested shortly after the initiation of T-cell receptor delta gene recombination." Genes Dev **5**(8): 1357-66.
- Clarke, R. (2009). "The role of preclinical animal models in breast cancer drug development." Breast Cancer Res **11 Suppl 3**: S22.
- Dean M, F. T., Bates S. Dean M1, Fojo T, Bates S. (2005). "Tumour stem cells and drug resistance." Nat Rev Cancer **5**(4): 275-84.
- Ethier, S. P. (1996). "Human breast cancer cell lines as models of growth regulation and disease progression." J Mammary Gland Biol Neoplasia **1**(1): 111-21.
- Friedrichs K, R. P., Franke F, Gille I, Terpe HJ, Imhof BA. (1995). "High expression level of $\alpha 6$ integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival." Cancer Res **55**: 901–6.
- Gangemi R, P. L., Orenco AM, et al. (2009). "Cancer stem cells: a new paradigm for understanding tumor growth and progression and drug resistance." Curr Med Chem. **16**(14): 1688-1703.
- Ginestier C, H. M. H., Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer C. G, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha M. S, Dontu G. (2007). "ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome." Cell Stem Cell **1**(5): 555-567.
- Hellman S, H. J. (2000). "Natural history of breast cancer. In Disease of the Breast." 407-423.
- Hennighausen, L. (2000). "Mouse models for breast cancer." Oncogene **19**(8): 966-7.

- Jemal A, S. R., Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun M. J (2008). "Cancer statistics, 2008." CA Cancer J Clin **58**(2): 71-96.
- Kaipparettu BA, M. S., Konduri SD, Liu W, Rokavec M, Kuip H van der, Hoppe R, Hammerich-Hille S, Fritz P, Schroth W, Abele I, Das GM, Oesterreich S, Brauch H. (2008). "Estrogen-mediated downregulation of CD24 in breast cancer cells." Int J Cancer **123**: 66-72.
- Kim HJ, K. J., Lee KM, Shin I, Han W, Ko E, Bae JY, Noh DY. (2007). " Isolation of CD24(high) CD24(low/-) cells from MCF-7: CD24 expression is positively related with proliferation, adhesion and invasion in MCF-7." Cancer Lett **258**: 98-108.
- Kim SI, S. J., Koo JS, Park SH, Park HS, Park BW. (2010). "Molecular subtypes and tumor response to neoadjuvant chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer." Oncology. **79**(5-6): 324-30.
- Leccia F, N. A., Corvigno S, Vecchio LD, De Placido S, Salvatore F, Veneziani BM. (2012). "Cytometric and biochemical characterization of human breast cancer cells reveals heterogeneous myoepithelial phenotypes." Cytometry A **81**(11): 960-72.
- Lim E, V. F., Wu D, Forrest N. C, Pal B, Hart A. H, Asselin-Labat M. L, Gyorki D. E, Ward T, Partanen A, Feleppa F, Huschtscha L. I, Thorne H. J, Fox S. B, Yan M, French J. D, Brown M. A, Smyth G. K, Visvader J. E, Lindeman G. J. (2009). "Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers." Nat Med **15**(8): 907-13.
- Lock RB, L. N., Farnsworth ML, Milross CG, Xue C, Tajbakhsh M, Haber M, Norris MD, Marshall GM, Rice AM. (2002). "The nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mouse model of childhood acute lymphoblastic leukemia reveals intrinsic differences in biologic characteristics at diagnosis and relapse." Blood **99**(11): 4100-8.
- Love R.R, P. J. (2002). "Oophorectomy for breast cancer: history revisited." Journal of the National Cancer Institute **94** (19): 1433-1434.
- Massard C, D. E., Soria JC. (2006). "Tumour stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation." Ann Oncol. **17**(11): 1620-4.
- Massarweh S, S. R. (2007). "Unraveling the mechanisms of endocrine resistance in breast cancer: new therapeutic opportunities." Clin Cancer Res **13**: 1950-1954.
- Maximov PY, L.-W. J., Jordan VC. (2009). "The Paradox of Oestradiol-Induced Breast Cancer Cell Growth and Apoptosis." Curr Signal Transduct Ther **4**(2): 88-102.
- O'Brien CA, P. A., Gallinger S, Dick JE. (2007). "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." Nature. **445**(7123): 106-10.
- Price J. E, P. A., Zhang R. D, Daniels L. M. (1990). "Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice." Cancer Res **50**(3): 717-21.
- Quintana E, S. M., Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. (2008). "Efficient tumour formation by single human melanoma cells." Nature **456**(7222): 593-8.
- Reya T, M. S., Clarke MF, Weissman IL (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-11.
- Russo J, R. I. H. (1996). "Experimentally induced mammary tumors in rats." Breast Cancer Res Treat **39**(1): 7-20.
- Shehata M, T. A., Sharp G, Novcic N, Russell A, Avril S, Prater M, Eirew P, Caldas C, Watson CJ, Stingl J. (2012). "Phenotypic and functional characterization of the luminal cell hierarchy of the mammary gland." Breast Cancer Res. **14**(5).

- Smalley, M. (2010). "Isolation, culture and analysis of mouse mammary epithelial cells." Methods Mol Biol **633**: 139-170.
- Stingl J, P. E., Ricketson I, Shackleton M, Vaillant F, Choi D, Li H, Eaves C.J (2006). "Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells." Nature Publishing Group **439**.
- Stingl J, R. A., Emerman JT et al. (2005). " Epithelial progenitors in the normal human mammary gland." J Mammary Gland Biol Neoplasia **10**: 49–59.
- Tinoco G, W. S., Gluck S, Avancha K, Montero A. J (2013). "Treating breast cancer in the 21st century: emerging biological therapies." J Cancer **4**(2): 117-32.
- Wicha, M. S. (2006). "Cancer stem cells and metastasis: lethal seeds." Clin Cancer Res **12**(19): 5606-7.
- Yu F, Y. H., Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, Huang Y, Hu X, Su F, Lieberman J, Song E. (2007). "let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells." Cell **131**(6): 1109-23.

FIGURES

Figure 1

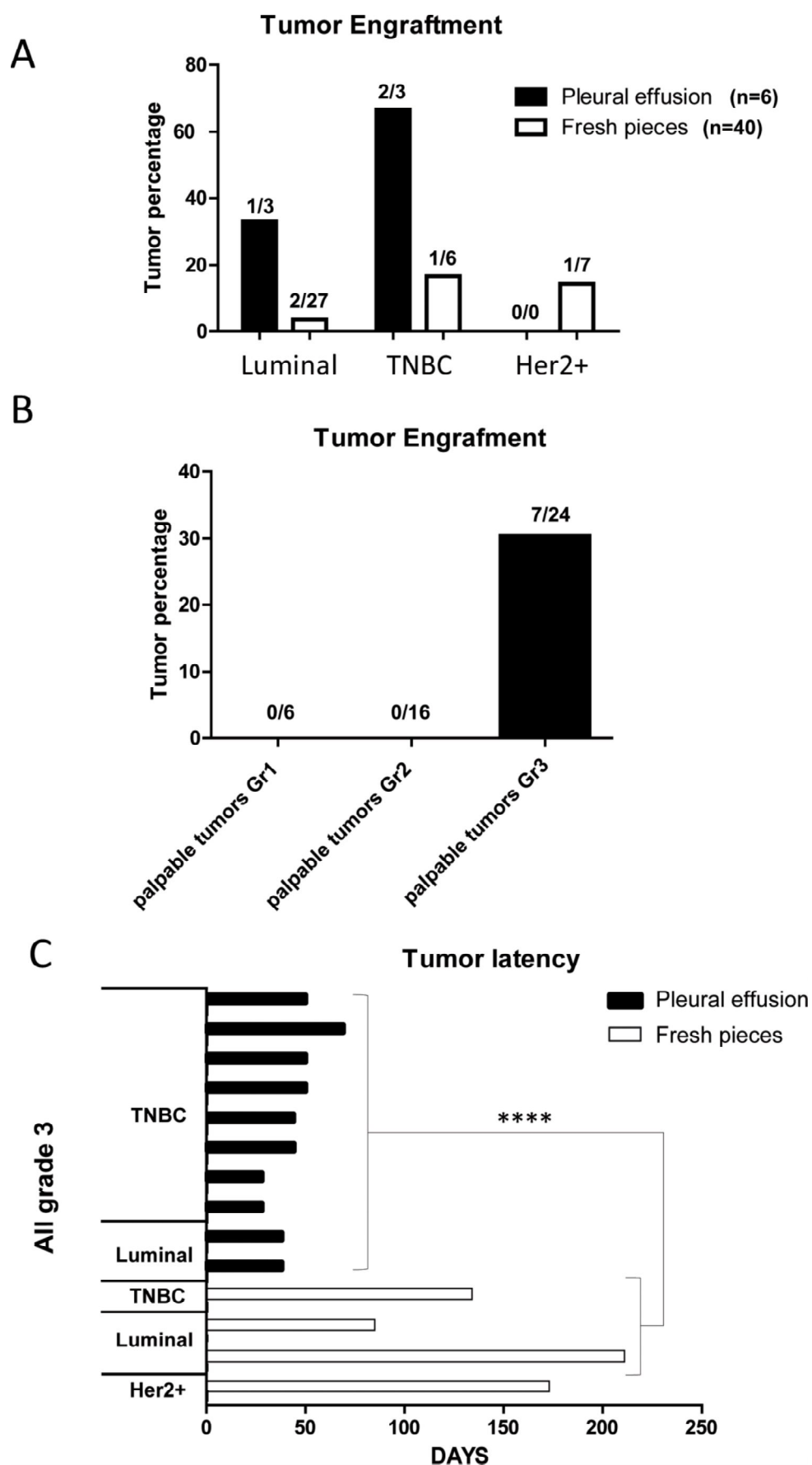


Figure 1. Xenograft models derived from pleural effusion show higher tumor rate and shorter latency than models derived from tumor pieces.

A.- Percentage of palpable tumors relative to total number of independent patient samples, classified by subtype and source. Each sample was usually implanted in both inguinal mammary glands of one mouse and occasionally two or three mice as indicated in Supp. Table 1. Total number of original patient samples is indicated and mice that do not survive for at least 60 days after surgery were excluded.

B.- Percentage of palpable tumors relative to total number of independent patient samples, classified by pathological grade. Mice that did not survive for at least 60 days after surgery were excluded from the analyses. Total number of samples is indicated (n). g1 = grade 1; g2 = grade 2; g3 = grade 3.

C.- Time in days until palpable lesions are detected at first passage in mice respect to its origin (tumor pieces or pleural effusion). All engrafted tumors were grade 3 and tumor subtype is shown.

Figure2

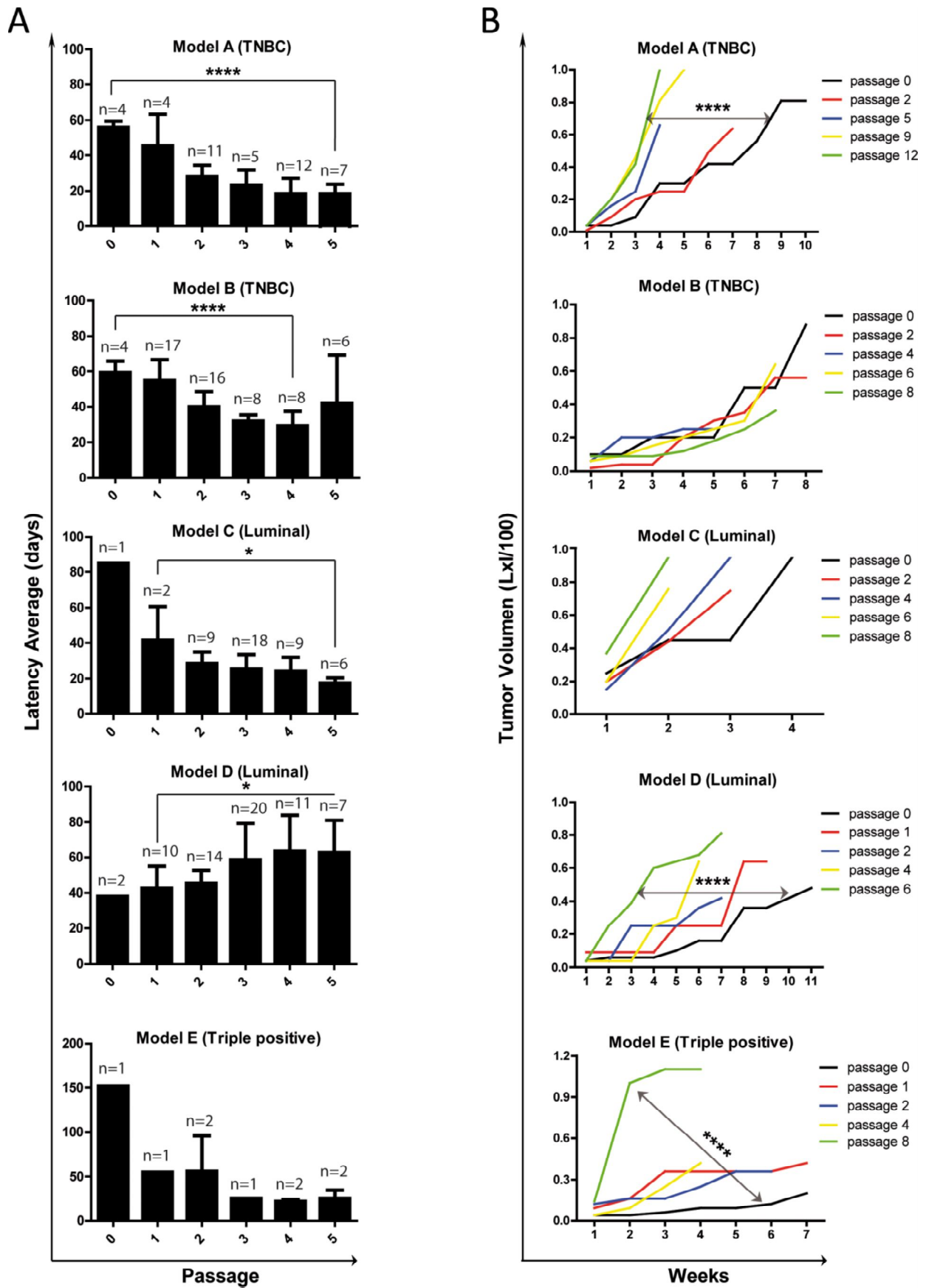


Figure 2. Tumor latency decreases and growth rate increases with serial passages in mice.

A.- Tumor latency (days) in mice of each tumor model at the indicated passages. Total number of tumors considered is shown (n). Mean, standard deviation and t test p values for significant differences is shown.

B.- Tumor growth in mice, calculated as $L \times l$ (mm x mm)/100 versus time (weeks). Each line represents a representative tumor and each color represents a different passage as indicated. Week 1 is the time at which palpable tumor was detected.

Figure 3

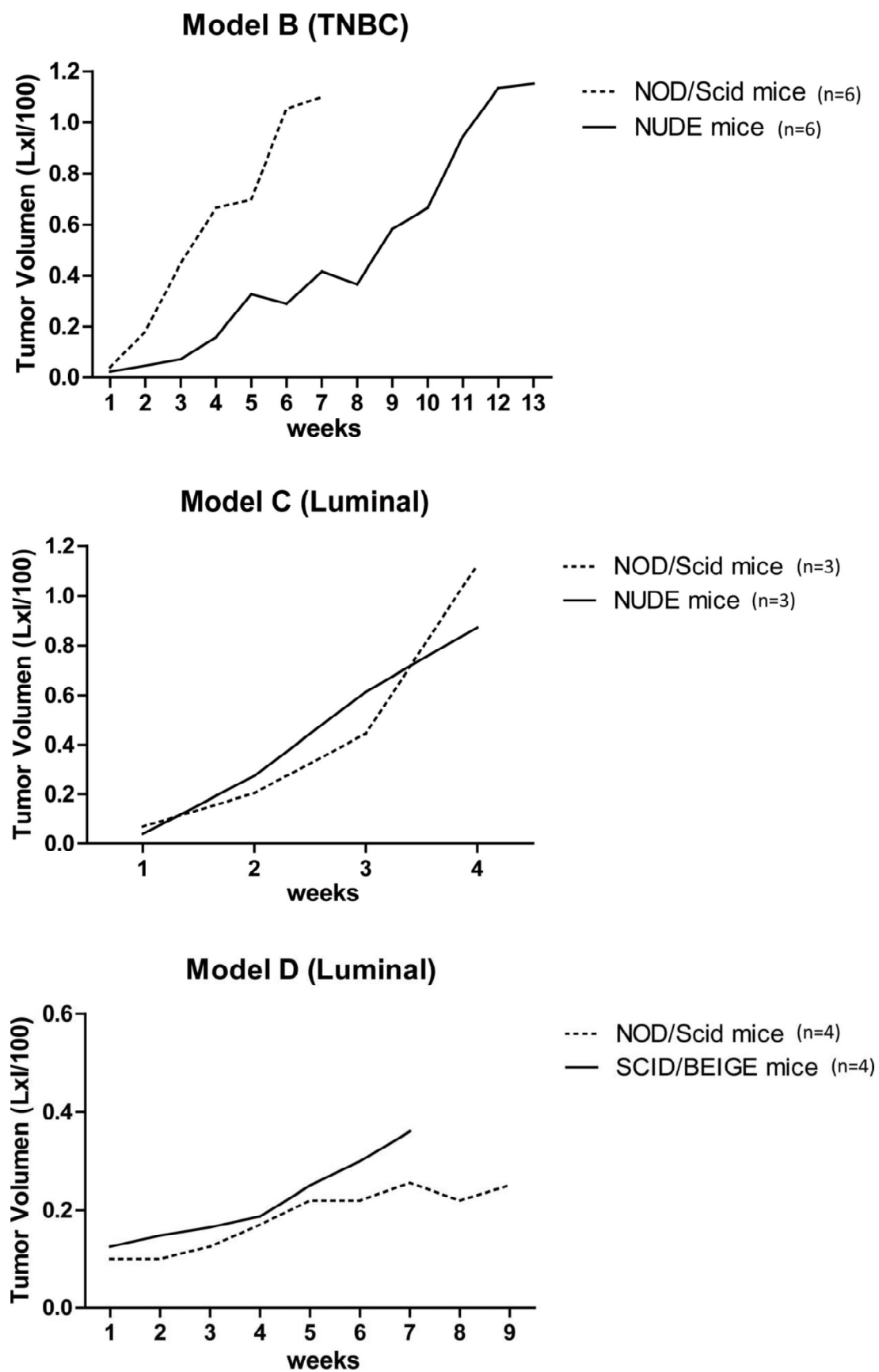


Figure 3. Grade of immunodeficiency of host mice facilitates tumor growth in some but not all models.

Average of tumor growth in model B and C tumors implanted in NOD/Scid versus Nude mice or model D tumors implanted into NOD/Scid versus Scid/Beige. Tumor volume is calculated as $L \times l$ (mm x mm)/100.). Each line represents the mean of (n) independent tumors (see Supp. Fig. 4). Total number of implanted mammary glands is indicated (n). Week 1 is the time at which palpable tumor was detected.

Figure 4

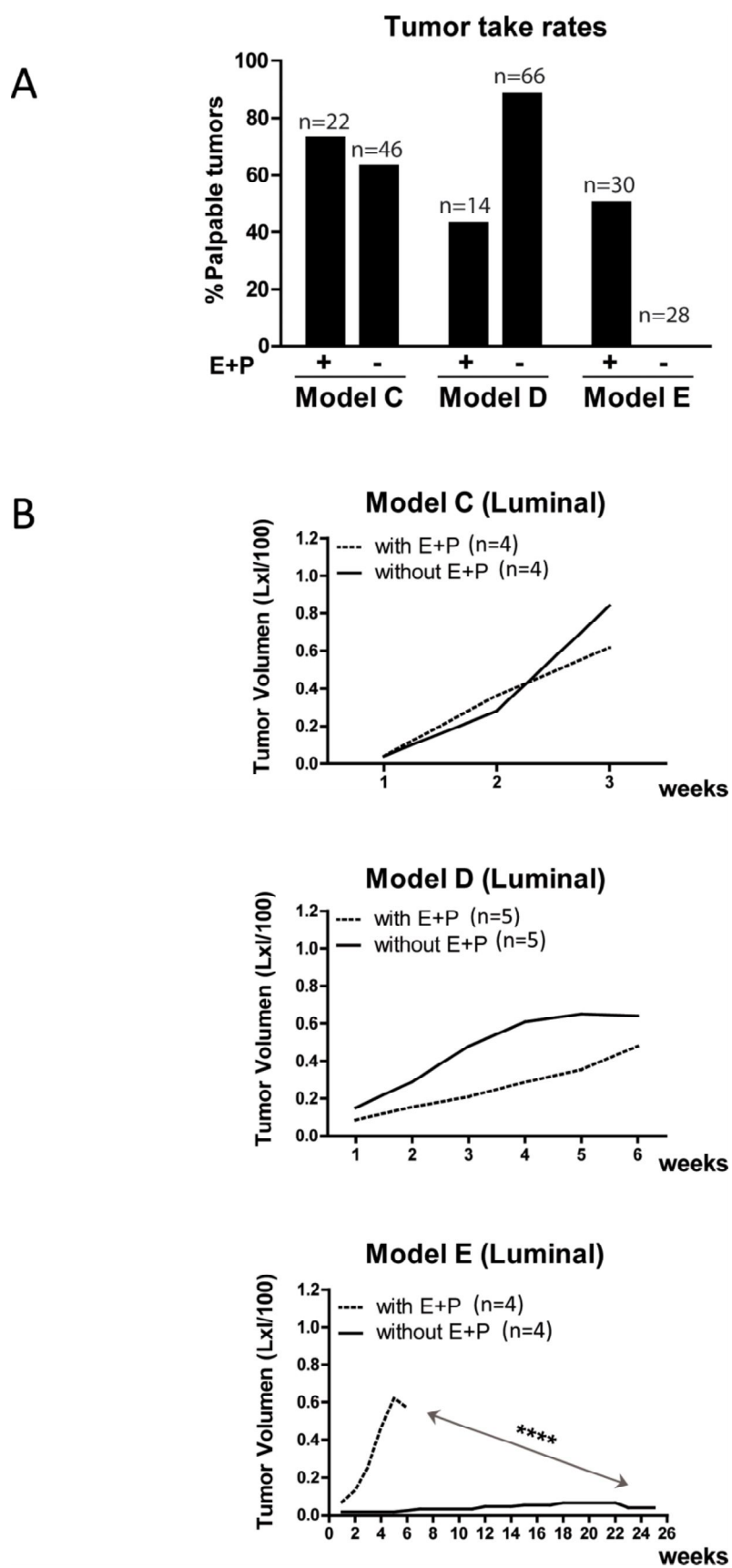


Figure 4. Hormonal exposure can facilitate or impair tumor engraftment and growth.

A.- Percentage of palpable tumors relative to total number of tumors implanted with (+) or without (-) exogenous 17β -estradiol and progesterone pellets in luminal models (model C, model D and model E). Total number of implanted mammary glands is indicated (n).

B.- Average tumor growth of model C, model D and model E tumors implanted in mice with exogenous 17β -estradiol and progesterone pellets (E+P) versus tumors implanted in mice without hormones. Tumor volume is calculated as $L \times I \text{ (mm} \times \text{mm)}/100$. Each line represents the mean growth of (n) independent tumors (see Supp. Fig. 5). Week 1 is the time at which palpable tumor was detected.

