

16. Kertesz, N., V. Krasnoperov, *et al.* The soluble extracellular domain of EphB4 (sEphB4) antagonizes EphB4-EphrinB2 interaction, modulates angiogenesis, and inhibits tumor growth. *Blood* 2006; 107(6): 2330-8.
17. Noren, N. K., G. Foos, *et al.* The EphB4 receptor suppresses breast cancer cell tumorigenicity through an Abl-Crk pathway. *Nat Cell Biol* 2006; 8(8): 815-25.
18. Noren, N. K., M. Lu, *et al.* "Interplay between EphB4 on tumor cells and vascular ephrin-B2 regulates tumor growth." *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(15): 5583-8.
19. Salvucci O, *et al.* EphrinB reverse signaling contributes to endothelial and mural cell assembly into vascular structures. *Blood* 2009; 114: 1707-16.
20. Krasnoperov V, Kumar SR, Ley EJ, Scehnet JS, Liu R, Zozulya S, *et al.* Novel EphB4 Monoclonal antibodies modulate angiogenesis and inhibit tumor growth. *Am J Pathol* 2010; 76(4): 2029-38.

LABORATORIO DE INMUNOHEMATOLOGÍA

Importancia de las Células Madre Mesenquimales en el desarrollo del cáncer de mama

Importance of mesenchymal stem cells in breast cancer development

Importância das Células Tronco Mesenquimais no desenvolvimento do câncer de mama

Valeria Fernández Vallone, Vivian Labovsky, Leandro Martinez, Norma Chasseing

Resumen

La mayoría de las pacientes con cáncer de mama (PCM) avanzado desarrollan metástasis óseas, de tipo osteolíticas, como resultado de un desbalance entre los procesos de osteogénesis, osteoclastogénesis y resorción ósea. Nosotros encontramos en la médula ósea (MO) de las PCM avanzado (carcinoma mamario ductal infiltrante, estadio clínico III y IV, sin metástasis en MO y hueso) una disminución de la eficiencia de clonado de las células madre mesenquimales (MSC), medida como el número de unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F), así como una disminución en su capacidad de diferenciación osteogénica en comparación con las voluntarias sanas (VS). Además, observamos osteoclastogénesis espontánea en MO y sangre periférica de

las PCM, mientras que no lo hicimos en las VS. Por último, consideramos importante la evaluación de la diferenciación osteogénica de las MSC de MO y del potencial osteoclastogénico de los progenitores hematopoyéticos de MO y de los monocitos de sangre periférica, como posibles factores pronósticos de futuros desórdenes óseos que pueden favorecer la invasión de las células del CM en el hueso.

Palabras clave: células madre mesenquimales * cáncer de mama * médula ósea * hueso * osteogénesis * osteoclastogénesis

Summary

Most advanced breast cancer patients (BCP) develop osteolytic bone metastasis as a result of the imbalance between osteogenesis, osteoclastogenesis and bone resorption processes. In bone marrow (BM) aspirates of untreated BCP (infiltrative ductal breast carcinoma, clinical stage III and IV, without bone and BM metastasis), a decrease in cloning efficiency of BM-mesenchymal stem cells (MSC), measured as number of colony forming unit-fibroblasts (CFU-F), and a decrease in its osteogenic differentiation capacity compared to healthy volunteers (HV) were found. Moreover, spontaneous osteoclastogenesis (SpOC) in BM and peripheral blood of BCP were observed, while SpOC was not observed in BM of HV. Finally, evaluation of the osteogenic differentiation of BM-MSC and osteoclastogenic potential of BM-hematopoietic progenitors as well as peripheral blood-monocytes are considered important as possible prognostic factors for future bone disorders that may favor the invasion of BC cells into bone.

Key words: mesenchymal stem cell * breast cancer * bone marrow * bone * osteogenesis * osteoclastogenesis

Resumo

A maior parte das pacientes com câncer de mama (PCM) avançado desenvolve metástases ósseas, de tipo osteolíticas, como resultado de um desequilíbrio entre os processos de osteogênese, osteoclastogênese e resorção óssea. Nós encontramos na medula óssea (MO) das PCM avançado (carcinoma mamário ductal infiltrante, estágio clínico III e IV, sem metástase em MO e osso) uma diminuição da eficiência de clonagem das células tronco mesenquimais (MSC), medida como o número de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F), bem como uma diminuição em sua capacidade de diferenciação osteogênica em comparação com as voluntárias saudáveis (VS). Além disso, observamos osteoclastogênese espontânea em MO e sangue periférica das PCM, enquanto que não o fizemos nas VS. Por último, consideramos importante a avaliação da diferenciação osteogênica das MSC de MO e do potencial osteoclastogênico dos progenitores hematopoiéticos de MO e dos monócitos de sangue periférico, como possíveis fatores prognósticos de futuras desordens ósseas que possam favorecer a invasão das células do CM no osso.