Figure 5

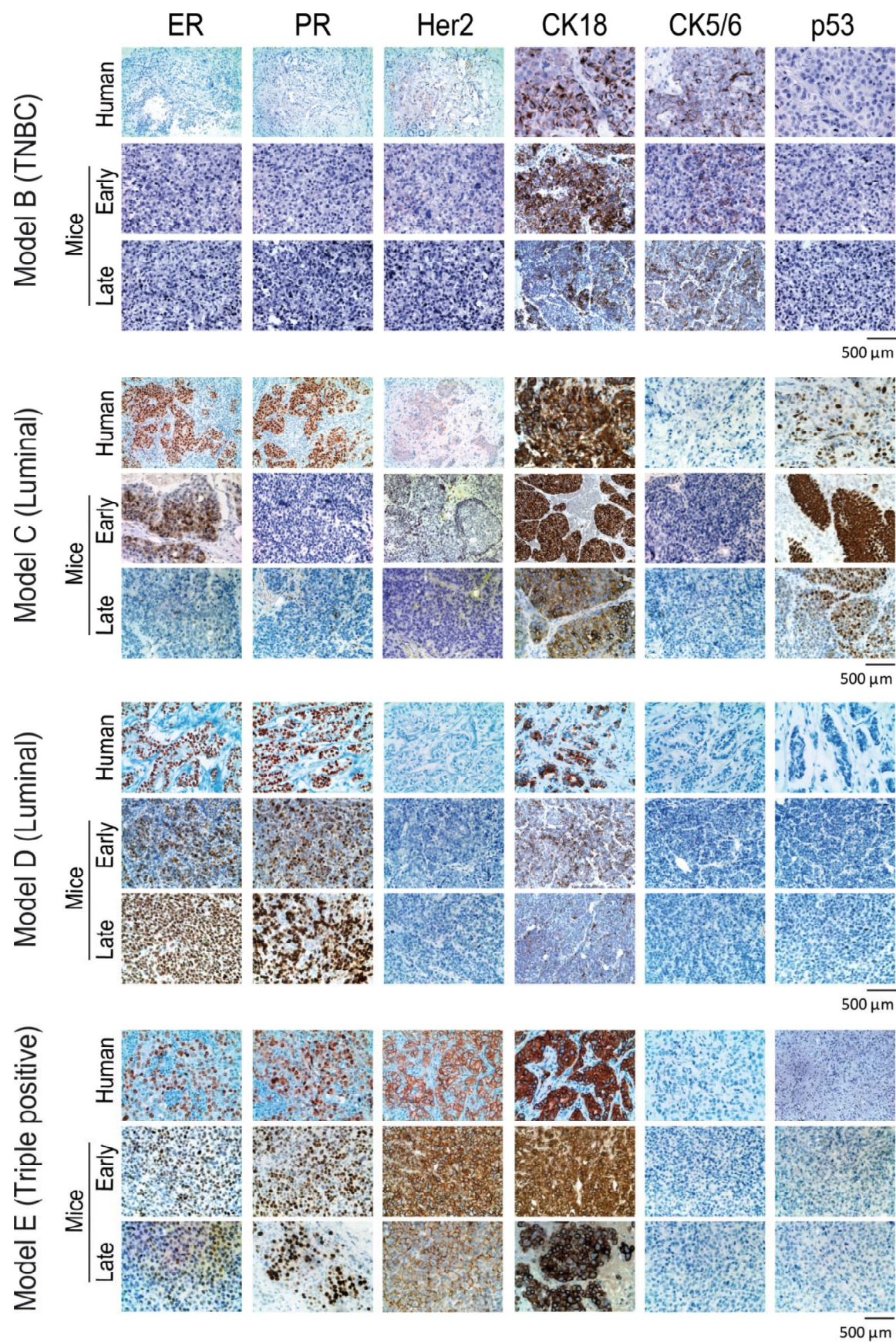


Figure 5. Mouse grafts resemble human tumors of origin at early passages but changes are observed at late passages in some models.

Representative images of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), HER2, cytokeratins (CK18, CK5/6) and p53 protein expression in human tumors of origin and tumors growing in mice of the indicated models at early (1st to 2nd) and later passages (4th to 8th) as determined by immunohistochemistry.

Figure 6

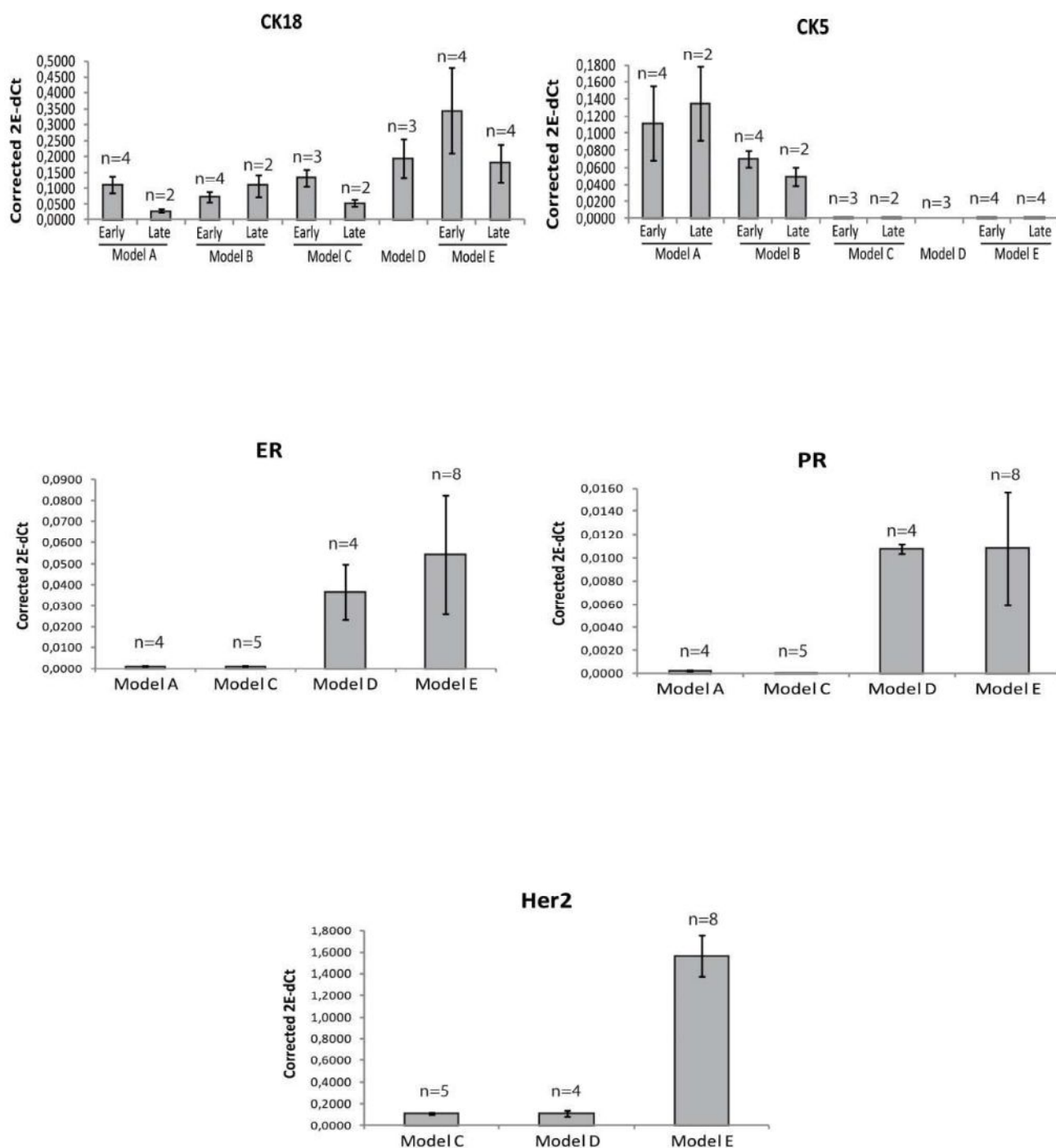


Figure 6. mRNA expression of cytokeratins and hormone receptors change with the passages in some models

mRNA expression levels of CK18, CK5, ER, PR and Her2 relative to PP1A in tumors at early (1st to 5th) and late passages (more than 10th) from models A, B, C and E and early passages (1st to 5th) from model D measured by qRT-PCR. Total number of tumors analyzed is indicated (n). Determinations were done in triplicate and mean values were used for the calculations. Mean values for n independent tumors and Standard deviations are shown.

Figure 7

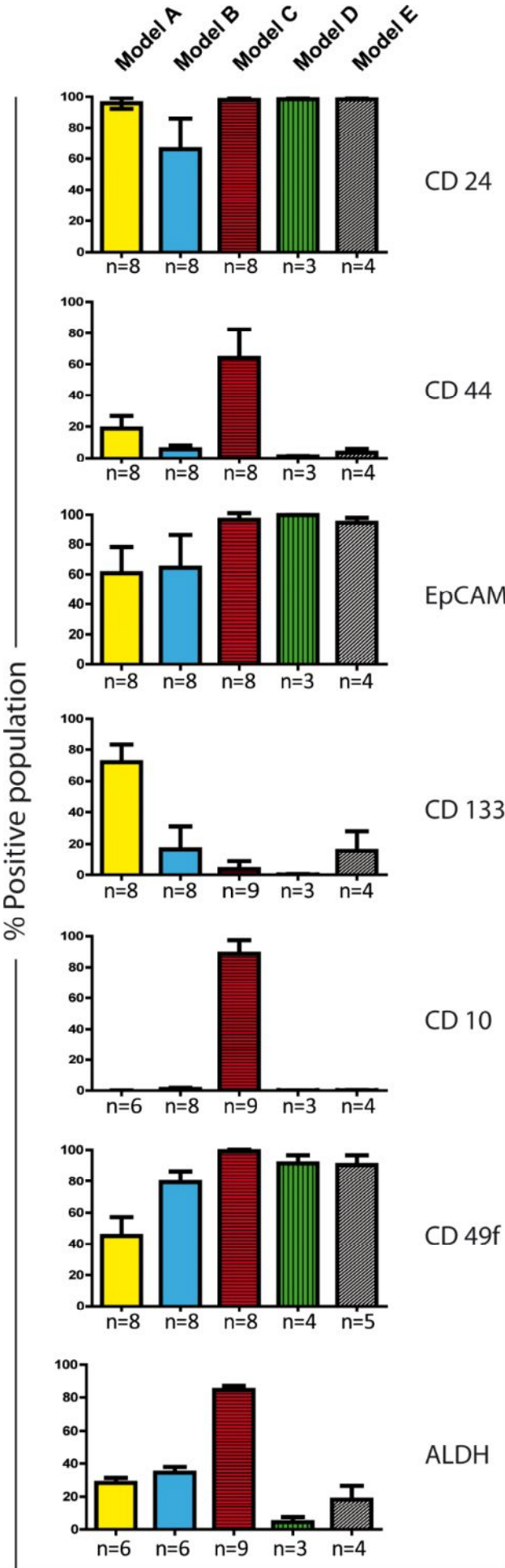


Figure 7. Characterization of molecular profile of orthotopic mouse models by FACs.

Frequency of CD24⁺, CD44⁺, EpCAM⁺, CD133/2⁺, CD10⁺, CD49f⁺ and ALDH⁺ cells within the H2kd⁻ population in the indicated models analyzed by flow cytometry. Total number of tumors analyzed (n) is indicated. Mean values and standard deviations are shown.

Figure 8

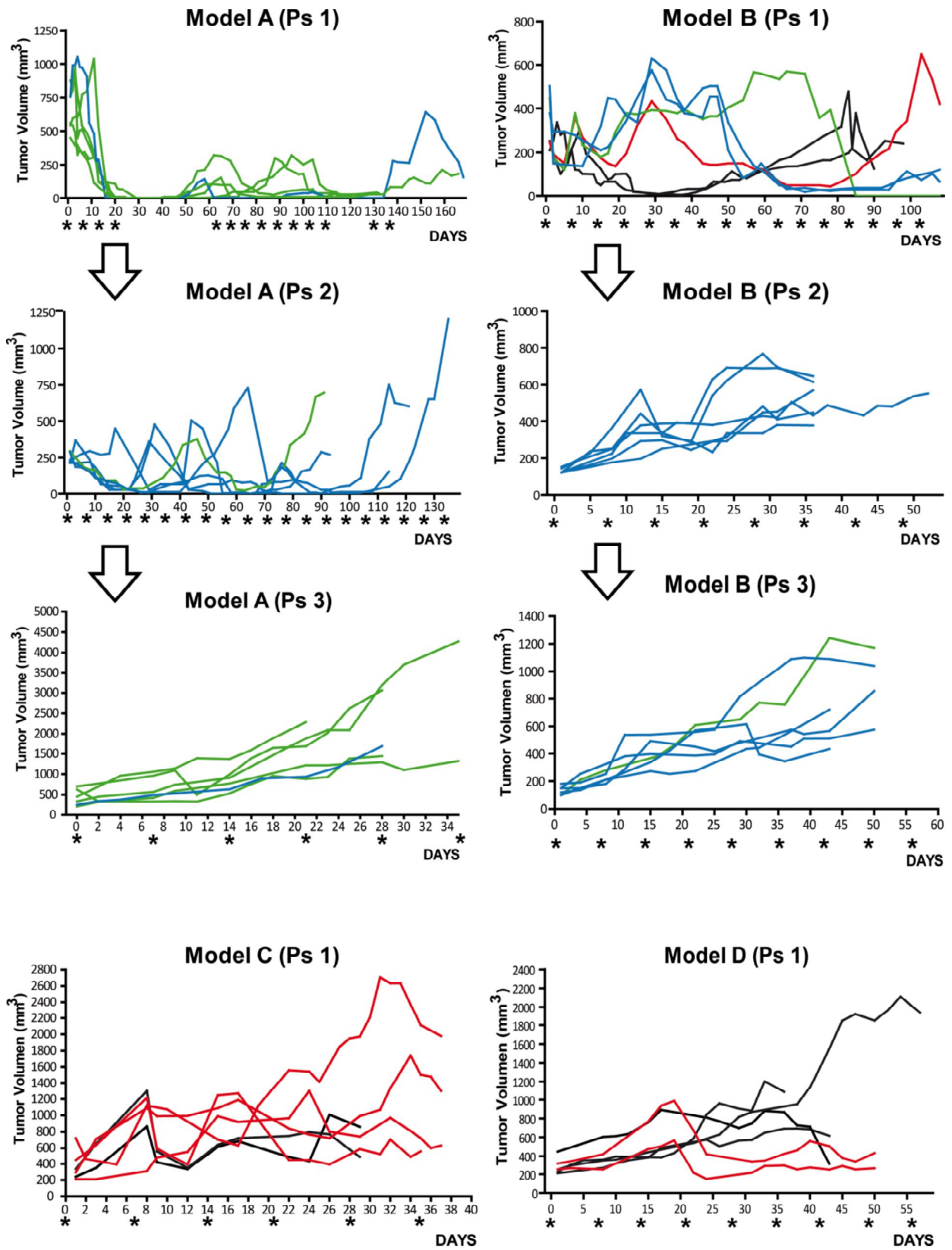


Figure 8. Model A and B were sensitive or partially sensitive (respectively) to Docetaxel and acquire resistance after continuous treatment whereas Model C and D were resistant.

Representative kinetics of tumor growth during docetaxel treatment. Tumor volume in mm^3 (length x width x height) is shown over time (days). Day 0 indicates the first day that tumors started to be treated. Animals bearing a tumor bigger than 200 mm^3 were individually identified and treated with docetaxel (20 mg/kg i.p.) once a week as indicated by the asterisks and explained in Supplementary Figure 1 and 2. Each line represents one tumor and each colour represents the origin of the tumor. In models A and B mice were ethically sacrificed after 8-9 doses of docetaxel and tumors were transplanted into new host to continue treatment. Ps = number of passage with docetaxel treatment.

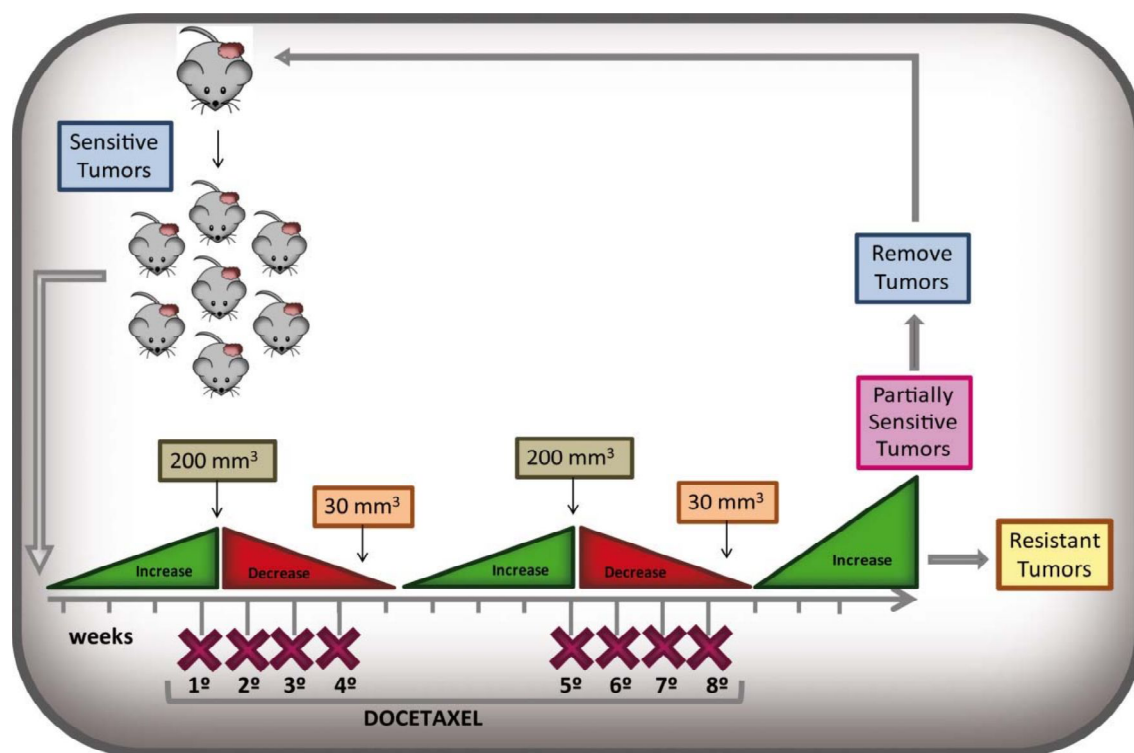
SUPPLEMENTAL TABLES

Supplemental Table 1

Supplemental Table 1. Characteristics of human tumors of origin and recipient mice Source, histopathology and clinical data available of the 61 human samples implanted; number, strain, survival of recipient mice and outcome after H&E examination of recipient mammary glands is shown. Samples excluded from the analyses are shown in red. Samples highlighted in yellow indicate established tumor models. IDC: invasive ductal carcinoma; ADH: atypical ductal hyperplasia; DCIS: ductal carcinoma in situ; QT: chemotherapy; HTP: hormonotherapy, n.d.: no data, n.e. not evaluable. MG: mammary gland.

NHC	SOURCE	HUMANS							MOUSE							
		HISTOPATHOLOGY/CLINICAL DATA							SURVIVAL	STRAIN	OUTCOME (MG right/MG left)			palpable tumor		
		HISTOLOGY	GRADE	%ER	%PG	KI-67	HER-2	TREATED			Implanted rests	normal mammary	ADH/DCIS/tumor cells			
1	tumor piece	IDC	3	100	100	70	NEG	NO	6 (3 mice) 2nd mouse	215	Nod/Scid	+/+	-/-	-/-	tumor (IDC gr 3)	-/-
									3rd mouse	223	Nod/Scid	n.d.	n.d.	n.d.	-/-	-/-
2	tumor piece	IDC	3	100	40	10	POS	no	4 (2 mice) 2nd mouse	209	Nod/Scid	n.e./+	n.e./-	n.e./+	tumor (IDC gr 3)	-/-
										202	Nod/Scid	n.d.	n.d.	n.d.	-/-	-/-
3	tumor piece	IDC	3	NEG	NEG	45	NEG	no	2 (1 mouse)	201	Nod/Scid	+/+	n.e./n.e.	+	tumor (IDC gr3)	-/-
4	tumor piece	IDC	3	60	50	40	NEG	yes (QT)	2 (1 mouse)	222	Nod/Scid	n.e./+	n.e./-	n.e./+	tumor (IDC gr 3)	-/-
5	tumor piece	IDC	2	100	100	10	NEG	no	6 (3 mice)	120	Nod/Scid	+/+	+/	-/+ (ADH)	-/-	-/-
									2nd mouse	176	Nod/Scid	+/n.e.	+/n.e.	n.d./n.e.	-/-	-/-
									3rd mouse	434	Nude	n.e./+	n.e./-	n.e./+ (ADH; DCIS)	-/-	-/-
6	tumor piece	IDC	2	95	90	18	NEG	no	2 (1 mouse)	197	Nod/Scid	+/+	+/	+	-/-	-/-
7	tumor piece	IDC	3	100	100	30	NEG	no	2 (1 mouse)	187	Nude	n.d.	n.d.	n.d.	-/-	-/-
8	tumor piece	IDC	3	NEG	NEG	75	NEG	no	4 (2 mice)	505	Nude	+/+	+/	-/+ (ADH)	-/-	-/-
									2nd mouse	630	Nude	n.e./n.e.	n.e./n.e.	n.e./n.e.	-/-	-/-
9	tumor piece	IDC	3	100	70	<10	NEG	yes (QT; HTP)	2 (1 mouse)	335	Nod/Scid	n.e./+	n.d.	n.d.	-/-	-/-
10	tumor piece	IDC	2	50	85	40	NEG	yes (QT)	2 (1 mouse)	292	Nod/Scid	n.e./+	n.e./-	n.e./+ (ADH;DCIS)	-/-	-/-
11	tumor piece	IDC	3	85	85	30	NEG	no	2 (1 mouse)	328	Nod/Scid	n.e./n.e.	n.e./n.e.	n.e./n.e.	hematologic tumor	-/-
12	tumor piece	IDC	3	NEG	NEG	85	NEG	no	4 (2 mice)	83	Nude	+/+	-/-	-/+ (DCIS; IDC)	-/-	-/-
									2nd mouse	152	Nod/Scid	+/n.e.	+/n.e.	+	-/-	-/-
13	tumor piece	IDC	3	NEG	NEG	60	NEG	no	2 (1 mouse)	69	Nod/Scid	n.e./n.e.	n.e./n.e.	n.e./n.e.	-/-	-/-
14	tumor piece	IDC	2	60	60	<10	NEG	yes (QT; HTP)	2 (1 mouse)	126	Nod/Scid	+/+	+/	-/+ (ADH;DCIS;infiltrant)	-/-	-/-
15	tumor piece	IDC	2	40	70	30	POS	no	2 (1 mouse)	148	Nod/Scid	n.d.	n.d.	n.d.	-/-	-/-
16	tumor piece	IDC	2	80	30	20	NEG	no	2 (1 mouse)	148	Nod/Scid	n.d.	n.d.	n.d.	-/-	-/-
17	tumor piece	IDC	1	75	90	15	NEG	yes (QT; HTP)	2 (1 mouse)	103	Nod/Scid	n.e./+	n.e./+	n.e./+ (ADH)	-/-	-/-
18	tumor piece	IDC	2	100	80	<10	NEG	no	4 (2 mice)	145	Nod/Scid	n.e./+	n.e./+	n.e./+ (ADH; DCIS)	-/-	-/-
19	tumor piece	IDC	1	100	60	<10	NEG	no	2nd mouse	156	Nod/Scid	n.e./+	n.e./-	n.e./+ (ADH)	-/-	-/-
20	tumor piece	IDC	1	100	60	<10	NEG	no	4 (2 mice)	196	Nod/Scid	n.e./+	n.e./+	n.e./+ (IDC)	-/-	-/-
									2nd mouse	251	Nod/Scid	+/+	-/-	+/+ (viable tumor cells)	-/-	-/-
21	tumor piece	IDC	3	NEG	NEG	45	POS	no	2 (1 mouse)	357	Nod/Scid	+/+	+/	-/+ (viable tumor cells)	-/-	-/-
22	tumor piece	IDC	2	95	95	5	NEG	yes (QT)	2 (1 mouse)	258	Nod/Scid	n.e./+	n.e./+	n.e./+ (ADH)	-/-	-/-
23	tumor piece	IDC	1	95	95	5	NEG	no	2 (1 mouse)	33	Nod/Scid	+/+	-/+	-/+ (viable tumor cells)	dead	-/-
24	tumor piece	IDC	2	90	NEG	10	NEG	no	2 (1 mouse)	152	Nod/Scid	n.d./+	n.d.	n.d.	-/-	-/-
25	tumor piece	IDC	2	95	80	10	NEG	no	4 (2 mice)	153	Nod/Scid	+/+	+/	-/-	-/-	-/-
									2nd mouse	271	Nod/Scid	n.e./+	n.e./+	n.e./+ (ADH)	-/-	-/-
26	tumor piece	IDC	1	95	80	15	POS	no	2 (1 mouse)	166	Nod/Scid	+/+	-/+	-/+ (DCIS; IDC; calcification)	-/-	-/-
27	tumor piece	IDC	3	90	75	40	NEG	no	2 (1 mouse)	98	Nod/Scid	n.e./+	n.e./-	n.e./+ (viable tumor cells)	-/-	-/-
28	tumor piece	IDC	1	95	95	20	POS	no	2 (1 mouse)	138	Nod/Scid	n.e./+	n.e./-	n.e./+ (ADH; DCIS)	-/-	-/-
29	tumor piece	IDC	3	90	90	50	POS	no	4 (2 mice)	96	Nod/Scid	+/+	-/+	-/+ (ADH)	-/-	-/-
									2nd mouse	113	Nod/Scid	n.e./n.e.	n.e./n.e.	n.e./n.e.	-/-	-/-
30	tumor piece	IDC	2	70	90	<10	NEG	no	8 (4 mice)	155	Nod/Scid	+/+	-/+	-/+ (atypia)	-/-	-/-
									2nd mouse	257	Nod/Scid	n.e./+	n.e./-	n.e./-	-/-	-/-
									3rd mouse		Nod/Scid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
									4th mouse	153	Nod/Scid	n.d.	n.d.	n.d.	-/-	-/-