Palavras chave: células tronco mesenquimais, câncer de mama, medula óssea, osso, osteogênese, osteoclastogênese

El cáncer de mama, a pesar de ser tema de gran número de investigaciones, continúa siendo el tipo de cáncer más común entre las mujeres y la segunda causa de muerte particularmente en EE.UU. (1). Cada año, más de 44.000 mujeres mueren de cáncer de mama. La estadística indica que la mortalidad en el año 2000 fue de 24,2 y 26,7 en EE.UU. y Argentina, respectivamente (1). En ambos casos, se trata de cifras de mortalidad específica expresadas como número de muertes por año, por 100.000 habitantes. Y a pesar de los esfuerzos realizados para detectar el cáncer mama en estadios tempranos, esto no garantiza la mejor supervivencia del paciente. Observación que indica la necesidad de contar con métodos más sensibles para detectar las células epiteliales tumorales mamarias (CEpTM) y/o las células madre tumorales (TSC) presentes en la mama, así como también la necesidad de continuar profundizando sobre la biología del cáncer de mama en sus estadios iniciales y estudiando los mecanismos que llevan al desarrollo de las metástasis.

Por otra parte, el cáncer fue considerado durante mucho tiempo como un desorden constituido por células transformadas que adquirieron un alto grado de proliferación y autorrenovación, así como mayor capacidad de supervivencia e invasión a través de la activación de oncogenes e inactivación de genes supresores del tumor (2). Sin embargo, en los últimos años se demostró que la formación de un tumor clínicamente relevante depende de la composición y función del microambiente tumoral (MT) formado por células estromales y accesorias, matriz extracelular y factores solubles (2). Dentro de este MT se han encontrado fibroblastos, pericitos, leucocitos (linfocitos T y B, células naturalmente citotóxicas, neutrófilos, eosinófilos, monocitos-macrófagos, basófilos y mastocitos), miofibroblastos, células dendríticas, células derivadas de médula ósea (MO) entre las cuales se encuentran las células madre mesenquimales (MSC) y los progenitores mesenquimales, células endoteliales vasculares linfáticas y de sangre (2). Numerosos estudios experimentales muestran una interacción activa y recíproca entre las CEpTM y las células estromales/ accesorias y demás componentes del MT, eventos críticos que determinan y promueven el crecimiento del tumor primitivo y su progresión hacia una futura metástasis (2). Por lo tanto, el análisis del MT, en particular la presencia y función de las MSC de MO, así como de los progenitores endoteliales y células endoteliales, fibroblastos asociados al tumor y macrófagos asociados al tumor de tipo M2, son actualmente tema de múltiples estudios destinados a comprender más sobre la biología del tumor y así poder desarrollar tratamientos terapéuticos que inhiban o retrasen el crecimiento del tumor primitivo y las metástasis (3) (4).

Por otro lado, el cerebro, hueso, hígado y pulmón son los sitios preferidos de metástasis en las pacientes con cáncer de mama (PCM). Ha sido reportado que las metástasis pueden ocurrir incluso en ausencia del tumor

primario de mama y, en hueso, es el resultado de un desbalance fisiológico y físico como son la lesión lítica y la hipercalcemia (5). Es importante recordar que las metástasis óseas se expresan clínicamente por: 1)- Dolor óseo en el 60-70% de las PCM; 2)- Fractura patológica en el 30-40% de las PCM (68% en fémur y 28% en húmero); 3)- Síndrome de compresión medular en el 20-30% de las PCM; 4)- Hipercalcemia en el 15% de las PCM y 5)- en los casos de afección vertebral, puede existir dolor local e irradiado, con o sin signos de déficit neurológico. Alteraciones que reducen la calidad de vida del paciente y se suman por lo tanto a la necesidad de profundizar sobre la compleja interacción entre las CEpTM y los componentes de MO y hueso (1) (5). Ambos tejidos proveen un microambiente favorable donde las células tumorales pueden proliferar y, así, la MO y el hueso se convierten en un reservorio de la enfermedad. Muchos avances recientes se han realizado en el tratamiento quimioterápico de las PCM avanzado (estadio clínico III y IV) pero la principal limitación es la falta de respuesta al tratamiento de las CEpTM quiescentes presentes en MO, así como la presencia de células madre tumorales.