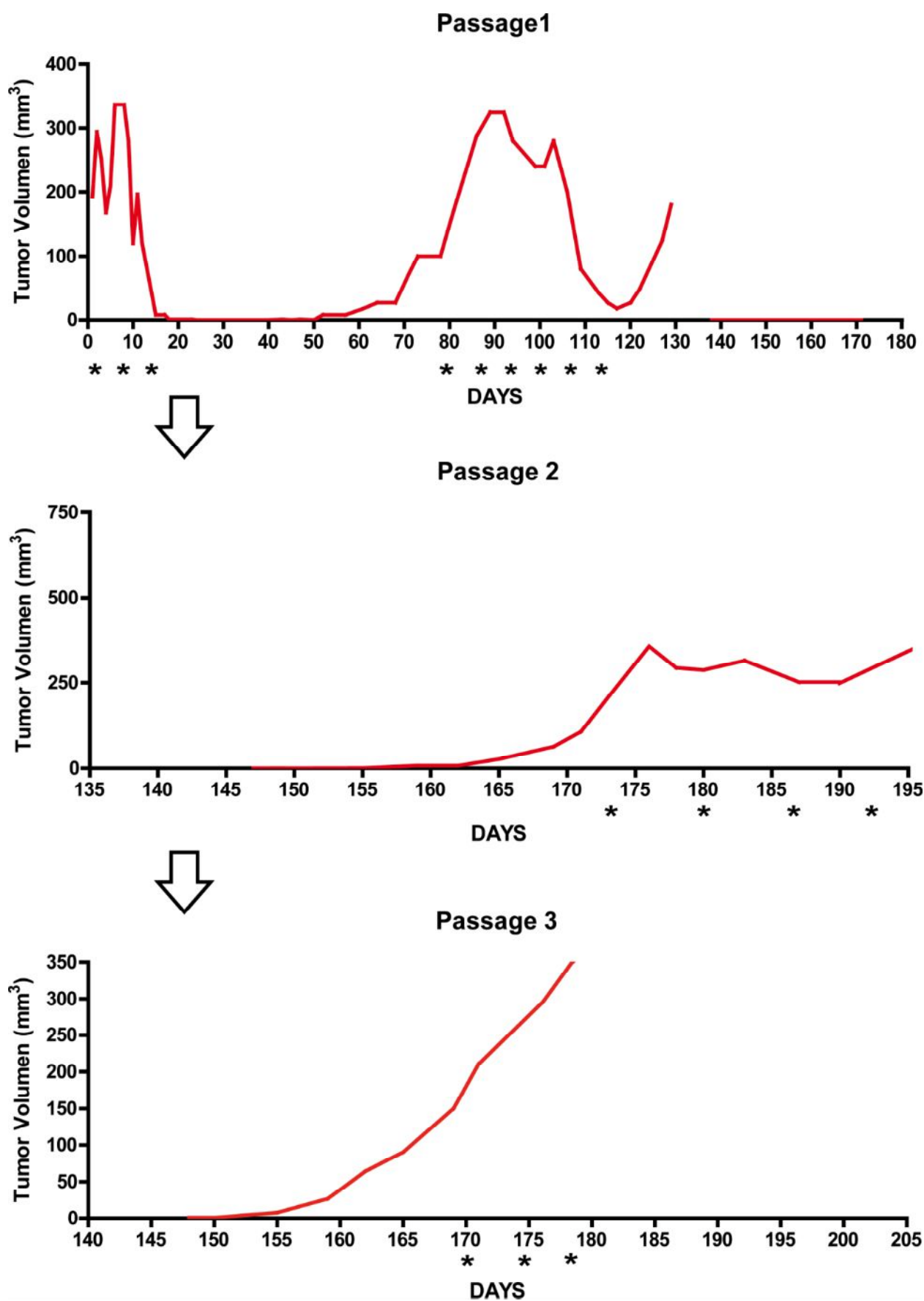
NHC	SOURCE	HUMANS								MOUSE					
		HISTOPATHOLOGY/CLINICAL DATA								IMPLANTED MG	SURVIVAL	STRAIN	OUTCOME (MG right/MG left)		
		HISTOLOGY	GRADE	%ER	%PG	Ki-67	HER-2	TREATED	Implanted rests				normal mammary	ADH/DCIS/tumor cells	palpable tumor
31	tumor piece	IDC	3	NEG	NEG	70	NEG	no	2 (1 mouse)	93	Nod/Scid	+/+	-/-	-/+ (DCIS)	-/-
32	tumor piece	IDC	2	95	80	5	NEG	yes (QT)	4 (2 mice)	272	Nod/Scid	+/+	-/-	-/-	-/-
									2nd mouse	n.d.	Nod/Scid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
33	tumor piece	IDC	2	100	80	15	NEG	no	2 (1 mouse)	250	Nod/Scid	n.e./+	n.e./-	-/+ (ADH; DCIS; atypia)	-/-
34	tumor piece	IDC	3	85	30	40	NEG	no	6 (3 mice)	86	Nod/Scid	+/+	-/-	-/-	-/-
									2nd mouse	140	Nod/Scid	n.e./+	n.e./+	n.e./-	-/-
									3rd mouse	224	Nod/Scid	+/+	-/-	-/+ (ADH)	-/-
35	tumor piece	IDC	3	90	80	25	NEG	no	2 (1 mouse)	197	Nod/Scid	+/+	-/+	-/-	-/-
36	tumor piece	IDC	3	90	40	60	NEG	no	2 (1 mouse)	202	Nod/Scid	n.e./+	n.e./-	n.e./-	-/-
37	tumor piece	IDC	2	95	95	15	NEG	yes (QT)	4 (2 mice)	152	Nod/Scid	+/+	-/-	-/-	-/-
									2nd mouse	232	Nod/Scid	n.d.	n.d.	n.d.	-/-
38	tumor piece	IDC	1	100	100	10	NEG	yes (HTP)	4 (2 mice)	344	Nod/Scid	n.e./n.e.	n.e./n.e.	n.e./n.e.	-/-
									2nd mouse	22	Nod/Scid	n.e./n.e.	n.e./n.e.	n.e./n.e.	dead
39	tumor piece	IDC	1	100	100	10	NEG	yes	2 (1 mouse)	162	Nod/Scid	+/+	-/-	-/-	-/-
40	tumor piece	CLI	2	90	90	14	NEG	no	2 (1 mouse)	97	Nude	n.e./n.e.	n.e./n.e.	n.e./n.e.	-/-
41	tumor piece	IDC	3	NEG	NEG	80	NEG	no	2 (1 mouse)	103	Nod/scid	n.e./+	n.e./+	n.e./+ (DCIS; IDC)	-/-
42	tumor piece	IDC BRCA1+	3	NEG	60	80	NEG		6 (3 mice)	193	Nod/scid	n.d.	n.d.	n.d.	-/-
									2nd mouse	200	Nod/scid	n.d.	n.d.	n.d.	-/-
									3rd mouse	228	Nod/scid	n.d.	n.d.	n.d.	-/-
43	tumor piece	IDC	2	95	95	15	NEG	no	2 (1 mouse)	33	Nude	+/+	-/-	-/-	dead
44	tumor piece	CD APOCR1	2	NEG	NEG	25	NEG	no	4 (2 mice)	36	Nude	+/+	-/+	-/+ (ADH; DCIS; calcification)	dead
									2nd mouse	55	Nude	+/+	-/+	-/+ (viable tumor cells)	dead
45	tumor piece	IDC	2	85	85	10	NEG	yes (QT)	2 (1 mouse)	56	Nude	n.e./+	n.e./+	n.e./-	dead
46	tumor piece	IDC	3	NEG	NEG	80	NEG	no	2 (1 mouse)	16	Nod/scid	+/+	-/-	+/+ (DCIS; IDC)	dead
47	tumor piece	IDC	3	90	80	30	NEG	no	2 (1 mouse)	5	Nod/scid	n.e./n.e.	n.e./n.e.	n.e./n.e.	dead
48	tumor piece	IDC	1	85	100	<5	NEG	yes (Radio tamoxi)	2 (1 mouse)	4	Nod/scid	fibroadenoma	n.d.	n.d.	dead
49	tumor piece	IDC	3	95	75	25	NEG		2 (1 mouse)	47	Nod/scid	+/+	-/+	-/+ (ADH)	dead
50	tumor piece	IDC	3	NEG	NEG	30	POS		2 (1 mouse)	60	Nude	n.d.	n.d.	n.d.	-/-
51	tumor piece	IDC	3	NEG	NEG	80	NEG	no	2 (1 mouse)	36	Nude	lymphoma	-/-	-/-	dead
52	tumor piece	IDC	2	90	60	5	NEG		2 (1 mouse)	6	Nod/Scid	n.d.	n.d.	n.d.	dead
53	tumor piece	IDC	3	NEG	NEG	80	NEG	no	2 (1 mouse)	24	Nod/Scid	+/+	-/+	-/+ (metaplastic tumor)	dead
54	tumor piece	IDC	3	90	90	15	NEG	no	2 (1 mouse)	n.d.	Nod/Scid	n.d.	n.d.	n.d.	dead
55	pleural effusion	IDC	3	NEG	NEG	60	NEG	yes (QT)	4 (2 mice)	111	Nod/Scid	+/+	-/-	+/+ (IDC)	tumor (IDC gr3)
									2nd mouse	216	Nude	+/+	-/-	-/+ (IDC)	tumor (IDC gr3)
56	pleural effusion	IDC	2	90	NEG	20	NEG	yes (HTP)	4 (2 mice)	n.d.	Nude	n.d.	n.d.	n.d.	-/-
									2nd mouse	660	Nude	n.d.	n.d.	n.d.	-/-
57	pleural effusion	IDC	3	NEG	NEG	15	NEG	yes (QT)	6 (3 mice)	372	Nod/Scid	tumor	n.d.	n.d.	tumor (IDC gr3)
									2nd mouse	519	Nude	tumor	n.d.	n.d.	tumor (IDC gr3)
									3rd mouse	169	Nod/Scid	tumor	n.d.	n.d.	tumor (IDC gr3)
58	pleural effusion	IDC					no data		4 (2 mice)	n.d.	Nude	n.d.	n.d.	n.d.	-/-
									2nd mouse	388	Nude	n.d.	n.d.	n.d.	-/-
59	pleural effusion	IDC	3	<10	<10	15	not evaluable	yes	6 (3 mice)	307	Scid/beige	n.d.	n.d.	n.d.	-/-
									2nd mouse	449	Nude	n.d.	n.d.	n.d.	-/-
									3rd mouse	629	Nude	n.d.	n.d.	n.d.	-/-
60	pleural effusion	IDC	3	90	70		+/-	yes (QT, HTP)	2(1 mouse)	371	Nude	tumor	n.d.	n.d.	tumor (IDC gr3)
61	pleural effusion	IDC	no data	NEG	NEG	40	NEG	yes (QT)	2(1 mouse)	189	Scid/beige	n.d.	n.d.	n.d.	-/-

SUPPLEMENTAL FIGURES**Supplemental Figure 1**

Supplemental Figure 1. Scheme of docetaxel treatments.

One tumor was implanted in both mammary inguinal glands of 8 recipient NOD/Scid females. Tumor bearing animals were individually identified and when tumors reached 200mm³ (L*I*H) mice were treated with docetaxel (20 mg/kg i.p.) once a week as indicated. If the tumor volume decreases below 30mm³ treatment was interrupted and re-initiated when tumor volume increased again over 200mm³. After 8 to 9 doses, mice were sacrificed tumors excised and re-implanted in mice (second passage) to repeat the process until tumors become resistant.

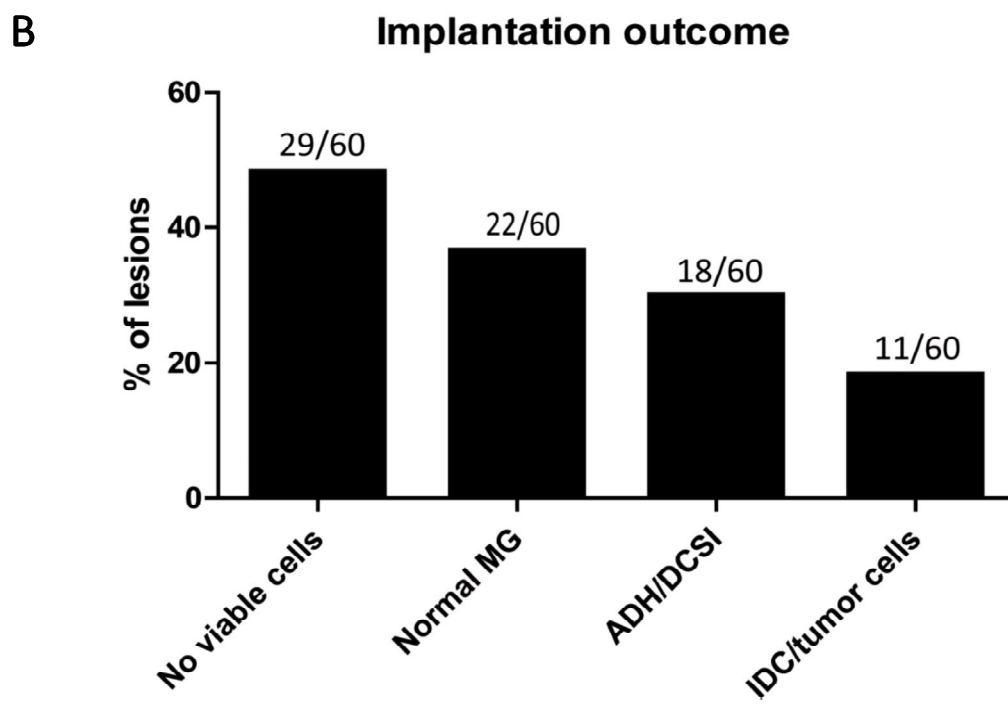
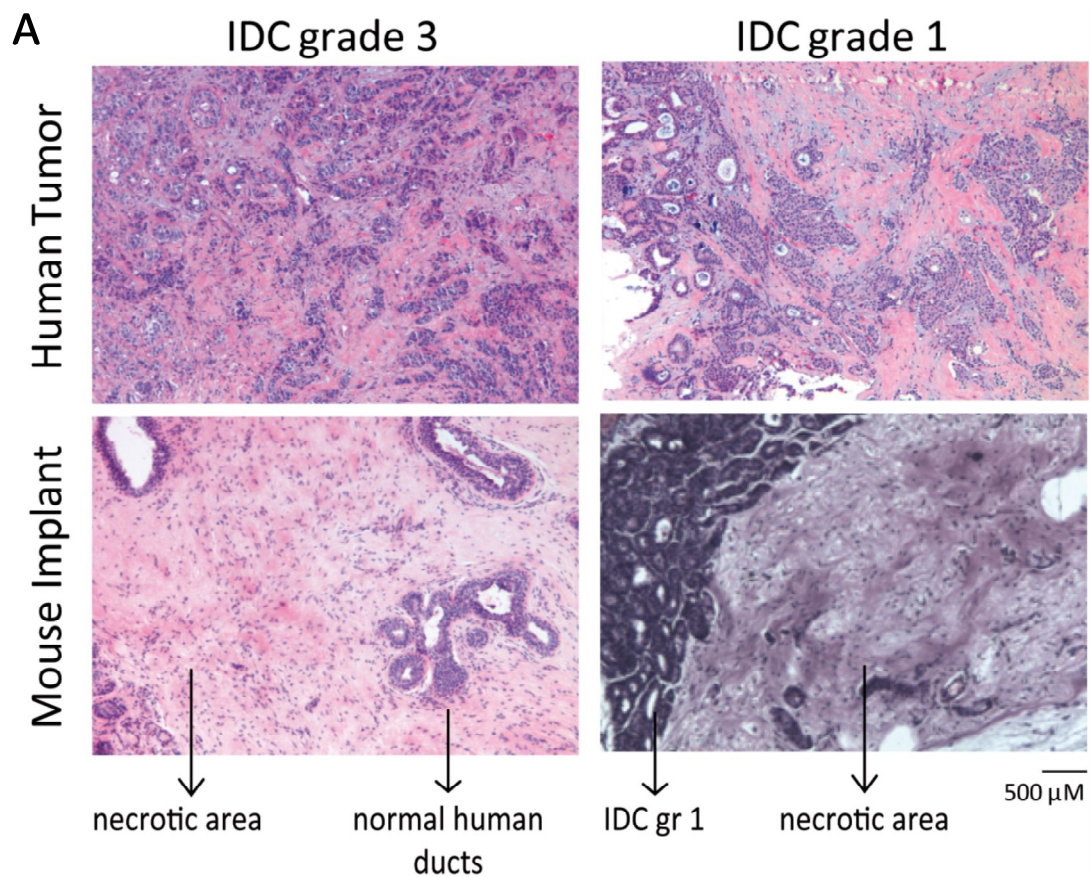
Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 2. In vivo acquisition of resistance.

Kinetics of one representative tumor of model A during docetaxel treatment as explained in Supplementary Figure 1. Asterisks indicate docetaxel treatment.

Supplemental Figure 3

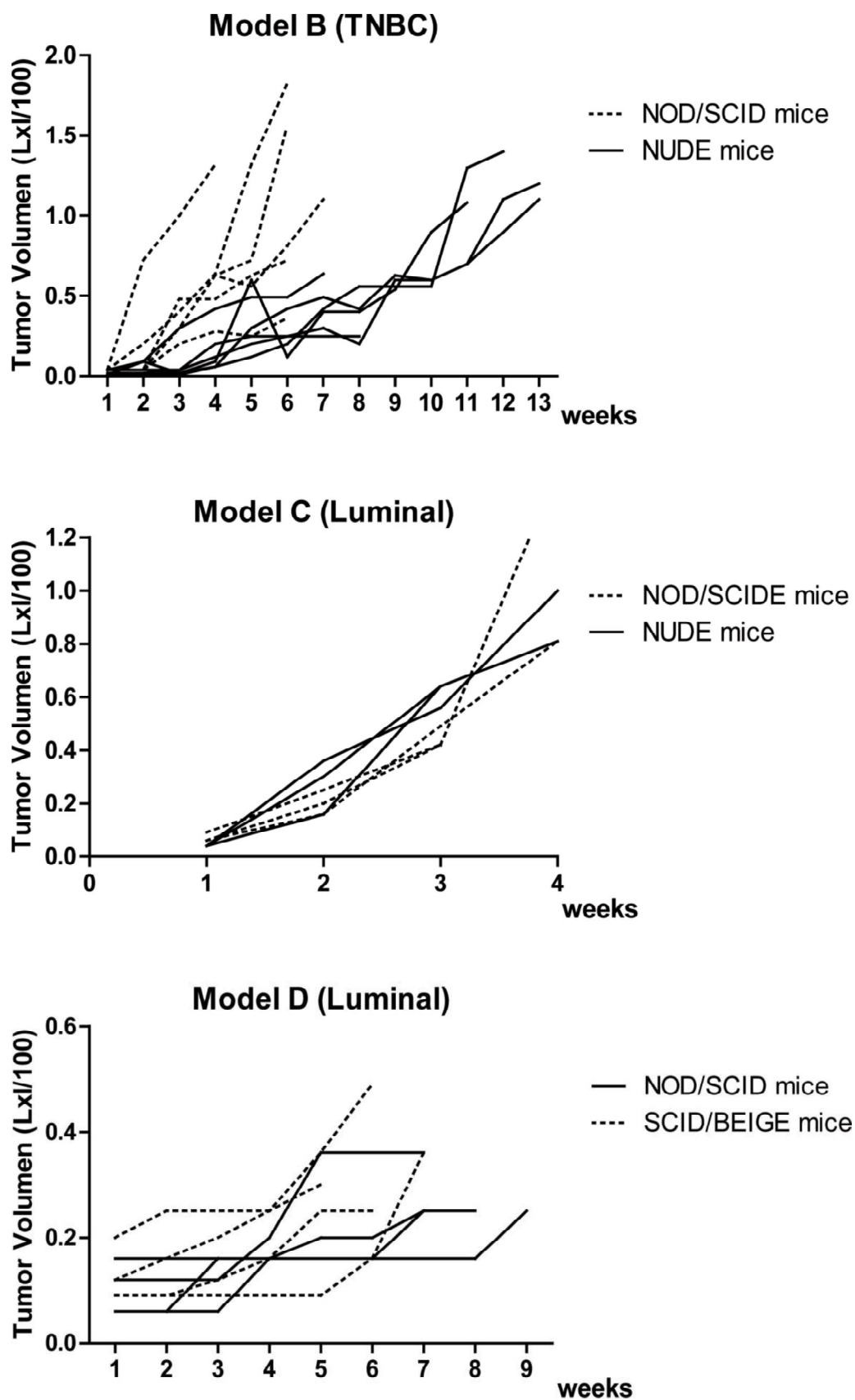


Supplemental Figure 3. Viable human normal epithelial structures, ADH and DCIS are detected in implanted mouse glands despite absence of tumor growth

A.- Representative images of H&E of original human tumors IDC (invasive ductal carcinoma) and the mouse mammary glands where they were implanted. No palpable lesions were detected in these mice and accordingly extensive necrotic areas were observed. However, viable human epithelial structures, mainly normal ducts, ADH, DCIS and occasionally IDC or viable tumor cells were detected. Note that the morphology of IDC grade 1 is maintained in the mouse implant.

B.- Percentage of mouse mammary glands showing human structures but not tumor growth. Quantification of indicated human structures in mouse mammary glands where no palpable lesions were detected is represented. MG= mammary glands, ADH: atypical ductal hyperplasia; DCIS: ductal carcinoma in situ; IDC: Invasive ductal carcinoma. Only mice surviving for at least 60 days after tumor implantation were considered. Total number of MG analyzed is indicated (n).

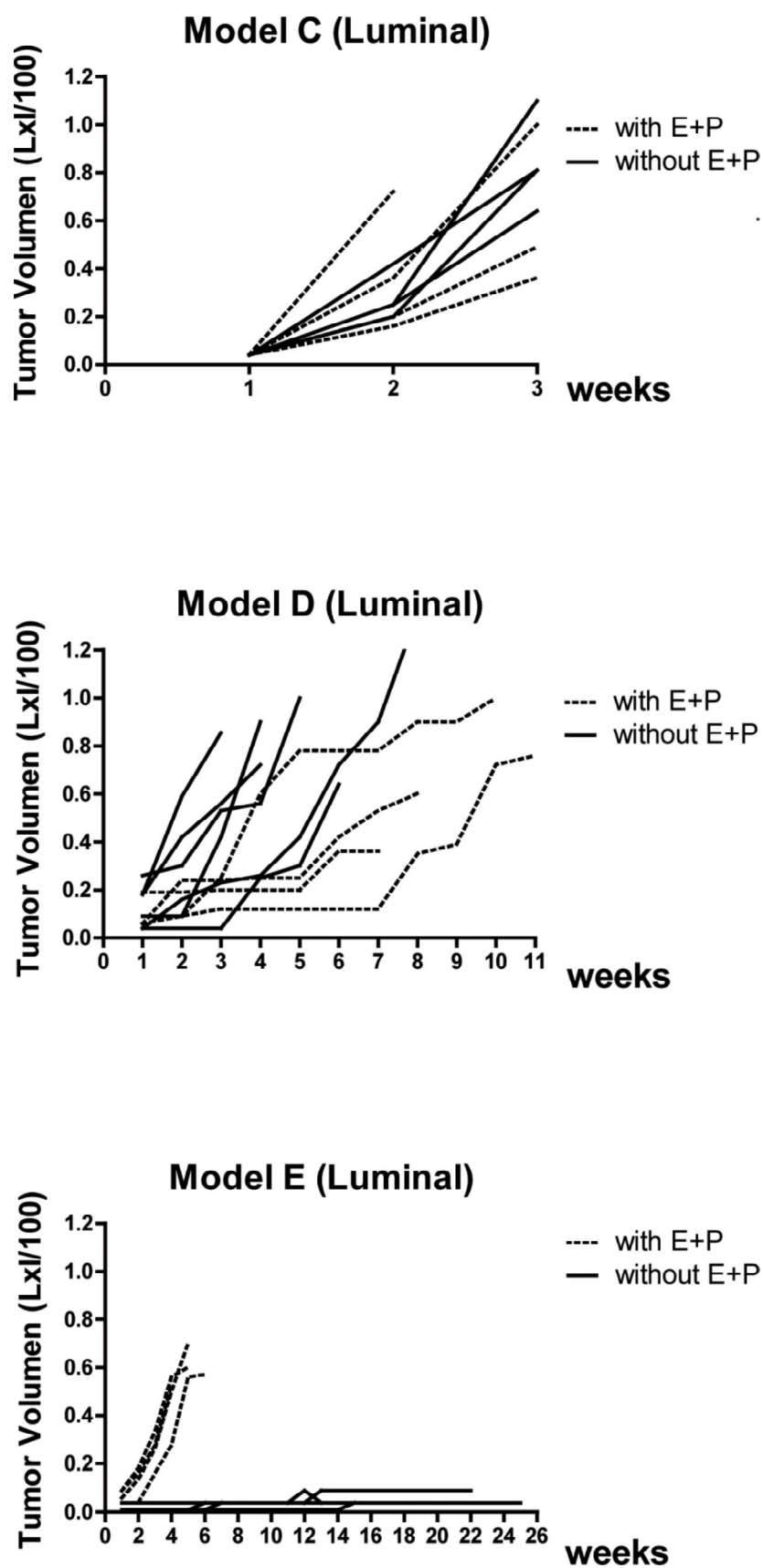
Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 4. Tumor growth in different immunodeficient hosts

Tumor growth of model B and C tumors implanted in NOD/Scid versus Nude mice or model D tumors implanted into NOD/Scid versus Scid/Beige. Tumor volume calculated as $L \times l$ (mm x mm)/100 versus time (weeks) is shown. Each line represents one tumor. Week 1 is the time at which palpable tumor was detected.

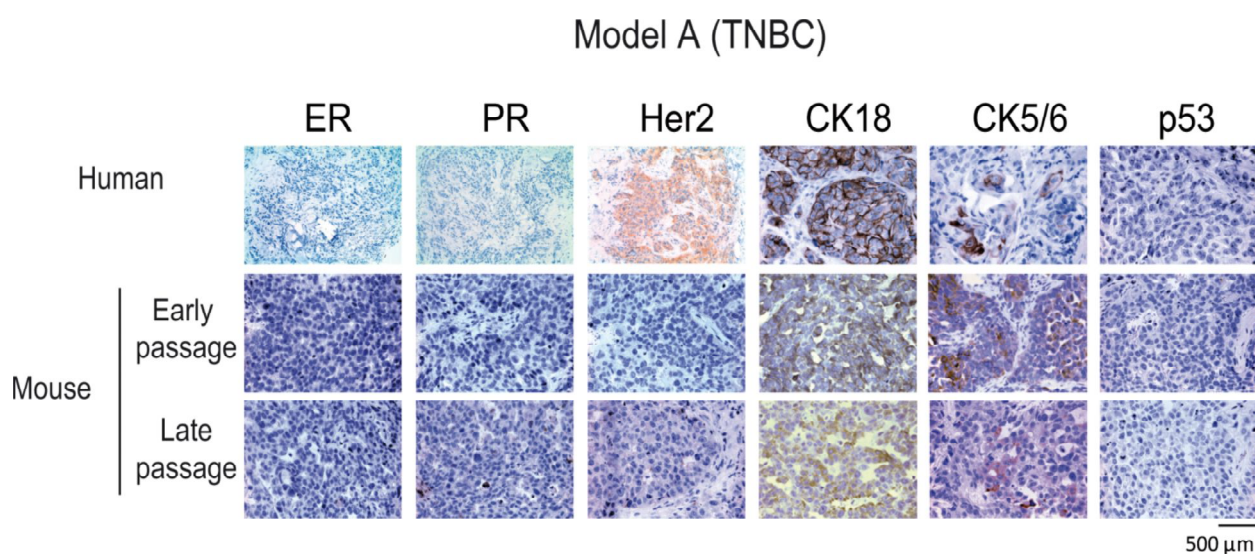
Supplemental Figure 5



Supplemental Figure 5. Hormone influence in tumor growth

Tumor growth of Model C, Model D and Model E tumors implanted in mice with or without exogenous 17β -estradiol and progesterone pellets (E+P) (Tumor volume calculated as $L \times l$ (mm x mm)/100 versus time (weeks) is shown. Each line represents one tumor. Week 1 is the time at which palpable tumor was detected.

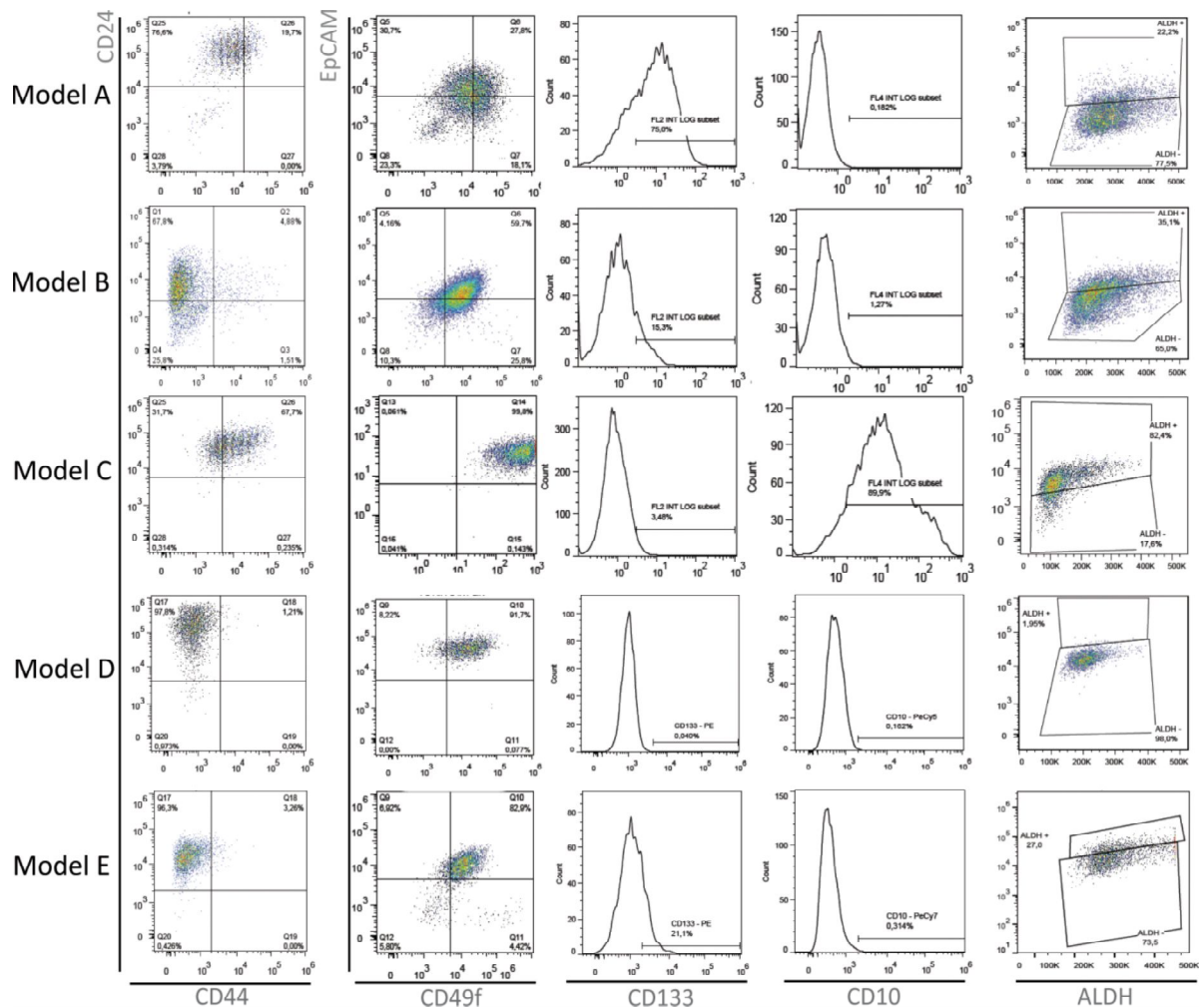
Supplemental Figure 6



Supplemental Figure 6. Analysis of clinical markers by immunohistochemistry (IHC)

Representative images of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), HER2, cytokeratins (CK18, CK5/6) and p53 protein expression in human tumor of origin and mouse grafts at early (1st to 2nd) and late passages (4th to 8th) in Model A are shown.

Supplemental Figure 7

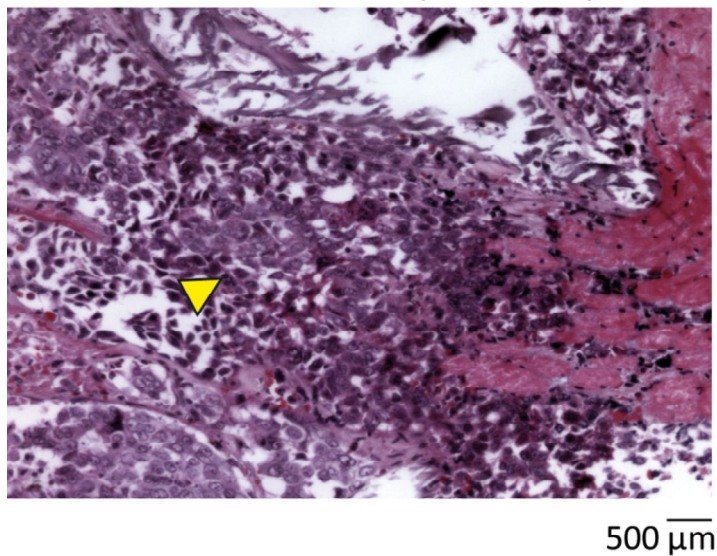


Supplemental Figure 7. Expression of surface markers in tumors models by flow cytometry

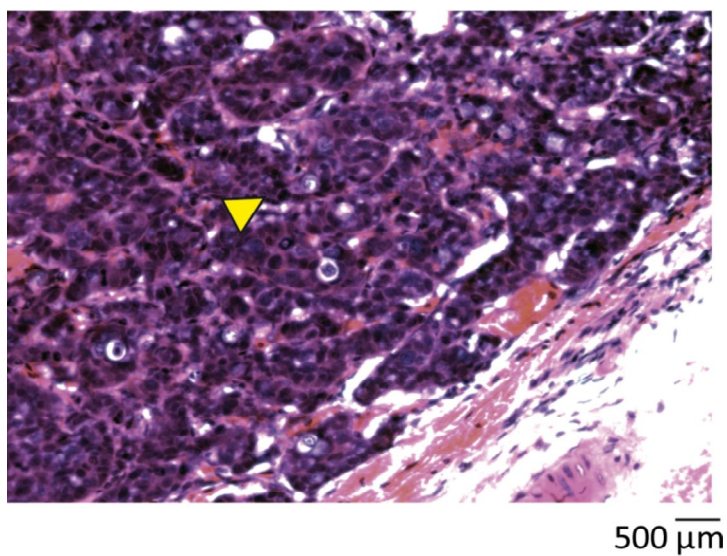
(Right to Left) Representative dot-plot and histograms of indicated markers in tumor models: cells analyzed were firstly gated as DAPI negatives (live cells) and H2Kd- (human cells). The axes were established depending on the values of cells populations without staining or ALDH negative control.

Supplemental Figure 8

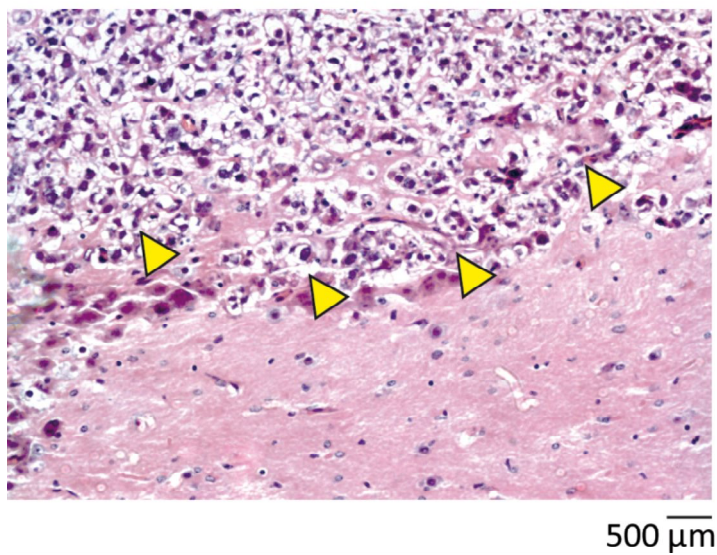
Bone metastasis (Model C)



Kidney metastasis (Model C)



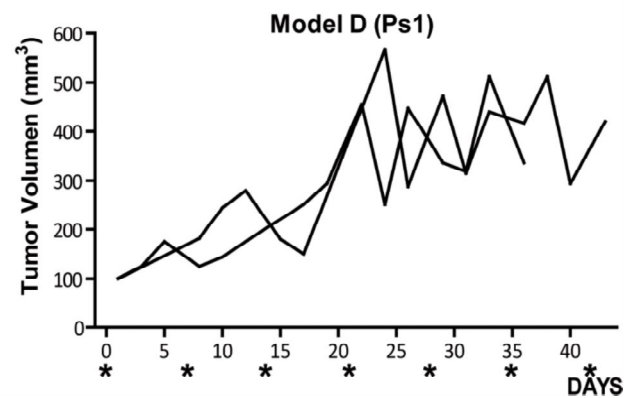
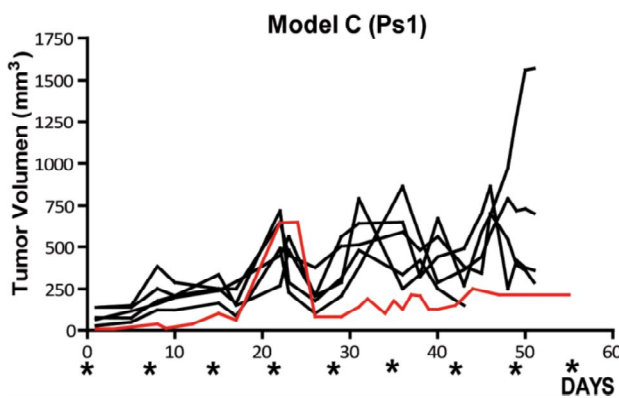
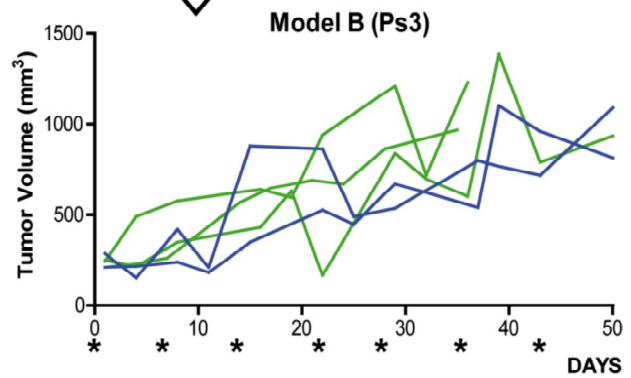
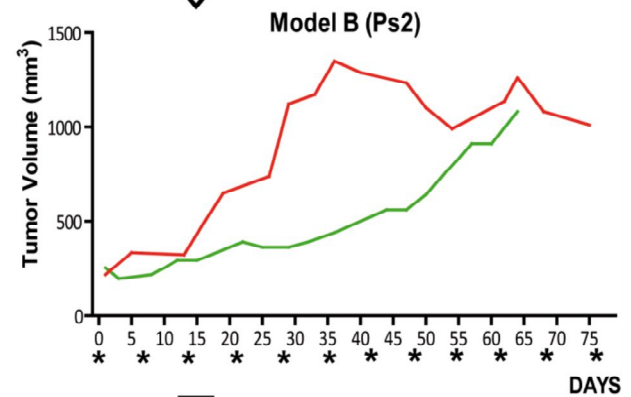
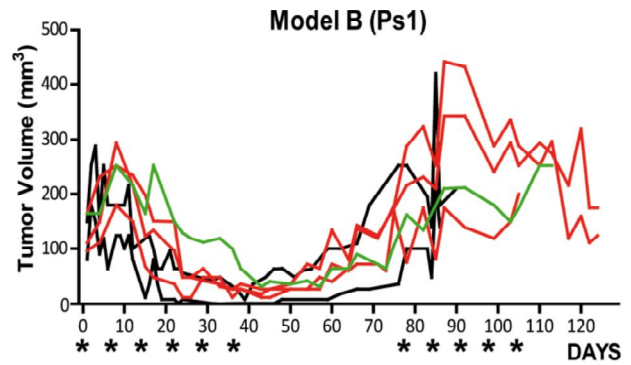
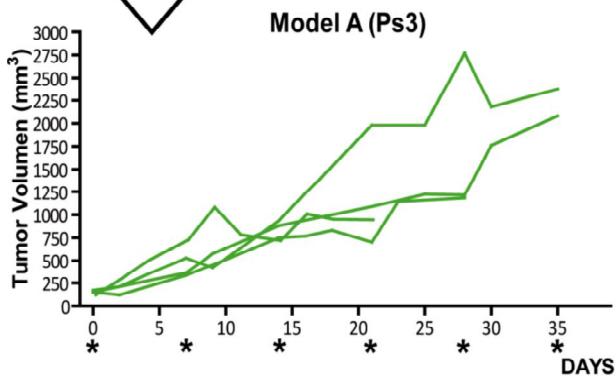
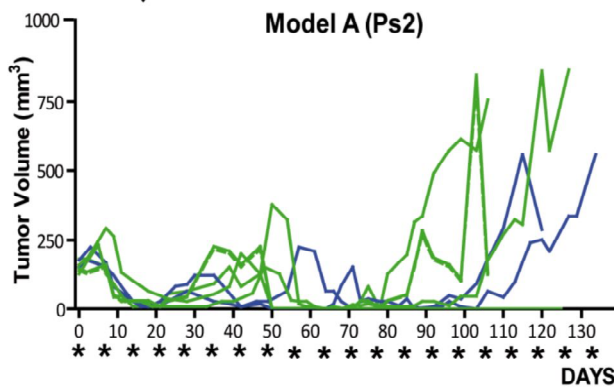
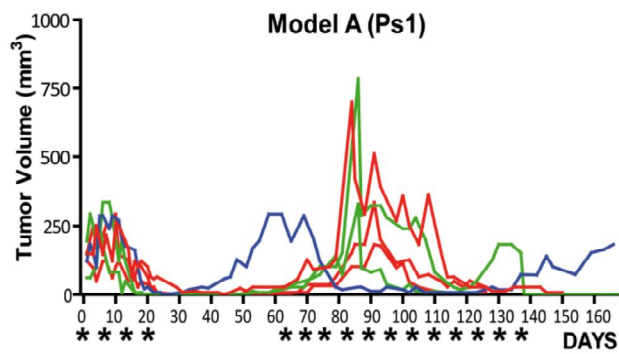
Brain metastasis (Model B)



Supplemental Figure 8. Metastasis pattern of human tumors resemble metastasis pattern in patients.

Representative images of H&E of bone (jaw), kidney and brain metastases from humans tumors growing in mice. Yellow arrows indicate tumor cells.

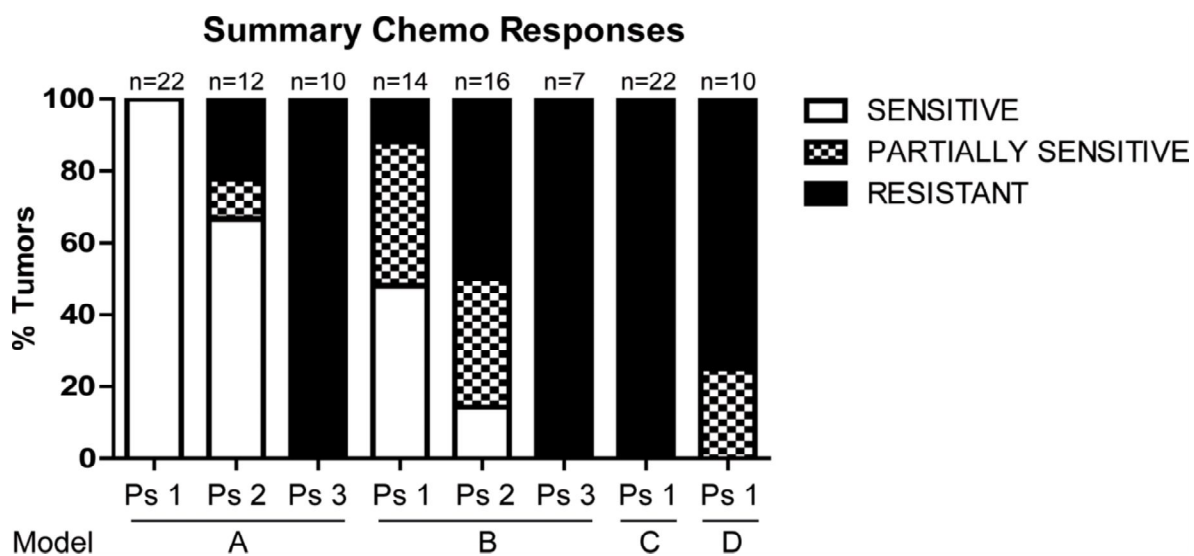
Supplemental Figure 9



Supplemental Figure 9. Tumor size at the beginning of docetaxel treatment does not alter growth response.

Kinetics of tumor growth during docetaxel treatment. Tumor volume in mm^3 (length x width x height) is shown over time (in days). Tumor bearing animals were treated with docetaxel (20 mg/kg i.p.) once a week as indicated by the asterisks. Each line represents one tumor and each colour represents the origin of the tumor. Tumors that were smaller than 200mm^3 when treatment started are represented, and day 0 is the first day of treatment. Yellow arrows indicate metastatic cells.

Supplemental Figure 10



Supplemental Figure 10. Different responses to Docetaxel were showed by different tumor models.

Percentage of sensitive, partially sensitive or resistant tumors of each model to Docetaxel. Total number of tumors (n) and passage are indicated.

DISCUSIÓN GENERAL

Este proyecto de tesis doctoral se ha centrado en: (1) el estudio de la función de la vía de señalización de RANK y RANKL en el desarrollo y progresión del cáncer de mama en MECs humanas; (2) el análisis de la expresión de RANK en muestras clínicas de tumores humanos así como el análisis de variantes génicas (SNPs) de RANK que influyan en la incidencia del cáncer de mama en humanos; (3) la generación y caracterización de ortoxenopacientes de cáncer de mama en ratón para su empleo como herramienta en la identificación de nuevas dianas terapéuticas y mecanismos de resistencia drogas empleadas actualmente en clínica y en ensayos pre-clínicos para el desarrollo de nuevas drogas contra el cáncer de mama.

FUNCIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE RANK Y RANKL EN CÁNCER DE MAMA HUMANO

La implicación de vía de señalización de RANK-RANKL en desarrollo de la glándula mamaria (Fata JE 2000, Gonzalez-Suarez E 2007, Fernandez-Valdivia R 2008) y cáncer de mama (Gonzalez-Suarez E 2010, Schramek D 2010) ha sido bien caracterizada en modelos murinos durante los últimos años. Sin embargo, el papel de la vía de señalización de RANK y RANKL en humanos no está tan bien caracterizado. Se había descrito que el tratamiento con RANKL induce cambios en el citoesqueleto y migración en líneas epiteliales de mama tumorales y no tumorales que expresan RANK (Jones DH 2006). Además, la inhibición de la vía de señalización de RANK y RANKL *in vivo* mediante el tratamiento con OPG reduce la incidencia de metástasis óseas en modelos establecidos de melanoma, sugiriendo que la vía de señalización de RANK y RANKL está implicada en la inducción de la migración celular (Jones DH 2006). Sin embargo, el papel exacto de la vía de señalización de RANK y RANKL en la iniciación y desarrollo de tumores de mama humano y el mecanismo o mecanismos por los cuales actuaría eran desconocidos.

RANK y activación constitutiva de las vías de NF- κ B, MAPKs y Pi3K

Nuestros datos ponen de manifiesto que la sobre-expresión del receptor RANK en células epiteliales de mama humanas induce la activación constitutiva e independiente de ligando de las vías de señalización de NF- κ B (canónica y no canónica), p38, ERK y Pi3K las cuales, como se ha descrito en la introducción, están relacionadas con el proceso de tumorigénesis en mama. La activación de estas vías de señalización por parte de RANK y RANKL ya había sido observada en osteoclastos (Boyle WJ 2003). La capacidad de inducir señalización intracelular por el receptor en ausencia de ligando se ha descrito para otros miembros de la familia de receptores del TNFR como TNF α , CD40, CD27, Trail, Fas, Fn14, CD95 o Apo-1 (Chan FK 2000). La unión de ligando induce la homotrimerización del receptor necesaria para la señalización pero además, las moléculas de receptor pueden unirse entre sí a través de un dominio en su región N-terminal (región PLAD) e inducir activación de las vías citoplasmáticas. Además esta trimerización en ausencia de receptor puede producirse entre diferentes moléculas de receptor pertenecientes a esta familia (heterotrimerización) (Chan 2000). Esta promiscuidad a la hora de trimerizar de en ausencia de ligando ha hecho que los receptores, y no solo los ligandos, del TNFRSF sean considerados como potenciales dianas terapéuticas (Anderson D. M 1997, Chan 2007). En nuestro laboratorio hemos sido los primeros en mostrar que RANK, como miembro de la TNFSFR, puede dar señalización independiente de ligando, aunque es preciso confirmar si esto también ocurre en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, puede existir la posibilidad de que en enfermedades en las que se produce un aumento de la señalización a través de esta vía con altos niveles de expresión del receptor, la inhibición de RANKL mediante el tratamiento con Denosumab solamente inhiba la señalización dependiente de ligando pero no la mediada únicamente por el receptor. Por ello, si estos datos son confirmados, el desarrollo de fármacos que bloqueen a RANK puede suponer una forma mucho más efectiva de abordar este tipo de enfermedades.