Hasta el momento, no se ha descrito en humanos, si anterior al desorden óseo que implica la invasión tumoral y desarrollo de la metástasis ósea (MTsO) existe una alteración en el potencial osteogénico de la MSC de MO para dar osteoblastos/osteocito y/o en su migración al hueso afectado. Y tampoco se estudió *in vitro* qué pasaba con la formación de osteoclastos a partir del progenitor hematopoyético comprometido con el linaje monocítico de la MO en estas PCM avanzado sin MTsO. Sin embargo, lo que sí se encontró recientemente, es que la producción y actividad de los osteoclastos está regulada por los factores solubles liberados tanto por las MSC como por preosteoblastos/ osteoblastos, así como por las CEpTM presentes en el hueso con metástasis [RANKL, M-CSF, TRAIL, OPG (receptor soluble de RANKL soluble o RANKL de membrana y TRAIL), IL-1 β , IL-6, IL-11, IL-8, MIP-1 α , PTHrP, TNF- α , TGF- β , PGE2, MMP-7, etc.], sin descartar un efecto indirecto por la liberación de estos factores desde el tumor primario en mama (6, 7). Los factores osteoclastogénicos pueden ser de acción directa como el RANKL, IL-11 o indirecta como la PTHrP, IL-6, IL-1, MIP-1 α , PGE2, TNF- α , MMP-7 pues inducen la liberación de M-CSF y RANKL por parte del osteoblasto y MSC del microambiente de MO y hueso afectado (6, 7). En relación a la formación de osteoclasto, el RANKL se une a su receptor el RANK presente en la membrana del preosteoclasto estimulando sucesivamente la diferenciación, la fusión a una célula multinucleada, la activación y la supervivencia del osteoclasto (8). Además, el M-CSF es un factor primordial en la osteoclastogénesis pues incrementa directamente el pool de preosteoclastos en hueso y favorece la diferenciación a osteoclasto pues al unirse a su receptor el c-fms presente en la membrana del preosteoclasto incrementa la expresión de RANK y su unión con RANKL (8).

En trabajos anteriores demostramos, por primera vez, una disminución significativa de la capacidad de clonado de las MSC para dar unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F) en MO de PCM avanzado, libres de tratamiento y sin metástasis en MO y hueso, así como una disminución significativa del potencial osteogénico de las MSC de MO de estas PCM en comparación con las voluntarias sanas (VS) (9). Hechos ambos que se asocian posiblemente a una disminución de los niveles de Dkk-1 en los medios condicionados de los cultivos de CFU-F= MSC (Dkk-1 en medio de no diferenciación favorece la proliferación de la MSC y su sobrevivencia) y a un aumento de los niveles de Dkk-1 liberado en los medios condicionados de las MSC cultivadas en medio de diferenciación osteogénico (Dkk-1 inhibidor de la vía de las Wnt, factor este último inductor de la diferenciación osteogénica de la MSC), resultados estos últimos que encontramos en estas PCM (10). También cuantificamos un incremento significativo de Dkk-1 en plasma de sangre periférica (SP) de estas PCM avanzado en comparación con las VS (11).

Por otra lado, observamos osteoclastogénesis espontánea *in vitro* en estas PCM avanzado (libres de tratamiento y sin MTsO), independiente de que la diferenciación se hiciera a partir de precursores mielomonocíticos de MO o de monocitos CD14+ de SP en comparación con las VS que presentaron una nula o mínima formación espontánea de osteoclastos. Los cultivos de las PCM tampoco respondieron *in vitro* a los factores osteoclastogénicos conocidos (vitamina D3, RANKL y M-CSF). Mas aún, los medios condicionados de los cultivos de células mononucleares, no estimuladas, de MO de estas PCM avanzado fueron capaces de inducir la diferenciación osteoclástica de monocitos de SP de las VS a valores de % de osteoclasto semejantes al inducido con M-CSF + RANKL (11). Mas aún, se evaluó un incremento significativo de **RANKL soluble** y **Dkk-1** (inhibidor de la osteogénesis e indirecto activador de la osteoclastogénesis por favorecer el pool de osteoblastos productores de RANKL) en SP de estas PCM; incremento significativo de **ICAMs** (activador de osteoclastos y factor que favorece la proliferación, migración y MTsO de la CEpTM) y disminución significativa de **IL-10** (factor anti-osteoclastogénico e inhibidor de algunos tumores) ambos en SP de estas PCM en comparación con las VS e incremento significativo de **GM-CSF** (factor que en exceso favorece la multinucleación de los preosteoclastos y su actividad) en los medios condicionados (7 días) de MSC de las PCM, así como un incremento en la expresión/ MSC de RANKL de membrana en estas pacientes (11). Todos los factores antes descritos favorecen la osteoclastogénesis espontánea encontrada en MO y SP de estas PCM avanzado, pudiendo ser marcadores pronóstico de futuras MTsO.