RANK y Transición epitelio mesénquima (EMT)

Nuestros resultados muestran que la sobre-expresión de RANK en células epiteliales de mama MCF10A (inmortalizadas pero no transformadas) induce la adquisición de un fenotipo EMT. Existen una gran cantidad de artículos publicados donde se relaciona la adquisición de un fenotipo EMT con la progresión tumoral ya que las células cancerígenas del tumor primario que adquieren un fenotipo EMT serían capaces de extravasarse al torrente sanguíneo y diseminarse por el cuerpo para formar metástasis en órganos distales (Thiery JP 2006, Raimondi C 2011 , Entenberg D 2013 , Yu M 2013). Observamos que las células FL-RANK MCF10A tienen una mayor capacidad migratoria que las células control en ensayos de “wound-healing” incluso cuando las células control son tratadas con un factor inductor de la migración celular como el EGF. Además, el tratamiento con RANKL acentúa la capacidad de migración de las células FL-RANK MCF10A. También los resultados extraídos de los experimentos con células tumorales corroboran esta hipótesis, ya que algunas de las líneas celulares tumorales con disfuncionalidad en la proteína BRCA1, especialmente la línea Mda-Mb-436, al sobre-expresar RANK muestran un fenotipo EMT más acusado que las controles y una mayor capacidad de formar metástasis *in vivo* mientras que en otras líneas celulares con mutaciones en BRCA1 (HCC1937) o con metilaciones en su promotor que impiden su expresión (UACC3199) la sobre-expresión de RANK no indujo la adquisición de un fenotipo EMT.

Nuestros datos indican que el fenotipo EMT inducido en células MCF10A por la sobre-expresión de RANK es estable, ya que se produce un aumento de la expresión de marcadores y factores de transcripción de EMT, no habiéndose observado una reversión con el tiempo. Existen otros factores descritos, como el estrógeno, que induce un fenotipo EMT pero de forma reversible (Planas-Silva MD 2007). Este mantenimiento del fenotipo EMT también se observa en varias líneas celulares de cáncer de mama aislada a partir de líquido pleural (Whitehead RH 1983), así como en algunos tipos de tumores primarios los cuales son poco diferenciados y que muestran un fenotipo EMT (Jones J 2014).

Sin embargo, la idea de que las células que adquieren un fenotipo EMT son las responsables de formar metástasis en órganos distales todavía no ha sido totalmente aceptada debido a que las células procedentes de metástasis muestran un fenotipo epitelial (Ledford 2011). Existe la posibilidad de que la plasticidad celular este regulada por el microambiente que rodea al tumor (Hugo H 2007). Así, en el lugar del tumor primario las células tumorales se ven bajo la influencia de señales inductoras de EMT que les permiten migrar y una vez han abandonado este ambiente, la ausencia de estos estímulos o la presencia de otros nuevos inductores de MET una vez alcanzado el órgano diana, les haga re-diferenciar a células con fenotipo epitelial.

Vía de señalización de TGF β

La vía de señalización de TGF β se considera el principal inductor y mediador del proceso de EMT y está relacionada con desarrollo tumoral y metástasis (Massague 2008; Xu J 2009). Nuestros datos indican que en células MCF10A FL-RANK hay un aumento de la expresión de los ligandos de TGF β respecto a células control, que se acentúa con el tiempo siguiendo un patrón parecido al de los marcadores y TFs de EMT, sugiriendo que TGF β pueda mediar el fenotipo de EMT inducido por RANK en estas células.

El TGF β producido por las células es secretado en una forma inactiva que necesita ser procesada por diferentes enzimas (colagenasas y metaloproteasas) para poder ser activo y funcional (Derynck R 2007). Como se ha sido descrito previamente, durante el proceso de EMT también se produce un aumento de la expresión de metaloproteasas que pueden estar implicadas en este procesamiento del TGF β producido por las células que sobre-expresan RANK (Hugo H 2007). De hecho, el TGF β producido por células FL-RANK es activo ya que estas células muestran mayores niveles de fosforilación de Smad3 que las células control. Además, el bloqueo de la vía de TGF β produce una disminución de marcadores y factores de transcripción de EMT, demostrando no solo que la vía de TGF β es funcional sino que media el fenotipo EMT inducido por RANK en células MCF10A. Se ha descrito que tanto células epiteliales no tumorogénicas

(Zeuthen LH 2008) como células de un tumor (Derynck R 2007; Luo YP 2010) u otros tipos celulares (Ding Y 2014) pueden producir TGF β . Además, es importante destacar que, en un contexto fisiológico, el TGF β inducido por RANK en células del epitelio mamario puede ejercer un efecto sobre células del estroma, las cuales también participan en la iniciación y progresión tumoral (Massague 2008). Todo ello puede ayudar a la generación de un microambiente que promueve la inducción de un fenotipo EMT y a aumentar la capacidad migratoria de las células tumorales y por tanto la capacidad metastática del tumor. Aparte de la inducción de EMT, se ha descrito que TGF β puede inducir la expresión de sus propios ligandos ya que los genes de éstos contienen sitios de unión a proteínas Smad (SBE). Así TGF β puede controlar su propia activación de una forma autocrina (Mulder 2000). Nuestros resultados demuestran que la inhibición de la vía de TGF β disminuye la producción de sus ligandos en células FL-RANK. Por tanto, se puede concluir que el TGF β producido por la sobre-expresión de RANK en células MCF10A controla la expresión de sus ligandos produciendo un bucle positivo autocrino en el que cada vez hay una mayor producción de TGF β y una mayor inducción de EMT. Esta conclusión concuerda con el aumento observado con el tiempo en la expresión de marcadores y TFs de EMT en células FL-RANK MCF10A. Además el tratamiento de células MCF10A FL-RANK con TGF β exógeno aumenta la expresión de RANK, lo cual reforzaría el bucle de regulación autocrino positivo establecido en este modelo celular (Patsialou A 2009 , Gregory PA 2011, Xu Q 2012, Larocca C 2013).

A nivel molecular, el TGF β producido por células FL-RANK media la inducción del proceso de EMT mediante la activación de su vía de señalización canónica, concretamente mediante el aumento de la fosforilación de Smad3. Datos publicados recientemente describen que en cáncer de mama el oncogén FOXM1 es capaz de inducir metástasis a través de la activación de Smad3, pero no de Smad2, de una forma dependiente de TGF β (Xue J 2014). Puesto que los inhibidores de TGF β que hemos utilizado interfieren no solo con la fosforilación de Smad3 sino también de Smad2, no podemos descartar que la señalización a través de Smad2 contribuya al fenotipo EMT inducido por RANK en las células MCF10A. Sin embargo, según nuestros resultados no

se observa un aumento en fosfo-Smad2 en células que sobre-expresan RANK en comparación con las controles. Se ha descrito que TGF β 1 induce Smurf2, una ubiquitina E3 ligasa, que induce la degradación de Smad2 (Meng XM 2013) y que la activación de la vía no canónica de TGF β puede inhibir la activación de la vía canónica (Mulder 2000), lo cual podría explicar la ausencia de variaciones en los niveles de fosfo-Smad2.

TGF β puede también mediar sus efectos a través de su vía no canónica o mediante la activación de la vía de NF- κ B. Sin embargo, no se han detectado cambios en la vía de ERK ni p38 tras la activación o la inhibición de TGF β en las células MCF10A FL-RANK y el único dato preliminar obtenido respecto a la vía de NF- κ B es que se produce un aumento en los niveles de I κ B α total al tratar a las células con inhibidores de TGF β . Esto podría indicar que la inhibición de la vía canónica de TGF β esté induciendo una mayor activación de la vía de NF- κ B, quizá debido a la inducción de la expresión de RANK observada. No podemos descartar la implicación de la vía no canónica de TGF β en células FL-RANK ya que tanto TGF β como RANK son capaces de activar las mismas vías de señalización (MAPKs, NF- κ B y Pi3K). Así, la disminución en la activación de MAPKs, NF- κ B y Pi3K inducido por el bloqueo o sobre-activación de la vía de TGF β podría ser compensado por una aumento/disminución de su activación por parte de RANK. También cabe la posibilidad de que las variaciones en los niveles de fosforilación de los intermediarios de la vía no canónica inducida por TGF β sean relativamente pequeñas, ya que se ha descrito que en células epiteliales no transformadas la activación de ERK por TGF β es solamente de unas 2-3 veces pero es suficiente para desencadenar eventos posteriores (Ferrelli 1996). En éste caso es difícil discriminar qué porcentaje de activación de cada vía es debido a una señalización por RANK o por TGF β , impidiendo que se descarte la vía no canónica como mediador de los efectos de TGF β inducido por RANK en células FL-RANK. En futuros experimentos se pretende aclarar la relación entre las vías canónicas y no canónicas de TGF β .

Vías de señalización de NF- κ B, MAPKs and Pi3K/Akt

Nuestros datos indican que, las vías de señalización de NF- κ B, p38, ERK y Pi3K inducidas por la sobre-expresión de RANK contribuyen al fenotipo EMT, lo cual concuerda con otros resultados publicados anteriormente en lo que se relaciona las vías de señalización de NF- κ B, MAPKs y Pi3K con EMT (Huber MA 2004, Li NY 2013 , Sobolik T 2014).

No existen datos en la literatura que indiquen que la vía de señalización de RANK induzca activación de la vía de TGF β . Por lo tanto, el aumento de la producción de los ligandos de TGF β debe estar mediado por alguna o algunas de las vías de señalización que sí son activadas por RANK. Ensayos independientes de inhibición de NF- κ B, p38, ERK y Pi3K indican que la producción de los ligandos de TGF β se ve afectada por el bloqueo de NF- κ B, p38 y ERK pero no por el bloqueo de Pi3K. La vía de señalización de p38 y ERK (y de las MAPKs en general) tienen como último mediador de sus efectos al factor de transcripción AP-1 y ha sido descrito que el promotor de los genes de TGF β tiene sitios de unión a AP-1 lo cual permite el control transcripcional de estos genes (Mulder 2000). Por otra parte, el hecho de que la vía de señalización de Pi3K no regule los niveles de ligandos de TGF β en este modelo celular indica que Pi3K contribuye al fenotipo EMT por un mecanismo independiente de TGF β .

RANK y Stemness

Se ha descrito que la activación de EMT en células cancerosas está ligada a la adquisición de un fenotipo de célula madre convirtiéndose en células madre cancerosas responsables de la progresión tumoral (Mani SA 2008). En esta tesis se ha descrito que células MCF10A que sobre-expresan RANK se ven sometidas a un proceso de EMT y además adquieren un fenotipo de célula madre caracterizado por un aumento del porcentaje de la población CD44⁺CD24^{-/low} y un aumento de la expresión de factores de transcripción relacionados con células madre embrionarias (Sox2, Oct4 y Nanog). Además, al ser inyectadas en glándula mamaria de animales

inmunodeprimidos son capaces de formar estructuras similares a ductos mamarios demostrando su funcionalidad. Estos datos coinciden con los publicados recientemente por nuestro laboratorio según los cuales la sobre-expresión de RANK en células mamarias de ratones MMTV-RANK aumenta el porcentaje de células madre (MaSC) y células progenitoras en la glándula mamaria (Pellegrini P 2013) y con otros trabajos que demuestran que la vía de RANKL media la expansión del compartimento de MaSC inducido por progesterona (Asselin-Labat M. L 2010, Joshi P. A 2010, Schramek D 2010).

La sobre-expresión de RANK, resulta en una pérdida de la población $CD24^+$ que se convierte en $CD24^{low}$, sin embargo no induce cambios notables en CD44 en ninguna de las células analizadas, que también se ha considerado también marcador de stemness, y células madre tumorales en cáncer de mama (de Beça FF 2013).

La expansión de la población $CD44^+CD24^{low}$ observada tras la sobre-expresión de RANK en células MCF10A es muy acusada durante los primeros pases cuando los niveles de marcadores de EMT son muy bajos; posteriormente la población $CD44^+CD24^{low}$ se pierde paulatinamente mientras que los marcadores de EMT aumentan su expresión. Estos datos demuestran que el fenotipo de EMT y stemness inducido por RANK son procesos independientes tal y como observamos previamente en células tumorales deficientes del gen BRCA1, donde la sobre-expresión de RANK produce un aumento del porcentaje de la población $CD44^+CD24^{low}$, pero ni las células UACC3199 ni las HCC1937 sufren variaciones en los niveles de marcadores de EMT. La disociación observada entre el fenotipo EMT y stem podría indicar una incompatibilidad del fenotipo progenitor con el fenotipo EMT tal y como se describe en (Celià-Terrassa T 2012) donde se relacionan las propiedades de SC con un fenotipo epitelial mientras que la capacidad de invasión se ha relacionado con un fenotipo mesenquimal. Las variaciones observadas entre la expresión de marcadores y TF de EMT y $CD44^+CD24^{low}$ podrían indicar que ambos procesos se inhiben entre sí, ya que los marcadores y TFs de EMT aumentan a la par que disminuyen los de Stemness. Sin embargo, estos datos no son suficientes para confirmar esta idea ya que este cambio puede deberse a que: el proceso de EMT pueda mantenerse con el tiempo a través de

la regulación autocrina de TGF β mientras que la población CD44⁺CD24^{-/low} diferencia a células diferenciadas CD44⁺CD24⁺, o simplemente a que las células diferenciadas tienen una tasa proliferativa mayor que las SC y acaban colonizando el cultivo. Para llegar a una conclusión definitiva habrá que realizar más experimentos al respecto.

Dado que la vía de señalización de TGF β es la principal mediadora del proceso de EMT y se ha relacionado la inducción de EMT con la inducción de Stemness, algunos artículos describen que TGF β también está implicado en la inducción de Stemness (Sakaki-Yumoto M 2013). Sin embargo, nuestros resultados muestran que ni la inhibición ni la activación de la vía de señalización de TGF β en células FL-RANK afecta al porcentaje de células CD44⁺CD24^{-/low}, demostrando que TGF β no contribuye ni positiva ni negativamente al fenotipo stem inducido por RANK. Aunque se observan pequeñas variaciones en el porcentaje de CD44⁺CD24^{-/low} en presencia de inhibidores de p38 y NF- κ B éstas pueden ser debidas a fluctuaciones propias del cultivo. En contraste, en ausencia de activación de ERK, la población CD44⁺CD24^{-/low} desaparece completamente demostrando que el fenotipo stem es mediado exclusivamente por la vía de ERK, lo cual puede tener una gran relevancia en el desarrollo de fármacos dirigidos contra las CSCs. La implicación de ERK en Stemness ha sido descrita recientemente en colon. La prolactina, factor mitogénico asociado con riesgo de cáncer de mama, induce la activación de la vía de señalización de Jak2/Stat3 y Ras/Raf/ERK en células tumorales de cáncer de colon. Fosfo-Stat3 y fosfo-ERK1/2 inducen la expresión de JAG1 y la activación de la vía de Notch, capaz de inducir un aumento de las características de stemness como el número de colonias o la expresión de ALD1 *in vitro* (Neradugomma NK 2013).

En base a nuestros resultados podemos concluir que NF- κ B, p38 y ERK inducen la expresión de los ligandos TGF β induciendo la activación de la señalización canónica a través de P-Smad3. La señalización de TGF β genera un bucle de retroalimentación positiva, manteniendo su activación y exacerbando el fenotipo EMT, las vías de señalización de NF- κ B, p38, ERK y PI3K, contribuyen al fenotipo EMT inducido por RANK de forma dependiente (NF- κ B, p38, ERK) o independiente (Pi3K) de TGF β (Figura 7). Por el contrario, el fenotipo Stem es inducido exclusivamente por la vía de

señalización de ERK y es transitorio. Basándonos en estos resultados no podemos asegurar que el proceso de EMT y Stemness sean completamente independientes pero sí que la inducción de uno, otro o ambos dependen de las vías de señalización que sean activadas por el estímulo inductor o estén más o menos representadas dentro de cada modelo celular. Así por ejemplo un estímulo que active la vía de ERK puede inducir EMT y Stemness mientras que otro que active NF- κ B y/o p38 inducirá exclusivamente el proceso de EMT. Esta teoría se aproxima más a la teoría descrita en (Ocaña OH 2012) donde se explica que la inducción de EMT y del fenotipo CSCs son eventos separados. Los factores de transcripción de EMT clásicos (Snail, Twist y ZEB1/2) inducirían ambos procesos mientras que otros factores de transcripción de EMT como Prrx1 induce EMT pero no un fenotipo de CSCs.

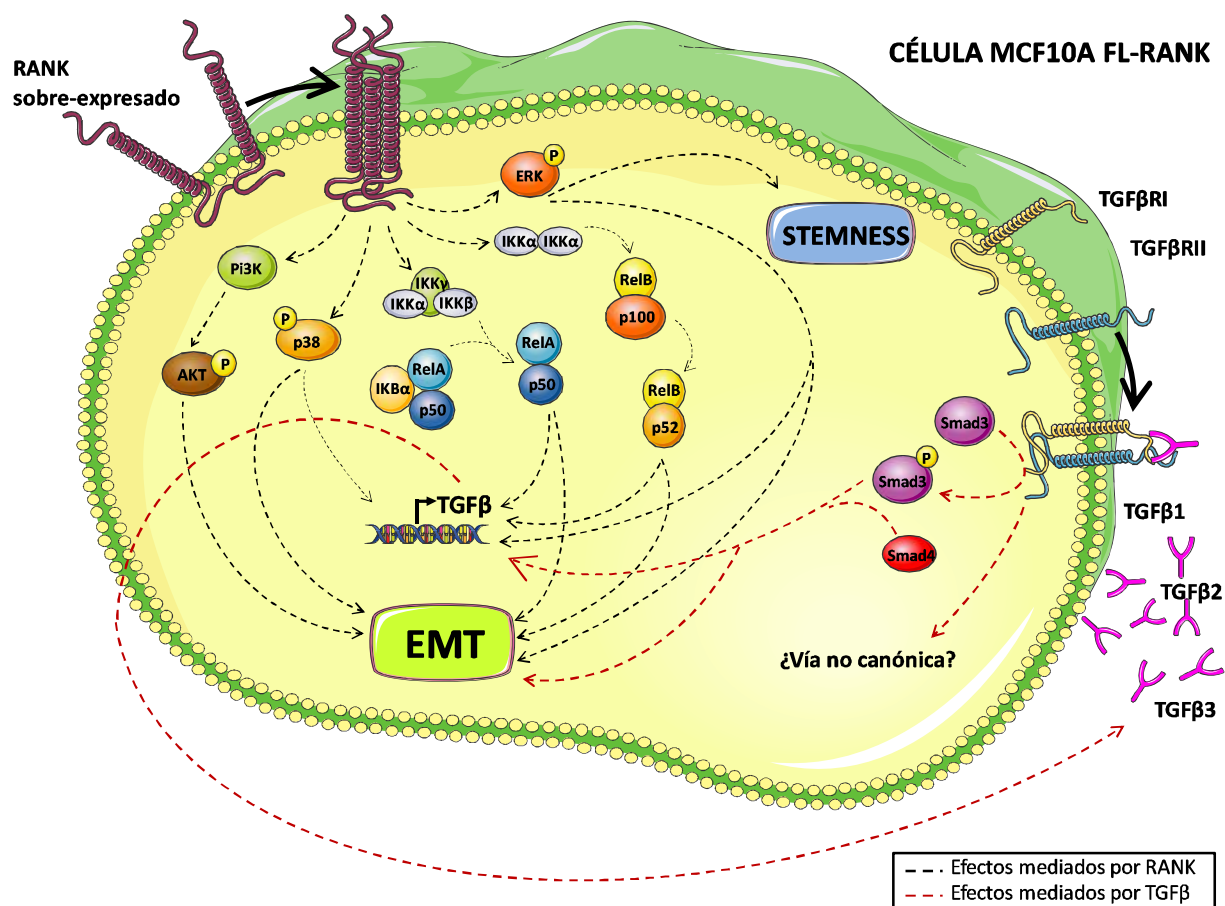


Figura 7. Mecanismo propuesto para explicar la inducción de EMT y Stemness observada tras la sobre-expresión de RANK en células epiteliales de mama humanas MCF10A.

RANK y Transformación celular

Como se ha discutido en el primer apartado, la sobre-expresión de RANK produce un aumento de activación de la vía de señalización de forma independiente RANKL. Por tanto, la sobre-expresión de RANK podría inducir transformación celular tal y como ocurre con otros receptores celulares sobre-expresados en cáncer de mama como Her2, oncogén sobre-expresado o amplificado en el 30% de tumores de mama humanos (Wang Y 2011).

Los resultados *in vitro* indican que RANK induce características de transformación celular ya que células FL-RANK son capaces de crecer en cultivos de agarosa sin necesidad de anclaje. En cultivos 3D también forman acinos aberrantes en ausencia de EGF con una morfología similar a la observada a los acinos formados por MECs aisladas de ratones MMTV-RANK tratados con RANKL (Gonzalez-Suarez E 2010). Sin embargo, como se ha explicado anteriormente, la inyección de células FL-RANK en mamas de animales inmunodeprimidos permite la formación de estructuras similares a ductos pero no la formación de tumores. Resultados similares han sido observados con varios oncogenes como ErbB2/Neu, el cual induce la formación de acinos aberrantes en cultivos 3D de células MCF10A o HMLE (Debnath J 2005) pero no induce la formación de tumores *in vivo* (Giunciuglio 1995, Mani SA 2008). Basándonos en estos datos, pensamos que RANK necesita cooperación con otros estímulos para inducir capacidad tumorigénica a células no transformadas como las MCF10A *in vivo*. Puede ser que por este motivo los ratones MMTV-RANK vírgenes son capaces de desarrollar tumores de mama espontáneamente durante la vejez cuando han acumulado suficientes mutaciones (Pellegrini P 2013). La sobre-expresión de RANK junto con mutaciones oncogénicas que sufran las células del epitelio mamario les puede aportar ciertas ventajas, como mayor capacidad de crecer sin contacto celular o un aumento de la capacidad de migración debido a la inducción de EMT, que hagan que el tumor se desarrolle más rápido y sea más metastásico. Los datos *in vivo* obtenidos en células tumorales deficientes de BRCA1 que sobre-expresan RANK apoyan esta teoría ya que la inyección de éstas células en glándula mamaria de ratones inmunodeprimidos induce la formación de tumores más grades que las células control. Además, los

ratones inyectados con células tumorales que sobre-expresan RANK muestran una mayor cantidad de metástasis pulmonares y de mayor tamaño que los ratones control.

En un contexto más fisiológico sería importante analizar el posible efecto que puede tener la sobre-expresión de RANK en células tumorales y su interacción con el microambiente. La progresión de un tumor se ve afectada por la interacción de las células tumorales con las células del estroma. Así, se ha descrito que el TGF β producido por células tumorales contribuye a la regulación de la angiogénesis (Merwin JR 1990), tiene efectos inmunosupresivos en células del sistema inmune con una función anti-tumoral (Wahl SM 1988) o es capaz de inducir la secreción de factores como el SDF-1 por parte de los fibroblastos asociados a carcinoma (CAFs) que promueven la migración celular (Canon JR 2008).

En resumen, la sobre-expresión de RANK en células no tumorales del epitelio mamario les puede conferir ciertas características: mayor capacidad de migración, mayor resistencia a apoptosis y capacidad de auto-regeneración, que cooperan con cambios oncogénicos adicionales, promoviendo la progresión tumoral, recidivas y metástasis en órganos distales. Además, el TGF β producido por estas células puede afectar al microambiente favoreciendo la progresión tumoral.

RANK EN MUESTRAS DE PACIENTES DE CÁNCER DE MAMA

Alteraciones en los genes y en los niveles de expresión de los componentes de la vía de señalización de RANK y RANKL han sido descritas como causa de ciertas enfermedades humanas. Así, enfermedades óseas como la osteoporosis está relacionada con aumento de la activación de la vía de RANK y RANKL en osteoclastos o la enfermedad de Paget producida por una mutación en el gen de RANK. También existen enfermedades auto-inmunes, como la artritis reumatoide, en las que hay aumento de la expresión de RANKL por parte de linfocitos T (Sigl V 2014).

Sin embargo, no se había descrito ningún tipo de alteración genética o de expresión que afecte a los miembros de la vía de señalización de RANK y RANKL con implicaciones en la glándula mamaria o el cáncer de mama.

Correlación de SNPs en el gen de RANK con riesgo de cáncer de mama

Como se ha explicado en la introducción, actualmente se piensa que en un alto porcentaje de los tumores de mama hereditarios la predisposición genética a sufrir esta enfermedad puede ser debida a la acumulación de polimorfismos en genes asociados con bajo riesgo a sufrir cáncer de mama. También habían sido descritos polimorfismos en el gen de RANK (*TNFRSF11A*) con el riesgo de padecer otras enfermedades, aunque no cáncer de mama. Por ejemplo, se han observado mutaciones en el gen de RANK en pacientes con la enfermedad de Paget o con una alta tasa de remodelación ósea (Hughes AE 2000, Wada T 2006) o mutaciones en el gen de OPG en pacientes con enfermedad juvenil de Paget. También se han descrito SNPs en el gen de RANK asociados con la densidad ósea en mujeres post-menopáusicas (Zupan J 2010) o incluso relacionados con la altura de la población adulta caucasiana (Chen Y 2007).

Por ello, se analizó la posible asociación de SNPs en el gen de RANK con el riesgo de padecer cáncer de mama. Los resultados obtenidos muestran una asociación entre un SNP (rs7226991) en la región 5' del gen de RANK y el riesgo a padecer cáncer de mama tanto en población general como en portadores de mutaciones en el gen de BRCA2.

Análisis de la expresión de RANK en muestras clínicas de de cáncer de mama.

El papel fundamental de la vía de señalización de RANK y RANKL en cáncer de mama en ratones (Gonzalez-Suarez E 2010, Schramek D 2010) y los datos obtenidos en esta tesis, lo cuales indican que la sobre-expresión de RANK promueve el crecimiento tumoral y la metástasis en células tumorales humanas, hacen pensar que la expresión

de RANK en muestras clínicas de tumores de mama humanos podría tener relevancia como factor pronóstico e incluso como posible diana terapéutica en cáncer de mama en un futuro.

Por ello, se analizaron los niveles de expresión de RANK en muestras clínicas de pacientes con cáncer de mama. Los resultados obtenidos indican que la expresión de RANK es más elevada en tumores con un alto grado de proliferación celular (%Ki67) y grado patológico (grado 3) así como en tumores ER-PR-. Estos datos confirman la relación de la expresión de RANK con un mal pronóstico clínico. Además, los niveles de expresión de mRNA de RANK y RANKL se asocian a la capacidad metastásica de los tumores. De confirmarse estos resultados en una colección más amplia de muestras clínicas la expresión de RANK y RANKL podría utilizarse como factor pronóstico. Esto datos coinciden con los publicados en otros artículos en los que se describe la expresión de RANK en muestras de tumores de mama humanos así como en células metastásicas en nódulos linfáticos (Jones DH 2006); una alta expresión de RANKL en tumores de mama humanos pobremente diferenciados (Cross SS 2006) y una alta expresión de RANK y una baja expresión de OPG con un mal pronóstico clínico (tumores mayores de 2 cm, ER- y grado patológico 3) (Gonzalez-Suarez E 2010, Santini D 2011). Sin embargo, hay que ser precavido a la hora de interpretar los resultados mostrados en algunos artículos, ya que en ocasiones se han empleado anticuerpos comerciales para la detección de RANK que no son lo suficientemente específicos, pudiendo dar falsos positivos o falsos negativos.

Aparte de en tumores de mama, se ha relacionado una alta expresión de RANK y RANKL en tumores humanos de próstata, de hígado y melanomas con una mayor frecuencia de metástasis a hueso (Chen G 2006, Jones DH 2006, Sasaki A 2007). Nuestros datos muestran que la expresión de RANK en MECs tumorales está asociada a una mayor incidencia de metástasis pulmonares, lo cual coincide con los resultados de González-Suárez et al. 2010 donde se muestra que la inhibición farmacológica de RANK (RANK-Fc) en el modelo de tumorigenesis murino MMTV-Neu disminuye el número de metástasis pulmonares. Por ello, proponemos que la inhibición de la vía de

señalización de RANK y RANKL podría prevenir metástasis no solo óseas sino también pulmonares en pacientes de cáncer de mama.

Por tanto, los datos obtenidos en este apartado de la tesis indican que, tanto el estudio de los niveles de expresión de los componentes de la vía de RANK y RANKL como factores pronóstico así como el análisis de variaciones genéticas en los genes que los codifican en muestras de tumores de mama de pacientes pueden ser útiles para determinar el pronóstico y tratamiento de dicha enfermedad.

GENERACIÓN DE MODELOS ORTOTÓPICOS DE CÁNCER DE MAMA HUMANO

El cáncer de mama es una enfermedad con un alto índice de curación siempre y cuando se realice un diagnóstico precoz de la enfermedad y el tumor no desarrolle resistencia a los tratamientos recibidos. En los casos en los que el tumor primario metastatiza a otros órganos o adquiere mecanismos de resistencia al tratamiento recibido el porcentaje de curación disminuye drásticamente (Rexer BN 2012).

Uno de los principales problemas en el desarrollo de fármacos y búsqueda de nuevas dianas terapéuticas en cáncer de mama es la falta de un modelo fiel a la enfermedad humana y la alta heterogeneidad de esta enfermedad hace más complicado este proceso. Una de las mejores aproximaciones existentes en la actualidad es la generación de ortoxenoplasntes de tumores de mama humanos en ratones inmunodeprimidos ya que son capaces de conservar las características del tumor de origen (DeRose YS 2011).

Análisis de los modelos obtenidos y aplicación clínica.

En este trabajo se describe la generación de cinco modelos ortotópicos de cáncer de mama a partir de muestras clínicas. Previamente, otros artículos han descrito la generación de modelos ortotópicos (DeRose YS 2011; Zhang X 2013), con características similares a los nuestros y de modelos xenográficos de cáncer de mama en ratón (VisonneauS 1998; Charafe-Jauffret E 2013).

Al análisis histológico y patológico de los modelos muestra que, durante los primeros pases en ratón, los tumores establecidos mantienen las características de los tumores humanos de origen, así como el patrón de metástasis observado en el paciente humano. Sin embargo, a pesar de mantener las características fundamentales, en pases más avanzados en ratón estos tumores sufren una evolución, aumentando su agresividad como resultado de la pérdida progresiva de estroma humano y/o selección de una población de células tumorales más agresivas, pero además con cambios en marcadores importantes como es el caso de la pérdida de expresión de ER o niveles más bajos de CK observados en algunos de nuestros modelos. En los modelos ortotópicos o xenográficos de cáncer de mama descritos en la bibliografía no se describen variaciones entre los tumores humanos que crecen en ratón respecto a los tumores originales (DeRose YS 2011). En nuestra opinión, los cambios observados en los modelos tumorales con los pases en ratón es un proceso plausible ya que el cáncer de mama es una enfermedad muy heterogénea y que evoluciona con el tiempo e incluso se ha observado variaciones entre el tumor primario, las recidivas y las metástasis en pacientes. Esta evolución puede ser debida a la selección clonal de una población concreta del tumor, bien porque tengan algún tipo de ventaja proliferativa o en supervivencia sobre el resto de las células tumorales o a la inestabilidad genómica de los tumores (Polyak 2007). En cualquier caso, este proceso ha de ser investigado ya que la diferente evolución de un tumor en el paciente y en su modelo animal es un concepto muy importante a tener en cuenta si lo que se pretende es el empleo de modelos ortotópicos humanos en ratón para un tratamiento personalizado de los pacientes.

Los modelos ortoxenográficos de cáncer de mama en ratón son difíciles de obtener debido a la baja tasa de injerto de estos tumores en ratones. Por ello, aunque un índice de éxito del 10% como el obtenido en nuestros resultados parezca bajo constituye un gran logro, teniendo en cuenta que no se llevó a cabo una selección previa de contenido tumoral, o tumores agresivos y que la mayor parte de los tumores implantados eran luminales, y varios de grado 1 y 2. Además, el hecho de que los modelos obtenidos representen todos de los tipos histológicos de cáncer de mama

existentes en clínica (TNBC, Luminales y Her2+) les aporta un valor añadido. Especialmente relevantes son los modelos que expresan ER/PR y ER/PR/Her2 ya que al tratarse de tumores menos agresivos tienen mayor dificultad para crecer en ratón y la mayoría de los que crecen suelen perder la expresión de ER, PR y/o Her2 (VisonneauS 1998). Por este motivo, estos modelos pueden ser empleados como herramienta para testar nuevas drogas empleadas en el tratamiento de tumores hormono-dependientes y Her2+.

La diferencias observadas entre nuestros modelos a nivel de respuesta a hormonas apoya la idea de que es importante analizar la evolución de los modelos tumorales en ratón, y por otra parte hace más atractivos a estos modelos para el estudio de nuevos fármacos en el tratamiento anti-hormonal, ya que son una representación de los tres tipos de casos que se dan en la clínica con este tipo de tumores: respuesta a tratamiento hormonal, resistencia a tratamiento hormonal por pérdida de expresión de receptores hormonales y resistencia a tratamiento hormonal, o empeoramiento de la enfermedad manteniendo la expresión de los receptores (Maximov PY 2009).

El microambiente tumoral es un factor fundamental en el desarrollo de un tumor y uno de los componentes más importantes de este microambiente es el sistema inmune (de la Cruz-Merino L 2013). Nuestros datos demuestran que en algunos modelos, pero no en todos, es importante la selección de un huésped más inmunodeprimido aunque estos datos no son suficientes para establecer ninguna conexión sólida. Futuros experimentos al respecto pueden aportar nuevas ideas en el desarrollo de terapias inmunes en el tratamiento de cáncer de mama (Fujii SI 2013).

Durante los últimos años se ha postulado que las células madre tumorales (CSCs) son la causa por la que los tumores primarios producen recidivas y adquieren mecanismos de resistencia a los tratamientos anti-tumorales (Dave B 2012; Pinto CA 2013). Por lo tanto, la identificación de esta población de células dentro de un tumor para la generación de fármacos específicos contra ellas se ha convertido en uno de los principales objetivos en investigación oncológica. Como se ha descrito en la introducción, numerosos marcadores de superficie han sido asociados a CSCs. Sin

embargo, debido a la gran heterogeneidad existente en tumores de mama no se ha podido definir ningún marcaje que caracterice a esta población de una forma definitiva. Además, ya que el fenotipo de CSCs es variable y la plasticidad de esta población cabe la posibilidad de que los marcadores de membrana que identifican a estas células también varíen en el tiempo o con los diferentes tipos de tumores. Una prueba de ello es que tumores pertenecientes a una misma categoría clínica, como por ejemplo el modelo A y B los cuales son TNBC, tienen un perfil de marcadores de superficie muy diferente entre ellos. Por tanto, una forma más útil de identificar las CSCs puede ser mediante ensayos funcionales y a partir de ahí averiguar los marcadores que las caracterizan para ese tumor en concreto.

Los modelos de tumores de cáncer de mama en ratones que hemos desarrollado pueden ser una potente herramienta para la identificación y aislamiento de células madre tumorales.

Generación de modelos resistentes a Docetaxel y empleo en el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas en cáncer de mama.

Como se ha indicado previamente, uno de los principales problemas en el tratamiento del cáncer de mama es la generación de resistencia al tratamiento aplicado y la falta de terapias dirigidas en tumores en estadios avanzados o TNBC. Por ello, se testó la sensibilidad de los modelos obtenidos a una de las drogas más empleadas en el tratamiento del cáncer de mama como el Docetaxel (taxano) y a partir de los modelos que respondieron inicialmente se generaron modelos resistentes para analizar el proceso de adquisición de mecanismos de resistencia a esta droga. El hecho de que a partir de modelos sensibles se obtengan modelos resistentes a Docetaxel es una prueba de que estos modelos tumorales tienen un comportamiento similar al que ocurre en clínica, ya que tras la administración continuada de un fármaco prácticamente la totalidad de los pacientes adquieren resistencia al mismo.

Nuestros datos indican que los modelos TNBC son sensibles mientras que los modelos luminales son resistentes tal y como se observa en la clínica (Carey LA 2007). La sensibilidad de modelos xenográficos de cáncer de mama a taxanos y antraciclinas ya ha sido testada en otras ocasiones. En estudios previos se ha sido testada la resistencia de los tumores ER+ PR+ a terapia hormonal (Tamoxifeno) (VisonneauS 1998). Sin embargo, en nuestro laboratorio hemos sido los primeros en generar modelos ortoxenográficos de cáncer de mama resistentes a taxanos mediante la exposición continuada al fármaco *in vivo*.

En la literatura no existen muchos datos referentes a los mecanismos moleculares por los cuales las células tumorales adquieren resistencia a los taxanos. Mediante análisis por micro-arrays se ha llegado a la conclusión que estos mecanismos pueden afectar a la expresión de un gran número de genes (5-10% del genoma) o a mutaciones puntuales de un solo gen. En el caso de la resistencia a Docetaxel, varios genes han sido propuestos como indicadores de la respuesta a esta droga (ER, proteína tau, tubulina beta, bcl2, Ki67 y p53 entre otros), pero casi ninguno ha sido validado en ensayos clínicos independientes (Martin M 2011). Sin embargo, el empleo de genes individuales para predecir la respuesta a un fármaco es una aproximación bastante limitada ya que lo más probable es que estos mecanismos de resistencia afecten a más de un gen.

En futuros proyectos se pretende emplear estos modelos para analizar las diferencias en la expresión génica como en modificaciones genéticas y epigenéticas existentes entre modelos que han adquirido resistencia a Docetaxel mediante su administración continuada y los modelos sensibles de origen. El objetivo es entender los mecanismos por los cuales estos tumores generan resistencia a taxanos y obtener nuevas dianas terapéuticas contra las que generar nuevos fármacos.

CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en este proyecto de tesis doctoral son las descritas a continuación:

1. La sobre-expresión de RANK en células humanas no tumorales MCF10A induce transición epitelio mesénquima (EMT): aumento de expresión de marcadores mesenquimales y factores de transcripción que dirigen EMT, pérdida de características epiteliales y un aumento en la capacidad migratoria de las células.
2. La sobre-expresión de RANK en células humanas no tumorales MCF10A induce la adquisición de características de células madre, fenotipo $CD44^+CD24^{-/low}$, sobre-expresión de factores de transcripción embrionarios, Sox2, Oct4, Nanog, y la capacidad de reconstituir ductos mamarios *in vivo*.
3. La sobre-expresión de RANK en células humanas no tumorales MCF10A, induce la adquisición de características relacionadas con la transformación pero no la capacidad de generar tumores *in vivo*.
4. RANK induce un fenotipo EMT estable mediante la activación, principalmente, de las vías de señalización de NF- κ B, p38 y ERK las cuales inducen un aumento de la expresión de ligandos de TGF β . A su vez la activación de TGF β , vía Smad3, induce la expresión de sus propios ligandos y de RANK, generándose un bucle de retro-alimentación positiva, que mantiene el fenotipo EMT.
5. RANK induce la adquisición transitoria de marcadores de stem, $CD44^+CD24^{-/low}$, mediante la activación de la vía de señalización de ERK.
6. En células tumorales deficientes en BRCA1, la sobre-expresión de RANK expande la población $CD44^+CD24^{-/low}$, pero no es capaz de inducir EMT en todas las líneas.

7. En células tumorales deficientes en BRCA1, la sobre-expresión de RANK acentúa sus características tumorigénicas aumentando la tumorigénesis y la metástasis *in vivo*.
8. Los niveles de expresión de mRNA de RANK son más altos en muestras de tumores de pacientes con un alto grado de proliferación o mayor grado patológico. Además, la expresión de mRNA de RANK y RANKL se asocia a la capacidad metastática de los tumores.
9. La proteína RANK se expresa en un 50% de tumores con receptores hormonales positivos y en un 20% de tumores con receptores hormonales negativos.
10. Identificación de una variante genética (SNP) en el locus del gen que codifica para RANK (*TNFRSF11A*) asociada al riesgo a padecer cáncer de mama en portadores de mutaciones en el gen de BRCA2, y en la población general.
11. Generación y caracterización de cinco modelos de ortotópicos de cáncer de mama humano en ratón que representan los diferentes tipos de tumores existentes en clínica.
12. Los ortoxenopacientes mantienen las características del tumor humano de origen en fases tempranas y patrones de metástasis comunes en cáncer de mama, pero durante la perpetuación en algunos tumores se detectan cambios: pérdida de expresión de receptores hormonales y niveles más bajos de expresión de citokeratinas.
13. Los patrones de expresión de marcadores de superficie utilizados para la identificación de células madre tumorales, son muy variables entre tumores.

14. Los ortoxenopacientes con tumores TNBC, son sensibles al docetaxel, en contraste con los luminales; tumores inicialmente sensibles al docetaxel adquieren resistencia tras la exposición continuada a la droga *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Rehim DM, P. S., Paish CE, Bell J, Blamey RW, Robertson JF, Nicholson RI, Ellis IO. (2004). "Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. ." J Pathol **203(2)**: 661-671.
- Acloque H ' A. M., Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease." J Clin Invest. **119(6)**: 1438-1449.
- Adamovich TL, S. R. (2003). "Ductal carcinoma in situ with microinvasion." AmJ Surg **186**: 112–116.
- Akhurst RJ, H. A. (2012). "Targeting the TGF β signalling pathway in disease." Nat Rev Drug Discov. **11(10)**: 790-811.
- Al-Hajj M, W. M., Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100(7)**: 3983-3988.
- Allred DC, A. S., Paik S, Wickerham DL, Nagtegaal ID, Swain SM, Mamounas EP, Julian TB, Geyer CE Jr, Costantino JP, Land SR, Wolmark N. (2012). "Adjuvant tamoxifen reduces subsequent breast cancer in women with estrogen receptor-positive ductal carcinoma in situ: a study based on NSABP protocol B-24." J Clin Oncol. **30(12)**: 1268-1273.
- Anderson D. M, M. E., Billingsley W. L, Dougall W. C, Tometsko M. E, Roux E. R, Teepe M. C, DuBose R. F, Cosman D, GalibertL. (1997). "A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. ." Nature **390**: 175–179.
- Antoniou A, P. P., Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL et al. (2003). "Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies." Am J Hum Genet **72**: 1117–1130.
- Antoniou AC, E. D. (2006). "Models of genetic susceptibility to breast cancer." Oncogene **25**: 5898-5905.
- Apter D, R. M., Vihko R. (1989). "Some endocrine characteristics of early menarche, a risk factor for breast cancer, are preserved into adulthood." Int J Cancer. **44(5)**: 783-787.
- Arnes JB, B. J., Stefansson I, Bégin LR, Wong N, Chappuis PO, Akslen LA, Foulkes WD. (2005). "Placental cadherin and the basal epithelial phenotype of BRCA1-related breast cancer. ." Clin Cancer Res. **11(11)**: 4003-4011.

- Asselin-Labat M. L, V. F., Sheridan J. M, Pal B, Wu D, Simpson E. R, Yasuda H, Smyth G. K, Martin T. J, Lindeman G. J, Visvader J. E. (2010). "Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling." Nature **465**(7299): 798-802.
- Baxevas CN, V. I., Gritzapis AD, Perez SA, Papamichail M. (2010). "HER-2/neu as a target for cancer vaccines." Immunotherapy. **2**(2): 213-226.
- Beelen K, H. L., Opdam M, Wesseling J, Sanders J, Vincent AD, van Diest PJ, Linn SC. (2014). "PI3K/AKT/mTOR pathway activation in primary and corresponding metastatic breast tumors after adjuvant endocrine therapy." Int J Cancer.
- Beleut M, R. R., Caikovski M, Ayyanan A, Germano D, Choi Y, Schneider P, Brisken C. (2010). "Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland." Proc Natl Acad Sci U S A. **107**(7): 2989-2994.
- Boyle WJ, S. W., Lacey DL. (2003). "Osteoclast differentiation and activation." Nature Publishing Group **5**;423(6937): 337-342.
- Buser AC, O. A., Kabotyanski EB, Grimm SL, Rosen JM, Edwards DP. (2011). "Progesterone receptor directly inhibits β -casein gene transcription in mammary epithelial cells through promoting promoter and enhancer repressive chromatin modifications." Mol Endocrinol. **25**(6): 955-968.
- Canon JR, R. M., Bryant R, Morony S, Stolina M, Kostenuik PJ, Dougall WC. (2008). "Inhibition of RANKL blocks skeletal tumor progression and improves survival in a mouse model of breast cancer bone metastasis.." Clin Exp Metastasis. **25**(2): 119-129.
- Cao Y, B. G., Seagroves T. N, Greten F. R, Johnson R, Schmidt E. V, Karin M. (2001). "IKK α provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development." Cell **107**(6): 763-775.
- Cao Y, B. G., Seagroves TN, Greten FR, Johnson R, Schmidt EV, Karin M. (2001). "IKK α provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development." Cell **107**(6): 763-775.
- Carey LA, D. E., Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, Ollila DW, Sartor CI, Graham ML, Perou CM. (2007). "The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. ." Clin Cancer Res. **13**(8): 2329-2334.
- Casey TM, E. J., Crocker A, White J, Tessitore J, Stanley M, Harlow S, Bunn JY, Weaver D, Muss H, Plaut K. (2008). "Cancer associated fibroblasts stimulated by transforming growth factor beta1 (TGF-beta 1) increase invasion rate of tumor cells: a population study." Breast Cancer Res Treat. **110**(1): 39-49.

- Cavazzoni A, B. M., Fumarola C, La Monica S, Airoud K, Bertoni R, Alfieri RR, Galetti M, Tramonti S, Galvani E, Harris AL, Martin LA, Andreis D, Bottini A, Generali D, Petronini PG. (2012). "Overcoming acquired resistance to letrozole by targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer cell clones." Cancer Lett. **323(1)**: 77-87.
- Celià-Terrassa T, M.-C. O., Mateo F, de Paz AM, Rubio N, Arnal-Estapé A, Ell BJ, Bermudo R, Díaz A, Guerra-Rebollo M, Lozano JJ, Estarás C, Ulloa C, Álvarez-Simón D, Milà J, Vilella R, Paciucci R, Martínez-Balbás M, de Herreros AG, Gomis RR, Kang Y, Blanco J, Fernández PL, Thomson TM. (2012). "Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells." J Clin Invest.
- Clarke R, L. M., Bouker KB, Gu Z, Lee RY, Zhu Y, et al. (2003). "Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling " Oncogene **22(47)**: 7316–7339.
- Comijn J, B. G., Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F. (2001). "The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion." Mol Cell. **7(6)**: 1267-1278.
- Connelly L, R.-B. C., Chont M, Saint-Jean L, Li H, Polosukhin VV, Blackwell TS, Yull FE. (2007). "A transgenic model reveals important roles for the NF-kappa B alternative pathway (p100/p52) in mammary development and links to tumorigenesis." J Biol Chem. **282(13)**: 10028-10035.
- Cross SS, H. R., Balasubramanian SP, Lippitt JM, Evans CA, et al. (2006). "Expression of receptor activator of nuclear factor kappa beta ligand (RANKL) and tumour necrosis factor related, apoptosis inducing ligand (TRAIL) in breast cancer, and their relations with osteoprotegerin, oestrogen receptor, and clinicopathological variables." J Clin Pathol **59**: 716-720.
- Chan, F. (2000). "The pre-ligand binding assembly domain: a potential target of inhibition of tumour necrosis factor receptor function." Ann Rheum Dis. **59 Suppl 1**: 50-53.
- Chan, F. (2007). "Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling." Cytokine. **37(2)**: 101-107.
- Chan FK, C. H., Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. (2000). "A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling." Science **288(5475)**: 2351-2354.
- Charafe-Jauffret E, G. C., Bertucci F, Cabaud O, Wicinski J, Finetti P, Josselin E, Adelaide J, Nguyen TT, Monville F, Jacquemier J, Thomassin-Piana J, Pinna G, Jalaguier A,

- Lambaudie E, Houvenaeghel G, Xerri L, Harel-Bellan A, Chaffanet M, Viens P, Birnbaum D. (2013). "ALDH1-positive cancer stem cells predict engraftment of primary breast tumors and are governed by a common stem cell program." Cancer Res. **73(24)**: 7290-7300.
- Cheang MC, C. S., Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. (2009). "Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer." J Natl Cancer Inst. **101(10)**: 736-750.
- Chen G, S. K., Aprikian A, Potti A, Goltzman D, et al. (2006). "Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation." Cancer **107**: 289-298.
- Chen J, S. D., Walpita D, Cantor SB, Gazdar AF, Tomlinson G, et al. (1998). "Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells." Mol Cell **2**: 317–328.
- Chesneau V, B. J., Zheng Y, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Blobel CP. (2003). "Catalytic properties of ADAM19." J Biol Chem. **278(25)**: 22331-22340. .
- Chirgwin JM, G. T. (2000). "Molecular mechanisms of tumor-bone interactions in osteolytic metastases." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **10**: 159–178.
- Chlebowski RT, A. G., Gass M, Lane DS, Aragaki AK, Kuller LH, Manson JE, Stefanick ML, Ockene J, Sarto GE, Johnson KC, Wactawski-Wende J, Ravdin PM, Schenken R, Hendrix SL, Rajkovic A, Rohan TE, Yasmeen S, Prentice RL. (2010). "Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women." JAMA. **304(15)**: 1684-1692.
- Chua HL, B.-N. P., Clare SE, Morimiya A, Badve S, Nakshatri H. (2007). "NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2." Oncogene. **26(5)**: 711-724.
- Chung J. Y, P. Y. C., Ye H, Wu H. (2002). "All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction." J. Cell Sci **115**: 679–688.
- Daniel AR, F. E., Lange CA. (2007). "Phosphorylation-dependent antagonism of sumoylation derepresses progesterone receptor action in breast cancer cells." Mol Endocrinol. **21(12)**: 2890-2906.
- Datto MB, L. Y., Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF. (1995). "Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A. **92(12)**: 5545-5549.