Por último, encontramos que las MSC que quedan como reserva en la MO de las PCM avanzado, sin MTsO, poseen una disminución significativa de la capacidad de

diferenciación no sólo osteogénica como se detalló anteriormente sino también adipogénica, a expensa del linaje condrogénico que está aumentado respecto a los valores de las VS. Esta deficiente plasticidad de la MSC de MO de estas PCM avanzado se relaciona con la disminución del % de la población de MSC con fenotipo CD146+ (marcador de MSC del nicho vascular) así como con una disminución del índice de fluorescencia relativa de CD146. Otros autores encontraron (12) que la mayor intensidad de fluorescencia relativa de CD146/ MSC corresponden a las MSC que presentan triple plasticidad y mayor autorrenovación, así como mayor capacidad de regular la hematopoyesis en comparación a las que expresan menos intensidad de fluorescencia relativa que corresponden a las MSC unipotenciales de baja eficiencia de clonado. De este último resultado y de nuestros estudios de años anteriores se desprende que en estas PCM avanzado previa aparición de las MTsO existe un menor reservorio de MSC con alta autorrenovación, sobrevivencia, migración y multipotencialidad, pues posiblemente al inicio del desarrollo tumoral hayan migrado las más efectivas al tumor primitivo como se describió en modelos murinos y las que quedan en la MO en este momento del desarrollo tumoral tengan como función principal favorecer la osteoclastogénesis y resorción ósea, procesos ambos que favorecen el desarrollo de las MTsO.

Referencias bibliográficas

1. Patel SA, Heinrich AC, Reddy BY, Srinivas B, Heidaran N, Rameshwar P. Breast cancer biology: the multifaceted roles of mesenchymal stem cells. *J Oncol* 2008; 425895.
2. Lorusso G, Rüegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol* 2008; 130: 1091-103.
3. Roorda BD, ter Elst A, Kamps WA, de Bont ES. Bone marrow-derived cells and tumor growth: contribution of bone marrow-derived cells to tumor micro-environments with special focus on mesenchymal stem cells. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009; 69:187-98.
4. Arendt LM, Rudnick JA, Keller PJ, Kuperwasser C. Stroma in breast development and disease.
5. Rose AA, Pepin F, Russo C, Abou Khalil JE, Hallett M, Siegel PM. Osteoactivin promotes breast cancer metastasis to bone. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 1001-14.
6. Wittrant Y, Théoleyre S, Chipoy C, Padrines M, Blanchard F, Heymann D, *et al.* RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1704: 49-57.
7. Rose AA, Siegel PM. Breast cancer-derived factors facilitate osteolytic bone metastasis. *Bull Cancer* 2006; 93: 931-43.
8. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001; 142: 5050-55.

9. Hofer EL, Fernández Vallone VB, Labovsky V, Feldman L, Bordenave RH, LaRussa V, *et al.* Plasticity of mesenchymal stem cells from bone marrow of patients with lung and breast cancer. Libro del Congreso 5th Internacional Conference on Mesenchymal and Non Hematopoietic Stem Cells 2009, abst 23, pg 30; Austin, TX, EE.UU.
10. Hofer EL, Labovsky V, LaRussa VJ, Vallone VF, Honegger AE, Belloc CG, *et al.* Mesenchymal stromal cells, colony-forming unit fibroblasts, from bone marrow of untreated advanced breast and lung cancer patients suppress fibroblast colony formation from healthy Marrow. *Stem cells and development.* 2010; 19: 359-70.
11. Fernández Vallone VB, Otaegui J, Dimase F, Batgelj E, Feldman L, Bordenave RH, Chasseing NA. Spontaneous osteoclastogenesis in bone marrow and peripheral blood of advanced breast cancer patients. Libro del Congreso 5th Internacional Conference on Mesenchymal and Non Hematopoietic Stem Cells; 2009, abst 48, pg 57. Austin, TX, EE.UU.
12. Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor KC. *In vitro* high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal Stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells* 2010; 28: 788-98.