- Dave B, M. V., Tan NM, Chang JC. (2012). "Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance." Breast Cancer Res. **14(1)**: 202.
- David JP, S. K., Hoffmann O, Idarraga MH, Wagner EF. (2002). "JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and - independent mechanisms." J Cell Sci. **115(Pt 22)**: 4317-4325.
- de Beça FF, C. P., Gerhard R, Alvarenga CA, Gomes M, Paredes J, Schmitt F. (2013). "Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types." J Clin Pathol. **66(3)**: 187-191.
- De Craene B, B. G. (2013). "Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. ." Nat Rev Cancer. **13(2)**: 97-110.
- de la Cruz-Merino L, B.-S. A., Henao Carrasco F, Nogales Fernández E, Vallejo Benítez A, Brugal Molina J, Martínez Peinado A, Grueso López A, Ruiz Borrego M, Codes Manuel de Villena M, Sánchez-Margalet V, Nieto-García A, Alba Conejo E, Casares Lagar N, Ibáñez Martínez J. (2013). "New insights into the role of the immune microenvironment in breast carcinoma." Clin Dev Immunol. **785317**.
- Debnath J, B. J. S. (2005). "Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures." Nat Rev Cancer **5**: 675-688.
- Debnath J, M. S. K., Brugge J. S. (2003). "Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures." Methods **30(3)**: 256-268.
- den Hollander P, S. M., Brown PH. (2013). " Targeted Therapy for Breast Cancer Prevention." Front Oncol. **3**: 250.
- Dent R, T. M., Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. (2007). "Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence." Clin Cancer Res. **13(15 Pt 1)**: 4429-4434.
- DeRose YS, W. G., Lin YC, Bernard PS, Buys SS, Ebbert MT, Factor R, Matsen C, Milash BA, Nelson E, Neumayer L, Randall RL, Stijleman IJ, Welm BE, Welm AL (2011). "Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes." Nat Med.
- Derynck R, A. R. (2007). "Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. ." Nat Cell Biol. **9**: 1000-1004.
- Derynck R, A. R., Balmain A. (2001). "TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression." Nat Genet. **29(2)**: 117-129.
- Derynck R, Z. Y. (2003). "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling." Nature. **425(6958)**: 577-584.

- Dillon DA, G. A., Schnitt SJ. (2010). "Pathology of Invasive Breast Cancer." in Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. Diseases of the Breast." **Chapter 28**: 4th edition.
- Ding Y, L. Y., Deng B, Qiao A, Wu K, Xiao W, Gong W. (2014). "Induction of TGF- β and IL-10 production in dendritic cells using astilbin to inhibit dextran sulfate sodium-induced colitis." Biochem Biophys Res Commun. **S0006-291X(14)00415-X**.
- Dite GS, J. M., Southey MC, Hocking JS, Giles GG, McCredie MR et al. (2003). "Familial risks, early-onset breast cancer, and BRCA1 and BRCA2 germline mutations." J Natl Cancer Inst **95**: 448-457.
- Doppler W, H. W., Hofer P, Groner B, Ball RK. (1990). "Prolactin and glucocorticoid hormones control transcription of the beta-casein gene by kinetically distinct mechanisms." Mol Endocrinol. **4(6)**: 912-919.
- Dougall W. C, G. M., Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko M. E, Maliszewski C. R, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey P. J, Peschon J. J, Schuh J. (1999). "RANK is essential for osteoclast and lymph node development." Genes Dev **13(18)**: 2412-2424.
- Duheron V, H. E., Duval M, Decossas M, Castaneda B, Kloppen JE, et al. (2011). "Receptor activator of NF-kappaB (RANK) stimulates the proliferation of epithelial cells of the epidermo-pilosebaceous unit." Proc Natl Acad Sci U S A **108(13)**: 5342-5347.
- Durán A, S. M., Leitges M, Flores JM, Picard S, Brown JP, Moscat J, Diaz-Meco MT. (2004). "The atypical PKC-interacting protein p62 is an important mediator of RANK-activated osteoclastogenesis." Dev Cell. **6(2)**: 303-309.
- Easton DF, P. K., Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG et al. (2007). "Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. ." Nature **447**: 1087-1093.
- Eger A, A. K., Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, Berx G, Cano A, Beug H, Foisner R. (2005). "Delta EF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells." Oncogene. **24(14)**: 2375-2385.
- Ehata S, H. A., Hayashi M, Aburatani H, Kato Y, Fujime M, Saitoh M, Miyazawa K, Imamura T, Miyazono K. (2007). "Transforming growth factor-beta promotes survival of mammary carcinoma cells through induction of antiapoptotic transcription factor DEC1." Cancer Res. **67(20)**: 9694-9703.

- Elsheikh SE, G. A., Rakha EA, Samaka RM, Ammar AA, Powe D, Reis-Filho JS, Ellis IO. (2008). " Caveolin 1 and Caveolin 2 are associated with breast cancer basal-like and triple-negative immunophenotype. ." Br J Cancer. **99(2)**: 327-334.
- Entenberg D, K. D., Wyckoff J, Sahai E, Condeelis J, Segall JE. (2013). "maging tumor cell movement in vivo." Curr Protoc Cell Biol. **Chapter 19**: Unit19.17.
- Fata JE, K. Y., Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, Elliott R, Scully S, Voura EB, Lacey DL, Boyle WJ, Khokha R and Penninger JM. (2000). "The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development." Cell **103(1)**: 41-50.
- Feng, X. (2005). "Regulatory roles and molecular signaling of TNF family members in osteoclasts. ." Gene **350**: 1–13.
- Fernandez-Valdivia R, M. A., Creighton CJ, Buser AC, DeMayo FJ, Edwards DP and Lydon JP. (2008). "Transcriptional response of the murine mammary gland to acute progesterone exposure." Endocrinology **149(12)**: 6236-6250.
- Ferrel, J. (1996). "Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs." Trends Biochem Sci **21**: 460±466.
- FitzGerald MG, M. D., Wahrer D, Bell D, Caron S, Shannon KE et al. (1998). "Germline mutations in PTEN are an infrequent cause of genetic predisposition to breast cancer." Oncogene **17**: 727-731.
- Fujii SI, S. K., Okamoto Y, Kunii N, Nakayama T, Motohashi S, Taniguchi M. (2013). "NKT Cells as an Ideal Anti-Tumor Immunotherapeutic." Front Immunol. **4**: 409.
- Giaccone G, P. H. (1996). "Drug resistance." Oncologist **1**: 82-87.
- Ginestier C, H. M. H., Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer C. G, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha M. S, Dontu G. (2007). "ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome." Cell Stem Cell **1(5)**: 555-567.
- Giunciuglio, D., Culty, M., Fassina, G., Masiello, L., Melchiori, A., Paglialunga, G., et al. (1995). " Invasive phenotype of MCF10A cells overexpressing c-Ha-ras and c-erbB-2 oncogenes." Int J Cancer **63**: 815-822.
- Gold B, K. T., Stefanov S, Lautenberger J, Viale A, Garber J et al. (2008). "Genome-wide association study provides evidence for a breast cancer risk locus at 6q22.33." Proc Natl Acad Sci USA **105**: 4340-4345.

- Gonzalez-Suarez E, B. D., Armstrong A, Dinh H, Blumberg H and Dougall WC. (2007). "RANK overexpression in transgenic mice with mouse mammary tumor virus promoter-controlled RANK increases proliferation and impairs alveolar differentiation in the mammary epithelia and disrupts lumen formation in cultured epithelial acini." Mol Cell Biol **27**(4): 1442-1454.
- Gonzalez-Suarez E, J. A., Jones J, Miller R, Roudier-Meyer MP, Erwert R, Pinkas J, Branstetter D and Dougall WC. (2010). "RANK ligand mediates progestin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis." Nature **468**(7320): 103-107.
- Gregory PA, B. A., Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ. (2008). "The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1." Nat Cell Biol. **10**(5): 593-601.
- Gregory PA, B. C., Smith E, Bert AG, Wright JA, Roslan S, Morris M, Wyatt L, Farshid G, Lim YY, Lindeman GJ, Shannon MF, Drew PA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ (2011). "An autocrine TGF-beta/ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition." Mol Biol Cell. **22**(10): 1686-1698.
- Gudjonsson T, A. M., Sternlicht MD, Petersen OW, Bissell MJ. (2005). "Myoepithelial cells: their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia." J Mammary Gland Biol Neoplasia **10**(3): 261-272.
- Hanada R, L. A., Hanada T, Kitaoka S, Furuyashiki T, Fujihara H, et al. (2009). "Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. ." Nature **462**(7272): 505-509.
- Hankinson SE, C. G., Willett WC. (2004). "Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones." Breast Cancer Res. **6**(5): 213-218.
- Harris JR, L. M., Morrow M, Osborne CK. (2010). "Diseases of the Breast." **4th edition.**
- Hassiotou F, G. D. (2013). "Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. ." Clin Anat. **26**(1): 29-48.
- Hauer J, P. S., Ramakrishnan P, Simon U, Bongers M, Federle C, Engelmann H. (2005). "TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 2874-2879.
- Hayden MS, G. S. (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." Cell. **132**(3): 344-362.

- Herschkowitz JI, S. K., Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Backlund MG, Yin Y, Khramtsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, Brown PH, Green JE, Kopelovich L, Furth PA, Palazzo JP, Olopade OI, Bernard PS, Churchill GA, Van Dyke T, Perou CM. (2007). "Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors." Genome Biol. **8(5)**: R76.
- Higgins MJ, P. T., Blackford AL, Byrne C, Khouri NF, Slater SA, Jeter SC, Armstrong DK, Davidson NE, Emens LA, Fetting JH, Powers PP, Wolff AC, Green H, Thibert JN, Rae JM, Folkard E, Dowsett M, Blumenthal RS, Garber JE, Stearns V. (2012). "A short-term biomarker modulation study of simvastatin in women at increased risk of a new breast cancer." Breast Cancer Res Treat. **131(3)**: 131(133).
- Hikita A, Y. I., Wakeyama H, Nakamura M, Kadono Y, Oshima Y, Nakamura K, Seiki M, Tanaka S. (2006). "Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF κ B ligand." J. Biol. Chem. **281**: 36846–36855.
- Howard BA, G. B. (2000). "Human breast development. ." J Mammary Gland Biol Neoplasia **5**: 119-137.
- Howe LR, S. K., Patel J, Masferrer JL, Deora A, Hudis C, Thaler HT, Muller WJ, Du B, Brown AM, Dannenberg AJ. (2002). "Celecoxib, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, protects against human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2)/neu-induced breast cancer." Cancer Res. **62(19)**: 5405-5407.
- Hsu H, L. D., Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. (1999). "Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. ." Proc Natl Acad Sci U S A. **96(7)**: 3540-3545.
- Huber MA, A. N., Baumann B, Grünert S, Sommer A, Pehamberger H, Kraut N, Beug H, Wirth T. (2004). "NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression." J Clin Invest. **114(4)**: 569-581.
- Hughes AE, R. S., Marken J, Bell C, MacPherson H, Wallace RG, et al. (2000). "Mutations in *TNFRSF11A*, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. ." Nat Genet **24(1)**: 45-48.

- Hugo H, A. M., Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, Thompson EW. (2007). "Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression." J Cell Physiol. **213(2)**: 374-383.
- Hunter, D. J., P. Kraft, K. B. Jacobs, D. G. Cox, M. Yeager, S. E. Hankinson, S. Wacholder, Z. Wang, R. Welch, A. Hutchinson, J. Wang, K. Yu, N. Chatterjee, N. Orr, W. C. Willett, G. A. Colditz, R. G. Ziegler, C. D. Berg, S. S. Buys, C. A. McCarty, H. S. Feigelson, E. E. Calle, M. J. Thun, R. B. Hayes, M. Tucker, D. S. Gerhard, J. F. Fraumeni, Jr., R. N. Hoover, G. Thomas and S. J. Chanock (2007). "A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer." Nat Genet **39(7)**: 870-874.
- Hussey GS, L. L., Brown AS, Howley BV, Chaudhury A, Howe PH. (2012). "Establishment of a TGF β -induced post-transcriptional EMT gene signature." PLoS One **7(12)**: e52624.
- Hynes NE, L. H. (2005). "ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors." Nat Rev Cancer. **5(5)**: 341-354. .
- Iglehart JD, S. D. (2009). "Synthetic lethality—a new direction in cancer-drug development. ." New England Journal of Medicine **361**: 189–191.
- Ikushima H, M. K. (2010). "TGF β signalling: a complex web in cancer progression." Nat Rev Cancer. **10(6)**: 415-424.
- Irvin WJ Jr, C. L. (2008). "What is triple-negative breast cancer? ." Eur J Cancer. **44(18)**: 2799-2805. .
- Ismail PM, L. J., DeMayo FJ, O'Malley BW, Lydon JP. (2002). "A novel LacZ reporter mouse reveals complex regulation of the progesterone receptor promoter during mammary gland development." Mol Endocrinol. **16(11)**: 2475-2489.
- Jacobsen BM, S. S., Richer JK, Horwitz KB. (2005). "Progesterone-independent effects of human progesterone receptors (PRs) in estrogen receptor-positive breast cancer: PR isoform-specific gene regulation and tumor biology." Mol Endocrinol. **19(3)**: 574-587. .
- Janda E, L. K., Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, Beug H, Grünert S. (2002). "Ras and TGF[β] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways." J Cell Biol. **156(2)**: 299-313.
- Joensuu H, G. J. (2012). "Adjuvant treatments for triple-negative breast cancers." Ann Oncol. **23 Suppl 6**: 40-45.
- Joensuu H, K.-L. P., Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, Utriainen T, Kokko R, Hemminki A, Tarkkanen M, Turpeenniemi-Hujanen T, Jyrkkiö S, Flander M, Helle L, Ingalsuo S, Johansson K, Jääskeläinen AS, Pajunen M, Rauhala M, Kaleva-Kerola

- J, Salminen T, Leinonen M, Elomaa I, Isola J; FinHer Study Investigators. (2006). "Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer." N Engl J Med. **354(8)**: 809-820.
- Jones DH, N. T., Sanchez OH, Kozieradzki I, Komarova SV, Sarosi I, Morony S, Rubin E, Sarao R, Hojilla CV, Komnenovic V, Kong YY, Schreiber M, Dixon SJ, Sims SM, Khokha R, Wada T, Penninger JM (2006). "Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL." Nature **440(7084)**: 692-696.
- Jones J, W. H., Karanam B, Theodore S, Dean-Colomb W, Welch DR, Grizzle W, Yates C. (2014). "Nuclear localization of Kaiso promotes the poorly differentiated phenotype and EMT in infiltrating ductal carcinomas. ." Clin Exp Metastasis.
- Joshi P. A, J. H. W., Beristain A. G, Di Grappa M. A, Mote P. A, Clarke C. L, Stingl J, Waterhouse P. D, Khokha R. (2010). "Progesterone induces adult mammary stem cell expansion." Nature **465(7299)**: 803-807.
- Josien R, W. B., Li HL, Steinman RM, Choi Y. (1999). "TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells." J Immunol **162(5)**: 2562-2568.
- Kaklamani VG , G. W. (2006). "Gene expression in breast cancer." Curr Treat Options Oncol. **7(2)**: 123-128.
- Kalluri R, W. R. A. (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." J Clin Invest **119(6)**: 1420-1428.
- Karsenty G, W. E. (2002). "Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development." Dev Cell **2(4)**: 389-406.
- Kendrick H, R. J., Magnay FA, Grigoriadis A, Mitsopoulos C, Zvelebil M, Smalley MJ. (2008). "Transcriptome analysis of mammary epithelial subpopulations identifies novel determinants of lineage commitment and cell fate." BMC Genomics. **9**: 591.
- Kenner L, H. A., Beil FT, Keon N, Karreth F, Eferl R, Scheuch H, Szremska A, Amling M, Schorpp-Kistner M, Angel P, Wagner EF. (2004). "Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects." J Cell Biol. **164(4)**: 613-623.
- Kim NS, K. H., Koo BK, Kwon MC, Kim YW, Cho Y, Yokota Y, Penninger JM, Kong YY. (2006). "Receptor activator of NF-kappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2." Mol Cell Biol **26(3)**: 1002-1013.
- Kiyono K, S. H., Matsuyama H, Morishita Y, Komuro A, Kano MR, Sugimoto K, Miyazono K. (2009). "Autophagy is activated by TGF-beta and potentiates TGF-beta-

- mediated growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cells." Cancer Res. **69(23)**: 8844-8852.
- Koga T, M. Y., Asagiri M, Kodama T, de Crombrughe B, Nakashima K, Takayanagi H. (2005). "NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation." Nat Med. **11(8)**: 880-885.
- Komarova SV, P. M., Weidema AF, Dixon SJ, Sims SM. (2003). "RANK ligand-induced elevation of cytosolic Ca²⁺ accelerates nuclear translocation of nuclear factor kappa B in osteoclasts." J Biol Chem. **278(10)**: 8286-8293.
- Kondo H, G. J., Bringham FR. (2002). " Cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A mediates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor regulation of osteoclastogenesis and expression of RANKL and osteoprotegerin mRNAs by marrow stromal cells." J Bone Miner Res. **17(9)**: 1667-1679.
- Kong Y. Y, Y. H. S. I., Tan H. L, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos A. J, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan C. R, Lacey D. L, Mak T. W, Boyle W. J, Penninger J. M. (1999). "OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis." Nature **397(6717)**: 315-323.
- Kordon E. C, S. G. H. (1998). "An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell." Development **125**: 1921–1930.
- Korkaya H1, P. A., Iovino F, Wicha MS. (2008). "HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion." Oncogene. **27(47)**: 6120-6130.
- Korkaya H, W. M. (2013). "HER2 and breast cancer stem cells: more than meets the eye." Cancer Res. **73(12)**: 3489-3493.
- Kümler I, T. M., Nielsen DL. (2014). "A systematic review of dual targeting in HER2-positive breast cancer." Cancer Treat Rev. **40(2)**: 259-270.
- Lacey DL, B. W., Simonet WS, Kostenuik PJ, Dougall WC, Sullivan JK, San Martin J, Dansey R. (2012). "Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab." Nature Reviews. Drug discovery **11(5)**: 401-419.
- Larocca C, C. J., Fernando RI, Huang B, Hamilton DH, Palena C. (2013). "An autocrine loop between TGF- β 1 and the transcription factor brachyury controls the transition of human carcinoma cells into a mesenchymal phenotype." Mol Cancer Ther. **12(9)**: 1805-1815.

- Ledford, H. (2011). "Cancer theory faces doubts." Nature. **472(7343)**: 273.
- Leibbrandt A, P. J. (2010). "Novel functions of RANK(L) signaling in the immune system." Adv Exp Med Biol. **658**: 77-94.
- Leong CO, V. N., DeYoung MP, Sgroi D, Ellisen LW. (2007). "The p63/p73 network mediates chemosensitivity to cisplatin in a biologically defined subset of primary breast cancers." J Clin Invest. **117(5)**: 1370-1380.
- Li MO, W. Y., Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. (2006;). "Transforming growth factor-beta regulation of immune responses." Annu Rev Immunol. **24**: 99-146.
- Li NY, W. C., Wai PY, Cuevas BD, Zhang J, Kuo PC, Mi Z. (2013). "An MAPK-dependent pathway induces epithelial-mesenchymal transition via Twist activation in human breast cancer cell lines." Surgery. **154(2)**: 404-410.
- Liang H, T. A. (2010). "Iniparib, a PARP1 inhibitor for the potential treatment of cancer, including triple-negative breast cancer." IDrugs. **13(9)**: 646-656.
- Lim E, V. F., Wu D, Forrest N. C, Pal B, Hart A. H, Asselin-Labat M. L, Gyorki D. E, Ward T, Partanen A, Feleppa F, Huschtscha L. I, Thorne H. J, Fox S. B, Yan M, French J. D, Brown M. A, Smyth G. K, Visvader J. E, Lindeman G. J. (2009). "Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers." Nat Med **15(8)**: 907-913.
- Lim E, W. D., Pal B, Bouras T, Asselin-Labat ML, Vaillant F, Yagita H, Lindeman GJ, Smyth GK, Visvader JE. (2010). "Transcriptome analyses of mouse and human mammary cell subpopulations reveal multiple conserved genes and pathways." Breast Cancer Res. **12(2)**: R21.
- Litzenburger BC, C. C., Tsimelzon A, Chan BT, Hilsenbeck SG, Wang T, Carboni JM, Gottardis MM, Huang F, Chang JC, Lewis MT, Rimawi MF, Lee AV. (2011). "High IGF-IR activity in triple-negative breast cancer cell lines and tumorgrafts correlates with sensitivity to anti-IGF-IR therapy." Clin Cancer Res. **17(8)**: 2314-2327.
- Liu C, W. T., Huang P, Zhang S, Zhu X, Wu Y, Wedderburn LR, Tang P, Owens RJ, Stuart DI, Ren J, Gao B. (2010). "Structural and functional insights of RANKL–RANK interaction and signaling. ." J. Immunol. **184**: 6910–6919.
- Liu M, S. T., Casimiro MC, Willmarth NE, Quong AA, Ju X, Ojeifo J, Jiao X, Yeow WS, Katiyar S, Shirley LA, Joyce D, Lisanti MP, Albanese C, Pestell RG. (2010). "The canonical NF-kappaB pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion." Cancer Res. **70(24)**: 10464-10473.

- Liu X, R. S., Pajic M, et al. (2007). "Somatic loss of BRCA1 and p53 in mice induces mammary tumors with features of human BRCA1-mutated basal-like breast cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **104**: 12111–12116.
- Lobrich M, J. P. A. (2007). "The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction." Nature Reviews Cancer **7(11)**: 861–869.
- Lord C. J, A. A. (2008). "Targeted therapy for cancer using PARP inhibitors." Current Opinion in Pharmacology **8(4)**: 363–369.
- Loser K , M. A., Loeser S, Apelt J, Kuhn A, Grabbe S, Schwarz T , Penninger JM, Beissert S. (2006). "Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells." Nat Med. **12(12)**: 1372-1379.
- Lund LR, R. J., Thomasset N, Solberg H, Pyke C, Bissell MJ, Danø K, Werb Z. (1996). "Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways." Development **122**: 181–193.
- Luo YP, Z. H., Krueger J, Kaplan C, Liao D, Markowitz D, Liu C, Chen T, Chuang TH, Xiang R, Reisfeld RA. Oncogene. (2010). "The role of proto-oncogene Fra-1 in remodeling the tumor microenvironment in support of breast tumor cell invasion and progression. ." **29(5)**: 662-673.
- Maguer-Satta V, B. R., Bachelard-Cascales E. (2011). "Concise review: neutral endopeptidase (CD10): a multifaceted environment actor in stem cells, physiological mechanisms, and cancer.." Stem Cells. **29(3)**: 389-396.
- Malone KE, D. J., Thompson JD, O'Brien CA, Francisco LV, Ostrander EA. (1998). " BRCA1 mutations and breast cancer in the general population: analyses in women before age 35 years and in women before age 45 years with first-degree family history." JAMA. **279(12)**: 922-929.
- Mani SA, G. W., Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J, Weinberg RA (2008). "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells." Cell **133(4)**: 704-715.
- Marsters S. A, F. A. D., Simpson N. J, Fendly B. M, AshkenaziA. (1992). "Identification of cysteine-rich domains of the type 1 tumor necrosis factor receptor involved in ligand binding." J. Biol. Chem. **267**: 5747–5750.
- Martin M, R. A., Cheang MC, López García-Asenjo JA, García-Saenz JA, Oliva B, Román JM, He X, Casado A, de la Torre J, Furio V, Puente J, Caldés T, Vidart JA, Lopez-Tarruella S, Diaz-Rubio E, Perou CM. (2011). "Genomic predictors of response to doxorubicin versus docetaxel in primary breast cancer." Breast Cancer Res Treat. **128(1)**: 127-136.