Resumen

Las galectinas, una familia de lectinas que reconocen glicoconjugados específicos en la superficie celular y la matriz, participan en diversos procesos biológicos como reguladores de la homeostasis de la respuesta inmune y de la progresión tumoral. Considerando el papel inmunomodulador de Galectina-1 (Gal-1) en modelos de inflamación crónica y su contribución a la creación de microambientes tolerogénicos, durante los últimos años exploramos el impacto de esta proteína sobre el balance de células T y la funcionalidad de células dendríticas (CDs). Mientras las células Th1 y Th17 poseen el repertorio de glicanos necesarios para la unión de Gal-1, los linfocitos Th2 son resistentes a la unión de esta proteína, lo cual explicaría el incremento en la susceptibilidad de los linfocitos Th1 y Th17 a la apoptosis inducida por Gal-1 y la consecuente desviación en el balance de la respuesta inmune hacia un perfil Th2. Además, identificamos un circuito tolerogénico en el que Gal-1 induce la diferenciación de CDs tolerogénicas productoras de IL-27, la consecuente expansión de células T regulatorias productoras de IL-10 y la supresión de la inflamación mediada por células Th1 y Th17. Postulamos un nuevo mecanismo de regulación homeostática de la respuesta inmune basado en la interacción entre Gal-1 y sus glicanos específicos, el cual permite anticipar nuevos horizontes terapéuticos, en los que la modulación de la expresión de Gal-1 o sus glicanos nos permitiría regular la respuesta inmune.

Palabras clave: galectina-1 * células T * células dendríticas * tolerancia inmunológica

LABORATORIO DE INMUNOPATOLOGÍA

Glicómica de la respuesta inmune: el universo de glicanos y lectinas en microambientes inflamatorios y neoplásicos

Glycomics of the immune response: the universe of glycans and lectins in inflammatory and neoplastic microenvironments

Glicômica da resposta imune: o universo de glicanos e lectinas em microambientes inflamatórios e neoplásicos

Victoria Sundblad, Juan P. Cerliani, Daniel Compagno, Diego O Croci, Tomas Dalotto Moreno, L. Sebastián Dergan-Dylon, Santiago Di Lella, Claudia Gatto, Lucas Gentilini, Laura Giribaldi, Carlos M. Guardia, Juan M. Ilarregui, Diego J. Laderach, Verónica Martínez Alló, Iván D. Mascanfroni, Santiago Méndez Huergo, Mariana Salatino, Juan C. Stupirski, Marta A. Toscano, Gabriel A. Rabinovich

Summary

Galectins, a family of endogenous glycan-binding proteins able to recognize specific glycoconjugates on cell surface and extracellular matrix, control critical immunological processes involved in immune homeostasis and tumor progression. Given the immunosuppressive role of Galectin-1 (Gal-1) in different models of chronic inflammation and its contribution to the creation of tolerogenic microenvironments in cancer and pregnancy models, the impact of this protein on T helper cell balance and dendritic cells (DCs) functionality was explored. A novel mechanism, based on the differential glycosylation of T helper cell subsets, by which Gal-1 preferentially eliminates antigen-specific Th1 and Th17 cells, leading to a shift toward a Th2 profile was identified. While Th1- and Th-17-differentiated cells expressed the repertoire of cell surface glycans that are critical for Gal-1-induced cell death, Th2 cells are protected from Gal-1 through differential sialylation of cell surface glycoproteins. More recently, the ability of Gal-1 to trigger the differentiation of tolerogenic dendritic cells (DCs), which promote resolution of autoimmune inflammation, was demonstrated. A tolerogenic circuit linking Gal-1 signaling, IL-27-producing DCs and IL-10-secreting T cells was identified. It can be postulated that molecular interactions between endogenous galectins and specific glycans constitute a novel mechanism of homeostatic regulation of immune responses. Understanding the role of protein-glycan interactions in the establishment of tolerogenic or inflammatory programs will enable the design of more rational immunotherapeutic strategies with broad biomedical implications.

Key words: galectin-1 * T cells * dendritic cells * immune tolerance