- Massague, J. (2008). "TGF β in Cancer." Cell **134**: 215-230.
- Masuda, S. (2012). "Breast cancer pathology: the impact of molecular taxonomy on morphological taxonomy." Pathol Int. **62(5)**: 295-302.
- Maximov PY, L.-W. J., Jordan VC. (2009). "The Paradox of Oestradiol-Induced Breast Cancer Cell Growth and Apoptosis." Curr Signal Transduct Ther **4(2)**: 88-102.
- Medina, D. (1996). "The mammary gland: a unique organ for the study of development and tumorigenesis." J Mammary Gland Biol Neoplasia **1(1)**: 5-19.
- Meng XM, C. A., Lan HY. (2013). "Role of the TGF- β /BMP-7/Smad pathways in renal diseases." Clin Sci (Lond) **124(4)**: 243-254.
- Merwin JR, A. J., Kocher O, Van Itallie CM, Madri JA. (1990). "Transforming growth factor beta 1 modulates extracellular matrix organization and cell-cell junctional complex formation during in vitro angiogenesis." J Cell Physiol. **142(1)**: 117-128.
- Meyer MJ, F. J., Lin AF, Hussnain SA, Ginsburg E, Vonderhaar BK (2010). "CD44^{pos}CD49f^{hi}CD133/2^{hi} defines xenograft-initiating cells in estrogen receptor-negative breast cancer." Cancer Research.
- Mihály Z , G. B. (2013). "HER2-positive breast cancer: available targeted agents and biomarkers for therapy response." Magy Onkol **57(3)**: 147-156.
- Miller, K. (2004). "The role of ErbB inhibitors in trastuzumab resistance." Oncologist. **9 Suppl 3**: 16-19.
- Miller TW, H. B., González-Angulo AM, Fox EM, Mills GB, Chen H, Higham C, García-Echeverría C, Shyr Y, Arteaga CL. (2010). "Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast cancer." J Clin Invest. **120(7)**: 2406-2413.
- Mizukami J, T. G., Akatsuka H, Sakurai H, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Sakurai N. (2002). "Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6." Mol Cell Biol. **22(4)**: 992-1000.
- Morel AP, L. M., Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. (2008). "Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition." Plos ONE **3(8)**: e2888.

- Moustakas A, H. C. (2007). "Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression." Cancer Sci. **98(10)**: 1512-1520.
- Mulder, K. M. (2000). "Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling." Cytokine Growth Factor Rev **11(1-2)**: 23-35.
- Nakashima T., H. M., Fukunaga T., Kurata K., Oh-Hora M., Feng J.Q., Bonewald L.F., Kodama T., Wutz A., Wagner E.F., Penninger J.M., Takayanagi H. (2011). "Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression." Nat Med. **17**: 1231-1234.
- Neil JR, S. W. (2008). "Altered TAB1:I kappaB kinase interaction promotes transforming growth factor beta-mediated nuclear factor-kappaB activation during breast cancer progression." Cancer Res. **68(5)**: 1462-1470.
- Neradugomma NK, S. D., Tawfik OW, Goffin V, Kumar TR, Jensen RA, Anant S. (2013). "Prolactin signaling enhances colon cancer stemness by modulating Notch signaling in a Jak2-STAT3/ERK manner." Carcinogenesis.
- Nielsen DL, K. I., Palshof JA, Andersson M. (2013). "Efficacy of HER2-targeted therapy in metastatic breast cancer. Monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors." Breast. **22(1)**: 1-12.
- Nieto, M. (2013). "Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells." Science. **342(6159)**: 1234850.
- Niraula S, D. R., Ennis M, Chang MC, Done SJ, Hood N, Escallon J, Leong WL, McCready DR, Reedijk M, Stambolic V, Goodwin PJ. (2012). "Metformin in early breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study." Breast Cancer Res Treat. **135(3)**: 821-830. .
- O'Connor ML, X. D., Shigdar S, Macdonald J, Li Y, Wang T, Pu C, Wang Z, Qiao L, Duan W. (2014). "Cancer stem cells: A contentious hypothesis now moving forward." Cancer Lett. **344(2)**: 180-187. .
- Oakes SR, R. R., Naylor MJ, Ormandy CJ. (2008). "Prolactin regulation of mammary gland development." J Mammary Gland Biol Neoplasia. **13(1)**: 13-28.
- Ocaña OH, C. R., Fabra A, Moreno-Bueno G, Acloque H, Vega S, Barrallo-Gimeno A, Cano A, Nieto MA. (2012). "Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1." Cancer Cell **22(6)**: 709-724.

- Oh DS, T. M., Usary J, Hu Z, He X, Fan C, Wu J, Carey LA, Perou CM. (2006). "Estrogen-regulated genes predict survival in hormone receptor-positive breast cancers. ." J Clin Oncol. **24(11)**: 1656-1664.
- Ohgushi M, K. S., Fukamachi H, O'Reilly LA, Kuida K, Strasser A, Yonehara S. (2005). "Transforming growth factor beta-dependent sequential activation of Smad, Bim, and caspase-9 mediates physiological apoptosis in gastric epithelial cells." Mol Cell Biol. **25(22)**: 10017-10028.
- Paget, S. (1989). "The distribution of secondary growths in cancer of the breast. ." Cancer Metastasis Rev **8(2)**: 98-101.
- Park S. M, G., A. B, Lengyel E, Peter M. E. (2008). "The miR 200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E cadherin repressors ZEB1 and ZEB2." Genes Dev. **22**: 894–907.
- Parker JS, M. M., Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS. (2009). "Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes." J Clin Oncol. **27(8)**: 1160-1167.
- Pasquale P, A. C., Marta Ines G, William DC, Purificación M, Miguel Angel P, Eva GS. (2013). "Constitutive activation of RANK disrupts mammary cell fate leading to tumorigenesis." Stem Cells **31(9)**: 1954-1965.
- Patsialou A, W. J., Wang Y, Goswami S, Stanley ER, Condeelis JS. (2009). "Invasion of human breast cancer cells in vivo requires both paracrine and autocrine loops involving the colony-stimulating factor-1 receptor." Cancer Res. **69(24)**: 9498-9506.
- Pellegrini P, C. A., García MI, Dougall WC, Muñoz P, Pujana MA, González-Suárez E. (2013). "Constitutive activation of RANK disrupts mammary cell fate leading to tumorigenesis." Stem Cells **31(9)**: 1954-1965.
- Perou CM, S. T., Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." Nature **406(6797)**: 747-752.
- Peto J, C. N., Barfoot R, Seal S, Warren W, Rahman N et al. (1999). "Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer." J Natl Cancer Inst. **91**: 943-949.
- Pharoah PD, A. A., Bobrow M, Zimmern RL, Easton DF, Ponder BA. (2002). "Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention." Nat Genet **31**: 33-36.

- Pinto CA, W. E., Waltham M, Thompson EW. (2013). "Breast cancer stem cells and epithelial mesenchymal plasticity - Implications for chemoresistance." Cancer Lett. **341(1)**: 56-62.
- Pinto CA, W. E., Waltham M, Thompson EW. (2013). "Breast cancer stem cells and epithelial mesenchymal plasticity - Implications for chemoresistance." Cancer Lett. **341(1)**: 56-62.
- Planas-Silva MD, W. P. (2007). "Estrogen promotes reversible epithelial-to-mesenchymal-like transition and collective motility in MCF-7 breast cancer cells." J Steroid Biochem Mol Biol. **104(1-2)**: 11-21.
- Polyak, K. (2007). "Breast cancer: origins and evolution. ." J Clin Invest. **117(11)**: 3155-3163.
- Prat A, P. J., Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM. (2010). "Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer." Breast Cancer Res. **12(5)**: R68.
- Raimondi C, G. A., Naso G, Vincenzi B, Petracca A, Nicolazzo C, Palazzo A, Saltarelli R, Spremberg F, Cortesi E, Gazzaniga P. (2011). "Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients." Breast Cancer Res Treat. **130(2)**: 449-455.
- Rakha EA, E. S., Aleskandarany MA, Habashi HO, Green AR, Powe DG, El-Sayed ME, Benhasouna A, Brunet JS, Akslen LA, Evans AJ, Blamey R, Reis-Filho JS, Foulkes WD, Ellis IO. (2009). "Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. ." Clin Cancer Res. **15(7)**: 2302-2310.
- Raouf A, Z. Y., To K, Stingl J, Delaney A, Barbara M, Iscove N, Jones S, McKinney S, Emerman J, Aparicio S, Marra M, Eaves C. (2008). "Transcriptome analysis of the normal human mammary cell commitment and differentiation process." Cell Stem Cell. **3(1)**: 109-118.
- Reinke L. M., X., Y, Cheng, C. (2012). "Snail represses the splicing regulator epithelial splicing regulatory protein 1 to promote epithelial–mesenchymal transition." J. Biol. Chem. **287**: 36435–36442
- Rexer BN, A. C. (2012). "Intrinsic and acquired resistance to HER2-targeted therapies in HER2 gene-amplified breast cancer: mechanisms and clinical implications." Crit Rev Oncog. **17(1)**: 1-16.
- Rivera, E. (2010). "Implications of anthracycline-resistant and taxane-resistant metastatic breast cancer and new therapeutic options." Breast J. **16(3)**: 252-263.

- Rosen, P. (2008). "Rosen's breast pathology." **3rd ed**: 325.
- Roxanis, I. (2013). "Occurrence and significance of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer." J Clin Pathol. **66(6)**: 517-521.
- Sakai W, S. E., Karlan BY, et al. (2008). "Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. ." Nature **451**(1116–20.).
- Sakaki-Yumoto M, K. Y., Derynck R. (2013). "TGF- β family signaling in stem cells." Biochim Biophys Acta. **1830(2)**: 2280-2296.
- Saleh-Gohari N, B. H. E., Schultz N, Parker K. M, Cassel T. N, Helleday T. (2005). "Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks." Molecular and Cellular Biology **25(16)**: 7158–7169.
- Saleh-Gohari N., B. H. E., Schultz N. , Parker K. M. , Cassel T. N, Helleday T. (2005). "Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks." Molecular and Cellular Biology **25(16)**: 7158-7169.
- Sánchez-Elsner T, B. L., Velasco B, Corbí A, Attisano L, Bernabéu C. (2001). "Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression." J Biol Chem. **276(42)**: 38527-38535.
- Santarpia L, L. S., El-Naggar AK. (2012). "Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy." Expert Opin Ther Targets. **16(1)**: 103-119.
- Santini** D, S. G., Vincenzi B, Gaeta L, Pantano F, Russo A, Ortega C, Porta C, Galluzzo S, Armento G, La Verde N, Caroti C, Treilleux I, Ruggiero A, Perrone G, Addeo R, Clezardin P, Muda AO, Tonini G. (2011). "Receptor activator of NF- κ B (RANK) expression in primary tumors associates with bone metastasis occurrence in breast cancer patients. ." PLoS One. **6(4)**: e19234.
- Sasaki A, I. K., Haraguchi N, Inoue H, Ishio T, et al. (2007). " Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) expression hepatocellular carcinoma with bone metastasis." Ann Surg Oncol **14**: 1191-1199.
- Scully R, C. J., Plug A,Xiao Y,Weaver D,Feunteun J,et al. (1997). "Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. ." Cell **88**: 265–275.
- Schlondorff J, L. L., Blobel C. P. (2001). "Biochemical and pharmacological criteria define two shedding activities for TRANCE/OPGL that are distinct from the tumor necrosis factor α convertase." J. Biol. Chem. **276**: 14665-14674.

- Schlöndorff J, L. L., Blobel CP. (2001). "Biochemical and pharmacological criteria define two shedding activities for TRANCE/OPGL that are distinct from the tumor necrosis factor alpha convertase." J Biol Chem. **276(18)**: 14665-14674.
- Schramek D, L. A., Sigl V, Kenner L, Pospisilik JA, Lee HJ, Hanada R, Joshi PA, Aliprantis A, Glimcher L, Pasparakis M, Khokha R, Ormandy CJ, Widschwendter M, Schett G and Penninger JM. (2010). "Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer." Nature **468(7320)**: 98-102.
- Schreiber M, R. K., McFadden G. (1996). "Myxoma virus T2 protein, a tumor necrosis factor (TNF) receptor homolog, is secreted as a monomer and dimer that each bind rabbit TNF α , but the dimer is a more potent TNF inhibitor." J. Biol. Chem. **271**: 13333-13341.
- Seidman AD, F. M., Esteva FJ, Tan L, Kaptain S, Bach A, Panageas KS, Arroyo C, Valero V, Currie V, Gilewski T, Theodoulou M, Moynahan ME, Moasser M, Sklarin N, Dickler M, D'Andrea G, Cristofanilli M, Rivera E, Hortobagyi GN, Norton L, Hudis CA. (J Clin Oncol.). "Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification." J Clin Oncol. **19(10)**: 2587-2595.
- Shackleton M , F. o. V., Kaylene J. Simpson, John Stingl, Gordon K. Smyth, Marie-Liesse Asselin-Labat, Li Wu1, Geoffrey J. Lindeman & Jane E. Visvader (2006). "Generation of a functional mammary gland from a single stem cell." Nature Publishing Group **439**.
- Shi Y, M. J. (2003). "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus." Cell. **113(6)**: 685-700.
- Shrivastav M, D. L. P., .Nickoloff J.A (2008). "Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice,." Cell Research **18(1)**: 134-147.
- Sidransky D, T. T., Helzlsouer K, Zehnbauser B, Rausch G, Shelton B et al. (1992). "Inherited p53 gene mutations in breast cancer. ." Cancer Res **52**: 2984-2986.
- Sigl V, P. J. (2014). "RANKL/RANK - From bone physiology to breast cancer." Cytokine Growth Factor Rev. **S1359-6101(14)00003-3**.
- Silberstein GB, V. H. K., Shyamala G, Daniel CW. (1996). "Progesterone receptors in the mouse mammary duct: distribution and developmental regulation." Cell Growth Differ. **7(7)**: 945-952.
- Silver DP, R. A., Eklund AC, Wang ZC, Szallasi Z, Li Q, Juul N, Leong CO, Calogrias D, Buraimoh A, Fatima A, Gelman RS, Ryan PD, Tung NM, De Nicolo A, Ganesan S, Miron A, Colin C, Sgroi DC, Ellisen LW, Winer EP, Garber JE. (2010). " Efficacy of

- neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer." J Clin Oncol. **28(7)**: 1145-1153.
- Slamon, D. (1990). "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast cancer." Cancer Invest. **8(2)**: 253.
- Slamon DJ, C. G., Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." Science. **235(4785)**: 177-182.
- Smith C. A, F. T., Goodwin R. G. (1994). "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death." Cell **76**: 959-962.
- Smith I, P. M., Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, Goldhirsch A, Untch M, Mariani G, Baselga J, Kaufmann M, Cameron D, Bell R, Bergh J, Coleman R, Wardley A, Harbeck N, Lopez RI, Mallmann P, Gelmon K, Wilcken N, Wist E, Sánchez Rovira P, Piccart-Gebhart MJ; HERA study team. (2007). "2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial." Lancet. **369(9555)**: 29-36.
- Sobolik T, S. Y., Wells S, Ayers GD, Cook RS, Richmond A. (2014). "CXCR4 Drives the Metastatic Phenotype in Breast Cancer through Induction of CXCR2, and Activation of MEK and PI3K Pathways." Mol. Cell. Biology. **25(5)**: 566-582.
- Sørli T, P. C., Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." Proc Natl Acad Sci U S A. **98(19)**: 10869-10874.
- Sotiriou C, N. S., McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET. (2003). "Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study." Proc Natl Acad Sci U S A. **100(18)**: 10393-10398. .
- Sotiriou C, N. S., McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET. (2003). "Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study." Proc Natl Acad Sci U S A. **100(18)**: 10393-10398.
- Sovak MA, A. M., Zanieski G, Kavanagh KT, Sonenshein GE. (1999). "The inhibitory effects of transforming growth factor beta1 on breast cancer cell proliferation are mediated through regulation of aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression." Cell Growth Differ. **10(8)**: 537-544.

- Stacey SN, M. A., Sulem P, Rafnar T, Gudmundsson J, Gudjonsson SA et al. (2007). "Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer." Nat Genet **39**: 865-869.
- Sternlicht, M. D. (2006). "Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. ." Breast Cancer Res.**8(1)**: 201.
- Stingl J, E. C., Zandieh I, Emerman JT. (2001). "Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. ." Breast Cancer Research and Treatment **67**: 93–109.
- Stingl J , P. E., Ricketson I, Shackleton M, Vaillant F, Choi D, Li HI, Eaves C.J (2006). "Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells." Nature Publishing Group **439**.
- Stingl J, R. A., Emerman JT et al. (2005). " Epithelial progenitors in the normal human mammary gland." J Mammary Gland Biol Neoplasia **10**: 49–59.
- Takayanagi H, K. S., Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T. (2002). "Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts." Dev Cell. **3(6)**: 889-901.
- Takayanagi H, O. K., Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T. (2000). "T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma." Nature **408(6812)**: 600-605.
- Tanaka VDA, S. J., Torezan L, Niwa AB, Neto CF (2009). "Mammary and extramammary Paget's disease: a study of 14 cases and the associated therapeutic difficulties." Clinics **64**: 599-606.
- Tang B, Y. N., Vu M, Mamura M, Nam JS, Ooshima A, Du Z, Desprez PY, Anver MR, Michalowska AM, Shih J, Parks WT, Wakefield LM. (2007). "Transforming growth factor-beta can suppress tumorigenesis through effects on the putative cancer stem or early progenitor cell and committed progeny in a breast cancer xenograft model." Cancer Res. **67(18)**: 8643-8652.
- Tanos T, S. G., Echeverria PC, Ayyanan A, Gutierrez M, Delaloye JF, Raffoul W, Fiche M, Dougall W, Schneider P, Yalcin-Ozuysal O, Brisken C. (2013.). "Progesterone/RANKL is a major regulatory axis in the human breast." Sci Transl Med. **24;5(182)**: 182ra155.
- Taylor MA, L. Y., Schiemann WP. (2011). "Role of TGF- β and the tumor microenvironment during mammary tumorigenesis." Gene Expr. **15(3)**: 117-132.

- Teitelbaum SL, R. F. (2003). "Genetic regulation of osteoclast development and function." Nat Rev Genet. **4(8)**: 638-649.
- Theill LE, B. W., Penninger JM. (2002). "RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution." Annu Rev Immunol. **20**: 795-823.
- Thiery JP, A. H., Huang RY, Nieto MA. (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." Cell **25;139(5)**: 871-890.
- Thiery JP, S. J. (2006). "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions." Nat Rev Mol Cell Biol. **7(2)**: 131-142.
- Thompson D, E. D. (2004). " The genetic epidemiology of breast cancer genes." J Mammary Gland Biol Neoplasia **9**: 221-236.
- Tran B, B. P. (2011). "Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets." Breast Cancer Res. **13(6)**: 221.
- Tsai JH , Y. J. (2013). "Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis." Genes Dev. **27(20)**: 2192-2206.
- van 't Veer LJ, D. H., van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. (2002). "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer." Nature. **415(6871)**: 530-536.
- Vanhaesebroeck B, A. D. (2000). "The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB." Biochem J. **346 Pt 3**: 561-576.
- Velasco-Velázquez MA, P. V., Lisanti MP, Pestell RG. (2011). "The role of breast cancer stem cells in metastasis and therapeutic implications." Am J Pathol. **179(1)**: 2-11.
- Veronesi U, M. L., Decensi A, Formelli F, Camerini T, Miceli R, Di Mauro MG, Costa A, Marubini E, Sporn MB, De Palo G. (2006). "Fifteen-year results of a randomized phase III trial of fenretinide to prevent second breast cancer." Ann Oncol. **17(7)**: 1065-1071.
- Verrecchia F, M. A. (2002). "Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation." J Invest Dermatol. **118(2)**: 211-215.
- VisonneauS, C., TorosianMH,MillerEJ,Santoli D. (1998). "Growth characteristics and metastatic properties of human breast cancer xenografts in immunodeficient mice." AmJPathol **152**: 1299-1311.

- Visvader (2009). "Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis." GENES & DEVELOPMENT **23**.
- Wada T, N. T., Hiroshi N, Penninger JM (2006). "RANK-RANKL signalling in osteoclastogenesis and bone disease." TRENDS in molecular medicine **12**(1).
- Wagner, E. (2002). "Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development." Ann Rheum Dis. **61 Suppl 2**: 40-42.
- Wahl SM, H. D., Wong HL, Dougherty S, McCartney-Francis N, Wahl LM, Ellingsworth L, Schmidt JA, Hall G, Roberts AB, et al. (1988). "Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation." J Immunol. **140**(9): 3026-3032.
- Walker RA, D. S. (1992;). "Transforming growth factor beta 1 in ductal carcinoma in situ and invasive carcinomas of the breast." Eur J Cancer. **(2-3)**: 641-644.
- Walsh MC, C. Y. (2003). "Biology of the TRANCE axis." Cytokine Growth Factor Rev. **14**(3-4): 251-263.
- Wang X, B. K., Kersual N, Kirsch KH, Mineva ND, Galtier F, Chalbos D, Sonenshein GE. (2007). "Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2." Nat Cell Biol. **9**(4): 470-478.
- Wang Y, Y. Q., Yu Q, Zhang J, Liu Z, Wang S, Lv S, Niu Y. (2011). "A retrospective study of breast cancer subtypes: the risk of relapse and the relations with treatments." Breast Cancer Res Treat. **130**(2): 489-498.
- Watson CJ, K. W. (2008). "Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment." Development **135**(6): 995-1003.
- Weigelt B, P. J., van 't Veer LJ. (2005). "Breast cancer metastasis: markers and models." Nat Rev Cancer. **5**(8): 591-602.
- Whitehead RH, B. I., Webber LM, Pedersen JS. (1983). "A new human breast carcinoma cell line (PMC42) with stem cell characteristics. I. Morphologic characterization." J Natl Cancer Inst. **70**(4): 649-661.
- Wooster R, B. G., Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J et al. (1995). "Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2." Nature **378**: 789-792.
- Wu K, K. H., Rodriquez JL, Hilsenbeck SG, Mohsin SK, Xu XC, Lamph WW, Kuhn JG, Green JE, Brown PH. (2002). "Suppression of mammary tumorigenesis in transgenic mice by the RXR-selective retinoid, LGD1069." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. **11**(5): 467-474.

- Xing L, S. E. M., Boyce B. F. (2005). "Osteoclast precursors, RANKL/ RANK, and immunology." Immunol. Rev. **208**: 19-29.
- Xiong J., O. M., Jilka R.L., Weinstein R.S., Manolagas S.C., O'Brien C.A. (2011). "Matrix-embedded cells control osteoclast formation. ." Nat Med. **17**: 1235-1241.
- Xu J, L. S., Derynck R. (2009). "TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition." Cell Res **19(2)**: 156-172.
- Xu Q, W. L., Li H, Han Q, Li J, Qu X, Huang S, Zhao RC. (2012). "Mesenchymal stem cells play a potential role in regulating the establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition in MCF7 human breast cancer cells by paracrine and induced autocrine TGF- β ." Int J Oncol. **41(3)**: 959-968.
- Xu Q, W. L., Li H, Han Q, Li J, Qu X, Huang S, Zhao RC. (2012). "Mesenchymal stem cells play a potential role in regulating the establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition in MCF7 human breast cancer cells by paracrine and induced autocrine TGF- β ." Int J Oncol. **41(3)**: 959-968.
- Xue J, L. X., Chiu WT, Chen YH, Yu G, Liu M, Feng XH, Sawaya R, Medema RH, Hung MC, Huang S. (2014). "Sustained activation of SMAD3/SMAD4 by FOXM1 promotes TGF- β -dependent cancer metastasis." J Clin Invest. **124(2)**: 564-579.
- Xue ZF, W. X., Liu M. (2013). "Hepatic regeneration and the epithelial to mesenchymal transition. ." World J Gastroenterol. **19(9)**: 1380-1386.
- Yamanaka, S. (2008). "Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors." Cell Prolif. **41 Suppl 1**: 51-56.
- Yardley, D. (2013). "Combining mTOR Inhibitors with Chemotherapy and Other Targeted Therapies in Advanced Breast Cancer: Rationale, Clinical Experience, and Future Directions." Breast Cancer (Auckl). **7**: 7-22.
- Yasuda H, S. N., Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinoshita M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. (1998). "Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL." Proc Natl Acad Sci U S A **95(7)**: 3597-3602.
- Yin JJ, S. K., Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, Massagué J, Mundy GR, Guise TA. (1999). "TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development." J Clin Invest. **103(2)**: 197-206.
- Yu M, B. A., Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, Isakoff SJ, Ciciliano JC, Wells MN, Shah AM, Concannon KF, Donaldson MC, Sequist LV, Brachtel E, Sgroi D, Baselga J, Ramaswamy S, Toner M, Haber DA, Maheswaran S. (2013).

- "Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition." Science. **339(6119)**: 580-584.
- Zeuthen LH, F. L., Frokiaer H. (2008). "Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta." Immunology **123(2)**: 197-208.
- Zhang X, C. S., Prat A, Dobrolecki LE, Petrovic I, Lai Q, Landis MD, Wiechmann L, Schiff R, Giuliano M, Wong H, Fuqua SW, Contreras A, Gutierrez C, Huang J, Mao S, Pavlick AC, Froehlich AM, Wu MF, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Chen ES, Zuloaga P, Shaw CA, Rimawi MF, Perou CM, Mills GB, Chang JC, Lewis MT. (2013). "A renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-derived human breast cancer xenograft models." Cancer Res. **73(15)**: 4885-4897.
- Zhang, Y. (2009). "Non-Smad pathways in TGF-beta signaling." Cell Res. **19(1)**: 128-139.
- Zhou J, T. R., Wang Q, Xu C, Guo J, Yuan C, Shen J, Hu W, Wang L, Xie S. (2013). "Endocrine resistance in breast cancer: Current status and a perspective on the roles of miRNAs." Oncol Lett. **6(2)**: 295-305.

